HAL
open science

Procédé d'encapsulation à base d'hydrogels pour le développement de micro-tissus cellulaires

Wafa Bouhlel

To cite this version:

Wafa Bouhlel. Procédé d'encapsulation à base d'hydrogels pour le développement de micro-tissus cellulaires. Mécanique des fluides [physics.class-ph]. Sorbonne Université, 2018. Français. NNT : 2018SORUS414 . tel-02862449

HAL Id: tel-02862449

https://theses.hal.science/tel-02862449

Submitted on 9 Jun 2020

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

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

Thèse de doctorat de Sorbonne Université

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

Spécialité : physicochimie

Laboratoire Colloïdes et Matériaux Divisés – ESPCI Paris

Présentée par

Wafa BOUHLEL

Procédé d'encapsulation à base d'hydrogels pour le développement de micro-tissus cellulaires

Soutenue publiquement le 30 novembre 2018 devant le jury composé de :

Mme Gladys MASSIERA	Professeur, Université de Montpellier	Rapportrice
M. Fernando LEAL CALDERON	Professeur, Bordeaux INP	Rapporteur
M. Jean François JOANNY	Professeur, Sorbonne Université	Examinateur
M. Nicolas BREMOND	Maître de conférences, ESPCI Paris	Directeur de thèse
Mme Pascale DUPUIS-WILLIAMS	Maître de conférences, ESPCI Paris	Invitée

Résumé

Cette thèse concerne l'amélioration d'un procédé d'encapsulation à base d'hydrogels pour la culture cellulaire tridimensionnelle. Des capsules submillimétriques sont formées via la co-extrusion à haute vitesse de solutions de macromolécules, formant ainsi un jet composé. Les gouttes résultant de la fragmentation du jet possèdent une géométrie de type cœur/ coque dont l'enveloppe est composée d'alginate qui est ensuite solidifiée après immersion dans un bain de gélification. L'utilisation de matériaux biologiques a nécessité la mise en place d'un système d'injection séquentiel afin de manipuler de faibles volumes, inférieurs au mL. Cette approche est alors accompagnée d'une variation longitudinale de la concentration de particules en suspension lors de leur écoulement dans le tube d'injection. Cette dispersion peut être inhibée en ajoutant une bulle à chaque extrémité de l'échantillon afin de le compartimenter. Une déstabilisation de la suspension initialement homogène est observée lorsque l'inertie du fluide porteur rentre en jeu à l'échelle des particules. Ces particules micrométriques induisent un battement et des fluctuations de vitesse du jet entrainant la coalescence des gouttes et ainsi une polydispersité. Enfin, un hydrogel de collagène, mimant la matrice extracellulaire, a été implémenté au cœur des capsules afin de favoriser l'adhésion des cellules épithéliales de l'intestin et des canaux biliaires. Les cellules forment alors au sein de ces matrices un épithélium polarisé et fonctionnel. La formation de ces capsules a nécessité la formulation de la solution de collagène compatible avec le procédé et aux conditions physiologiques des cellules.

Mots clés : atomisation ; alginate ; collagène ; fluides complexes ; dispersion convective ; cellules épithéliales

Abstract

This thesis concerns the improvement of a hydrogel encapsulation process for three-dimensional cell culture. Submillimetric capsules are formed via high speed co-extrusion of macromolecules solutions, thereby forming a compound jet. The drops resulting from the fragmentation of the jet have a core/ shell type geometry where shell is composed of alginate. This layer is then solidified after immersion in a gelling bath. The use of biological materials required the implementation of a sequential injection system to manipulate small volumes, less than 1 mL. This approach is then accompanied by a longitudinal variation of the concentration of the suspended particles flowing in the injection tube. This dispersion can be inhibited by adding air bubbles at each end of the sample to segment it. A destabilization of the suspension initially homogeneous is observed when liquid inertia comes into play at the particle's scale. These micrometric particles induce a flapping motion and jet speed fluctuations causing the coalescence of the drops and thus a size polydispersity. Finally, a collagen hydrogel, which mimics an extracellular matrix, has been implemented in the capsule's core to promote adhesion of epithelial cells forming intestine and bile ducts. Within this matrix, the cells form a polarized and functional epithelium. The formation of these collagen capsules required the formulaiton of the collagen solution compatible with the process and the physiological conditions of the cells.

Key words : atomisation ; alginate, collagen ; complex fluids ; convective dispersion, epithelial cell

Remerciements

La thèse défendue, il est temps à présent d'exprimer sa reconnaissance envers les personnes qui ont contribué au succès de cette aventure.

Tout d'abord, j'adresse mes remerciements à Monsieur Jean-François JOANNY, Professeur à Sorbonne Université, Madame Gladys MASSIERA, Professeur à l'Université de Montpellier et à Monsieur Fernando Leal-Calderon, Professeur à Bordeaux INP. Vous m'avez honorée par votre présence le 30 novembre 2018. Merci pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail de recherche et pour la discussion enrichissante qui a suivi ma présentation. Je tiens à remercier chaleureusement Monsieur Fernando Leal-Calderon, que j'ai eu l'honneur de connaître depuis mon entrée à l'ENSCBP et qui m'a vivement soutenu pour rejoindre le LCMD.

Je remercie Pascale Dupuis-Williams pour la journée d'encapsulation des cholangiocytes et les discussions pertinentes que nous avions eues par la suite sur le développement des cellules au sein des capsules de collagène.

Je remercie Jérôme BIBETTE, pour m'avoir accueilli au sein du Laboratoire Colloïdes et Matériaux Divisés, pour ses conseils d'expert et les conditions matérielles au laboratoire dont nous disposons.

Un immense MERCI à Nicolas BREMOND, mon directeur de thèse. Merci pour m'avoir confié ce projet ambitieux et soutenu tout au long de ces trois années et particulièrement au cours de la rédaction du manuscrit. Tu as toujours été disponible et à mon écoute. Merci pour ton optimisme et ta patience que j'apprécie particulièrement. Je me rappelle encore comme si c'était hier lorsque que tu m'as proposé de rejoindre le laboratoire pour une belle aventure. Aujourd'hui, je le confirme ce fut une mémorable aventure. Je remercie également Jean BAUDRY pour ses conseils avisés et les discussions que nous avions eues. Un grand merci à Florence CONDAMINE, pour ses conseils, ses idées et sa disponibilité. Tu nous as grandement facilité le travail au laboratoire. Je remercie Isabelle et Hélène pour leur bonne humeur, leur gentillesse et pour avoir accepté de passer des commandes en urgence de ce fameux collagène. Merci à toutes les deux.

Je remercie Madame Guylaine DUCOURET du laboratoire SIMM, pour ses précieux conseils en rhéologie, sa disponibilité et la confiance qu'elle m'a accordée en m'autorisant à utiliser librement les rhéomètres.

Je remercie Ludovic OLANIER et Amaury FOURGEAUD, pour avoir accepté d'usiner les pièces de l'injecteur dans des délais assez courts.

Je remercie mes *co-workers du Best labo ever* Gwénaëlle, Erwan et Bettina sans qui, les trois années au laboratoire n'auraient pas été aussi folles…Merci à vous trois pour les super moments que nous avions passés ensemble au laboratoire mas aussi à l'extérieur. Vous m'avez beaucoup conseillé et supporté pendant ces trois années. Ce sont d'excellents souvenirs qui me resteront toujours en mémoire. Des liens forts d'amitié se sont tissés et j'en suis ravie ! Merci Gwen, pour tes précieux conseils de chimiste - polymériste mais aussi tes conseils sur la vie, jeune maman. Erwan, l'homme à tout faire ☺ qui est toujours présent pour rendre service. Merci beaucoup Erwanito, pour tout ce que tu as pu m'apprendre et ta bonne humeur quotidienne. Merci Bettina, la sportive du labo, sans qui l'ambiance n'aurait sûrement pas été la même. Un grand merci à Abdul pour ses conseils, son aide et son soutien moral dans les moments parfois difficiles. Avoir ton avis m'a beaucoup aidé à avancer dans mes recherches.

Merci à Edouard pour tes idées et tes encouragements. C'était un plasir de travailler avec toi au LCMD. Merci à Antoine DREVELLE pour ses encouragements et à très bientôt pour une nouvelle aventure.

Je remercie également ma chère Asma, qui m'a beaucoup soutenu au cours de ma thèse, je t'adore. Je remercie Jessica qui a contribué à mon projet et avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à encadrer au cours de ma thèse. Je remercie Hugo pour sa présence le jour J, comme tu as pu le voir je me suis souvent référé à ta thèse ☺. Je remercie également Mathieu pour ses conseils de rédaction, Mohsen qui m'a formé sur le procédé d'encapsulation et Noushin avec qui j'ai beaucoup appris en culture cellulaire. Merci à Aurore pour ses encouragements, partager le bureau avec toi était très agréable. Merci à nos biologistes Eren, Léo et Jérôme qui nous rejoint par la suite avec qui j'ai partagé le L2, pour vos conseils en culture cellulaire. Je remercie tous les membres du laboratoire Klaus, Jean Baptiste, Sylvie, Ankur, Danial, Arthur, Magda, Guilhem, Wilfried et Paul pour leur bonne humeur quotidienne. Merci à Nawal et Lina d'avoir été présentes le jour J. Merci mon cher Ahmed pour ton écoute et ton soutien particulièrement ces derniers mois.

Il est grand temps à présent de remercier ma famille qui m'a soutenu depuis plusieurs années bien avant ma thèse. Je remercie mes sœurs : Ahlem qui m'a vivement conseillé de poursuivre en thèse. Tu m'as beaucoup soutenu et rassuré au cours de ces trois dernières années, MERCI ! Merci Eptissem, pour ton écoute et ta joie de vivre que tu nous ramènes avec Sey et Meyline. Merci Menel pour ta bonne humeur quotidienne et les bons moments passés ensemble lors de tes séjours à Paris en compagie de mon adorable Darine.Merci à ma petite sœur Dorsaf, qui me demande souvent : Tu as trouvé ce que tu cherchais ? J'espère avoir répondu à tes questions le jour de la soutenance. Merci à mon petit frère adoré, pour ton écoute et ta gentillesse. Un immense merci à mes parents sans qui, je n'aurai jamais parcouru ce long chemin. Vous m'avez toujours encouragé et soutenu. Cette réussite est le fruit de votre travail.

Table des matières

Résumé **3**
Abstract **5**
Introduction **13**
I. La culture cellulaire tridimensionnelle **15**
I.1 Un modèle d'étude cellulaire tridimensionnel : le sphéroïde 19
I.2 Les méthodes conventionnelles de la culture cellulaire 3D 21
I.2.1 Les cultures cellulaires sans échafaudage : Scaffold free cell culture 21
I.2.1.1 Technique ultra low attachment (ULA) 21
I.2.1.2 Technique de la goutte pendante 22
I.2.1.3 Technique de la suspension cellulaire 23
I.2.2 Les cultures cellulaires avec échafaudage : *Scaffold based cell culture* 24
I.2.2.1 Les hydrogels et ses principales applications en biologie cellulaire 24
I.2.2.2 Les supports matriciels solides 29
I.2.2.3 Des propriétés majeures des hydrogels pour la culture cellulaire 29
I.3 Des systèmes microfluidiques : les *organ on chip* 31
I.4 L'encapsulation 33
I.4.1 Présentation de la technologie 33
I.4.2 Formation de gouttes 33
I.4.3 Des gouttes aux particules solides 37
I.4.4 La microfluidique appliquée à la culture 3D 37
I.5 Formation des capsules d'alginate par fragmentation d'un jet composé 38
I.5.1 Le principe du procédé 39
II. Matériels et méthodes **43**
II.1 Matériels 45
II.1.1 Le dispositif expérimental 45
II.1.2 Matériaux 46
II.1.2.1 Collagène 46
II.1.2.2 Alginate 48
II.1.2.3 Hydroxyéthylcellulose (HEC) et polyéthylène glycol (PEG) 49
II.1.3 Préparation des fluides de biopolymères 50
II.2 Méthodes 51
II.2.1 Procédé d'encapsulation par co-extrusion 51
II.2.1.1 Formation d'un jet composé 51
II.2.1.2 Fragmentation d'un jet composé 56
II.2.2 Méthodes physico-chimiques de caractérisation 62
II.2.2.1 Spectroscopie UV-Visible 62
II.2.2.2 Rhéologie 65
II.2.2.3 Marquage par fluorescence 70
III. Ecoulement et encapsulation de suspensions denses **73**
III.1 Dispersion convective dans un écoulement segmenté 76
III.1.1 Introduction 77
III.1.2 Materials and Methods 78
III.1.3 Results and discussion 80
III.1.4 Conclusion 87
III.2 Instabilités d'un jet composé d'une suspension cellulaire dense 92

III.2.1 Battement du jet libre 94
III.2.2 Fragmentation du jet composé 96
III.2.2.1 Extrusion simple 96
III.2.2.2 Co-extrusion 103
IV. Formation de capsules possédant une matrice de collagène 109
IV.1 Les suspensions colloïdales et les protéines 111
IV.1.1 Les forces qui régissent les suspensions colloïdales 111
IV.1.2 Les protéines 116
IV.2 Le collagène 117
IV.3 Reconstruction d'un hydrogel de collagène 121
IV.3.1 Le mécanisme de fibrillogenèse *in vitro* 123
IV.3.2 L'influence des paramètres physico-chimiques sur l'agrégation du collagène 124
IV. 4 De la co-extrusion des fluides à la formation de capsules à cœur solide 132
IV.4.1 Un co-écoulement perturbé : description des phénomènes observés 133
IV.4.2 Origine de ces instabilités 134
IV.4.2.1 Une origine viscoélastique ? 135
IV.4.2.2 Réduire l'instabilité viscoélastique ? 137
IV.4.2.3 Formation d'agrégats lors de la neutralisation de la solution de collagène ? 138
IV.4.3 Maintenir la solubilité du collagène en suspension 141
IV.4.4. Fragmentation d'un jet composé des fluides de collagène et d'alginate 145
V. Développement de micros tissus de cellules épithéliales au sein des capsules à cœur de collagène 151
V.1 De l'épithélium *in vivo* aux modèles *in vitro* 153
V.1.1 L'épithélium intestinal 155
V.1.2 Les modèles in vitro 156
V.2 Une matrice solide de collagène pour la culture des Caco-2 158
V.2.1 Matériels et méthodes 158
V.2.1.1 Culture cellulaire 158
V.2.1.2 Méthodes de caractérisation des structures cellulaires 160
V.2.2 Une couche d'hydrogel hybride pour la formation d'une monocouche cellulaire 161
V.2.3 Une matrice de collagène au cœur des capsules 164
V.2.4 Implémentation d'une monocouche d'hydrogel hybride pour stabiliser la matrice de cœur 165
V.2.5 Formation d'organoïdes 169
V.2.6 Des cellules Caco-2 polarisées formant des épithéliums 172
V.2.7 Des cellules sécrétrices de mucus 174
V.3 Une matrice solide de collagène pour le développement des cholangiocytes 176
V.3.1 Formation de structures cellulaires en épithélium 177
V.3.2 Des cellules fonctionnelles sécrétrices 181
Conclusion 184
Références 187

Introduction

La culture cellulaire est l'un des outils majeurs utilisé pour la biologie cellulaire et moléculaire, et constitue le modèle *in vitro* pour l'étude physiologique et biochimique des cellules. Un des principaux défis de la culture cellulaire est de créer un environnement capable de reproduire l'architecture cellulaire pour y étudier les fonctions physiologiques propres à un tissu biologique.

Les études réalisées actuellement basées sur des méthodes conventionnelles de culture cellulaire (culture sur boîte de Pétri ou *flask*) ne reproduisent pas fidèlement l'organisation cellulaire *in vivo*. En effet, au sein d'un organisme pluricellulaire, l'établissement des interactions cellules-cellules et cellules-matrice extracellulaire est nécessaire pour l'étude du comportement cellulaire et ainsi du phénotype physiologique. La culture cellulaire conventionnelle mène à la formation de monocouches de cellules et limite le contact cellulaire à leur périphérie empêchant ainsi de former des structures tridimensionnelles caractéristiques des structures *in vivo*. La nécessité de développer des méthodes de culture cellulaire tridimensionnelle physiologiquement plus pertinentes devient grandissante et primordiale.

Un nouveau concept a émergé depuis plusieurs années : l'encapsulation de suspensions cellulaires dans des hydrogels tridimensionnels. Cette méthode trouve des applications dans des domaines variés allant de la compréhension de processus biologiques fondamentaux à l'ingénierie tissulaire en passant par le développement de molécules thérapeutiques.

Le Laboratoire Colloïdes et Matériaux Divisés a récemment développé un procédé de formation de capsules à cœur liquide possédant une fine membrane d'hydrogel d'alginate. Le principe de ce procédé repose sur la co-extrusion et la fragmentation dans l'air de fluides suivie par la gélification de l'enveloppe des bi-gouttes formées. Outre la pertinence physiologique d'une culture tridimensionnelle, cette méthode d'encapsulation permettrait de standardiser la culture cellulaire, de concevoir un environnement cellulaire contrôlé en termes d'échanges thermiques et chimiques, de mener des études de criblage à haut débit et de manipuler plus aisément les cellules.

Ce travail de recherche pluridisciplinaire s'articule autour de l'amélioration du procédé dans le cadre d'une encapsulation cellulaire, de la physico-chimie du matériau qui compose les capsules et la mise en culture de cellules épithéliales au sein de ces capsules. Notre objectif principal est de standardiser la méthode de formation de capsules possédant diverses fonctionnalités afin d'y développer un large panel de micro-tissus cellulaires.

Ce manuscrit est composé de cinq chapitres, comme suit :

Le **chapitre I** présente l'état de l'art de la culture cellulaire. Aux deux premières sections sont présentées les méthodes traditionnelles de culture cellulaires tridimensionnelles couramment utilisées pour former des sphéroïdes. Une troisième section présente l'approche microfluidique appliquée à la culture cellulaire. Une quatrième section est consacrée aux méthodes d'encapsulation à base d'hydrogels. Enfin, une dernière section est dédiée à la présentation de la méthode de formation de capsules d'hydrogel d'alginate développée au sein du laboratoire.

Le **chapitre II** décrit le matériel utilisé et les méthodes d'encapsulation et de caractérisation physico-chimiques des fluides de biopolymères employés dans ces travaux.

Dans le cadre d'une encapsulation cellulaire, le matériel biologique constitue des ressources en quantité limitée principalement due à leur coût relativement élevé. Au **chapitre III**, nous présentons le dispositif d'encapsulation adapté pour minimiser les quantités utilisées.
Par ailleurs, parmi les types cellulaires, certaines ne prolifèrent pas. C'est le cas de hépatocytes primaires, il est donc nécessaire de travailler à des concentrations élevées pour pourvoir former un organoïde de taille fonctionnelle. Or, nous avons observé qu'à ces concentrations, les capsules formées sont polydisperses. Une étude sera menée sur l'impact de ces cellules sur l'écoulement et la fragmentation du jet composé.

Jusqu'à maintenant, les travaux réalisés reposaient sur la formation de capsules à cœur liquide. Afin d'ouvrir le champ d'applications de cet outil innovant de culture cellulaire à un plus large panel de cellules, nous avons choisi d'implémenter une matrice dans le cœur des capsules pour mimer le microenvironnement extracellulaire. L'approche envisagée consiste à concevoir des capsules d'hydrogel d'alginate ayant un cœur de collagène de type I. Le **chapitre IV** est consacré à la formation des capsules de collagène. Les propriétés physico-chimie du collagène en solution et à l'état d'hydrogel sont d'abord présentées. Par la suite sont décrites les instabilités hydrodynamiques rencontrées lors de la co-extrusion des fluides de collagène et d'alginate. Dans ce chapitre, nous nous intéresserons à la compréhension des mécanismes physiques sous-jacents pour aboutir à la formation de capsules.

Enfin, le **chapitre V** présente les résultats obtenus à la suite du développement des cellules épithéliales au sein de ces capsules à cœur solide de collagène.

I. La culture cellulaire tridimensionnelle

La culture cellulaire a été développée en 1907 par Harrison[1,2] lorsqu'il a étudié le développement d'une fibre nerveuse du système central à la périphérie d'embryons . Du tissu indifférencié, prélevé à partir d'embryons de grenouille, a été placé dans une goutte de lymphe et déposé sur une lamelle stérile. Par cette méthode, il a pu observer en continu le développement et la différenciation du tissu. Il a ainsi mis en évidence qu'il est possible de maintenir en culture des cellules extraites du tissu d'origine pour son observation.

La culture cellulaire consiste à maintenir ou à faire proliférer des cellules *in vitro* dans un environnement artificiel favorable après leur extraction d'un animal ou d'une plante. La culture de cellules de mammifères est un outil majeur très employé en biologie cellulaire et moléculaire et est utilisé pour un large panel d'applications allant de la compréhension de mécanismes biologiques sous-jacents au comportement des cellules *in vivo* au criblage de molécules thérapeutiques.

Pendant près d'un siècle, la culture cellulaire bidimensionnelle a été utilisée comme modèle *in vitro* pour étudier les réponses cellulaires aux stimuli biophysiques et biochimiques. Les cellules adhèrent et forment des monocouches sur des supports rigides en polystyrène ou en verre. Ces surfaces sont souvent recouvertes de molécules aux propriétés bioadhésives pour favoriser l'attachement des cellules au substrat. Dans cette configuration, les cellules reçoivent par diffusion la même quantité de nutriments et de facteurs de croissance, résultant ainsi d'une croissance cellulaire homogène. Ces monocouches cellulaires constituent la méthode de culture cellulaire dite conventionnelle ou traditionnelle. Cependant cette méthode de culture ne reproduit pas l'organisation des cellules in *vivo*. En effet au sein d'un organisme pluricellulaire, les cellules reposent sur une matrice extracellulaire et interagissent avec les cellules voisines par une signalisation biochimique et mécanique. Ainsi, les interactions cellule-cellule et cellule-matrice constituent un réseau tridimensionnel qui maintient la spécificité et l'homéostasie du tissu[3]. L'incapacité des cellules en monocouche à établir une structure tridimensionnelle caractéristique des structures *in vivo* peut altérer les fonctions cellulaires telles que la viabilité, la prolifération, la différenciation ou encore l'expression des gènes…

Des différences en termes de morphologie cellulaire…

Une différence majeure observée entre une culture cellulaire 2D et 3D est la dissimilarité de morphologie cellulaire. En monocouche, les cellules n'ont qu'un seul point d'attache au support contrairement aux systèmes 3D où les cellules présentent plusieurs points de contacts couvrant toute la surface de la cellule. Il a été montré que la surface d'étalement de la cellule a un impact sur la prolifération, l'apoptose et la différenciation cellulaire.[4-5] Il a été observé également que des cellules mises en culture sur des surfaces planes deviennent progressivement aplaties, se divisent de manière aberrante et perdent leur capacité à se différencier. [6-7] Il en est de même pour les hépatocytes qui présentent une morphologie, une organisation du cytosquelette et une adhésion au support définitivement différentes lorsqu'ils sont en culture dans une matrice tridimensionnelle ou en 2D (Figure I. 1).

A contrario, il a été montré que l'organisation des cellules épithéliales de la glande mammaire en acini et leur sécrétion lorsque celles-ci sont mises en culture au sein d'un environnement tridimensionnel étaient similaires à celles in vivo que sur des surfaces planes.[8,4]

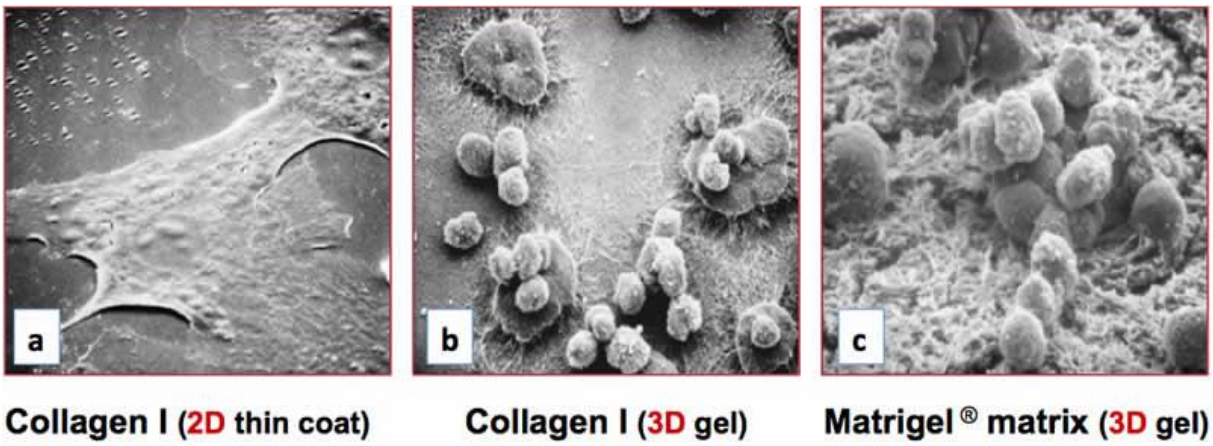

Figure I. 1 : Différence de morphologie des hépatocytes primaires de rat dans un microenvironnement 2D *versus* 3D. Les cellules ont été mises en culture sur une surface recouverte de collagène (a), dans un gel de collagène I (b) et un gel de Matrigel (c).

Des différences en termes de polarité cellulaire …

Les modèles de culture 3D ont également l'avantage de conserver la polarité cellulaire. Cette caractéristique est propre aux cellules épithéliales qui présentent une surface apicale et une surface basolatérale. La polarité est impliquée dans l'organisation des cellules formant le tissu et la direction de

sécrétion de molécules bioactives. Cependant lorsqu'elles sont en culture dans des systèmes tridimensionnels, elles retrouvent alors cette caractéristique.[9]

Bien que le modèle en 2D ait largement contribué à la compréhension de processus biologiques ou de pathologies, il demeure un facteur limitant dans de nombreuses applications.
Jusqu'à aujourd'hui, le criblage de molécules thérapeutiques pour le développement de médicaments, débutait par des essais basés sur des modèles de culture cellulaire 2D suivis par des tests chez l'animal pour finir par les essais cliniques. Il a été montré que lorsqu'on procédait à l'extraction des cellules tumorales de leur niche naturelle, les cellules s'adaptaient à leur nouvel environnement. Cependant cette adaptation s'accompagne d'une modification des fonctions physiologiques au niveau de l'expression des gènes. Certains gènes, notamment ceux responsables de la prolifération sont souvent surexprimés. Ces différences de phénotypes observées entre les résultats collectés du modèle cellulaire et animal sont souvent critiques pour la prédiction des résultats lors des essais cliniques. En effet, seulement 10 % des candidats retenus lors des essais précliniques réussissent au moment des essais cliniques. La plupart des candidats échouent aux essais du développement clinique et spécialement en phase III, qui est l'étape la plus coûteuse du développement du médicament pour des raisons de sécurité et d'efficacité médicamenteuse. Ces échecs s'expliquent par le fait que les réponses cellulaires collectées des tests de culture en 2D sont biaisées par les conditions du microenvironnement qui ne reproduisent pas celles *in vivo*. Ainsi il est primordial d'établir des systèmes cellulaires qui mimeraient ces conditions pour mieux prédire les résultats aux test *in vivo*.[10]

Un des principaux défis de la culture cellulaire est de développer des modèles qui puissent mimer un environnement capable de reproduire l'architecture cellulaire pour y étudier les fonctions physiologiques propres à un tissu biologique. Ainsi, pour répondre à ces besoins, un panel de méthodes de culture tridimensionnelles a été développé.

Dans ce chapitre introductif, nous décrirons un large panel de méthodes de culture cellulaire 3D existantes, allant des méthodes des plus conventionnelles aux méthodes les plus sophistiquées basées notamment sur la technologie microfluidique.

I.1 Un modèle d'étude cellulaire tridimensionnel : le sphéroïde

Les sphéroïdes cellulaires constituent un modèle relativement simple de culture cellulaire tridimensionnel, basé sur l'agrégation de cellules adhérentes. Ces sphéroïdes sont utilisés depuis les

années 1950, mais l'appellation sphéroïde est plus récente et date des années 70 lorsqu'il a été observé que des cellules V79 issues de poumon de hamster ont formé un agrégat cellulaire de la forme d'une sphère.[11] Par la suite, les biologistes se sont donc intéressés à l'utilisation de ce sphéroïde cellulaire comme modèle cellulaire.

Ces modèles de culture cellulaire émergents ont trouvé des applications principalement dans le développement de modèles physiopathologiques et le criblage de molécules médicamenteuse *in vitro.*[12,13,14]. La configuration du sphéroïde est assimilable à une tumeur cancéreuse. La grande majorité des tumeurs développent des régions d'hypoxie due à la fois à une déplétion en oxygène et à une insuffisance de vascularisation. En effet, les tumeurs sont souvent composées d'une population hétérogène : des cellules en surface et proliératives et d'autres à l'intérieur de l'agrégat qui, à l'inverse, ne prolifèrent pas du fait d'un apport en oxygène trop faible. On distingue au sein de ces sphéroïdes tumoraux trois zones concentriques : un cœur nécrotique, une zone quiescente et une zone de prolifération (Figure I.2). Le sphéroïde présente une taille critique (de l'ordre de quelques centaines de µm), au-delà de laquelle des phénomènes de nécrose peuvent apparaître.[15] En fonction de leur localisation, les cellules ont une sensibilité différente aux traitements anti-tumoraux.[16]

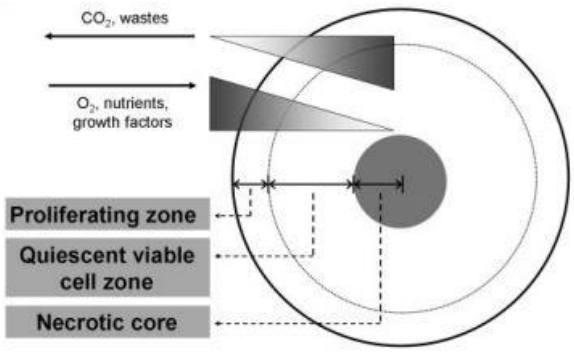

Figure I.2 : Représentation schématique de la géométrie sphérique d'une tumeur. Trois zones concentriques sont illustrées du centre vers la périphérie : un cœur nécrotique, une zone quiescente et une zone de prolifération. Image issue de Lin et al., 2010. [17]

Par ailleurs, la différenciation des cellules souches pluripotentes implique la formation d'une structure sphérique appelée corps embryonnaire qui constitue une étape importante dans l'étude *in vitro* de la différenciation cellulaire. Ainsi, les sphéroïdes constituent un modèle physiologique tridimensionnel pertinent pour l'étude du cancer et de la différenciation des cellules souches. Ils constituent un outil à haut potentiel dans la recherche du cancer et de la différenciation des cellules souches.

Les termes sphéroïdes et organoïdes sont souvent interchangeables en fonction de l'application ou de la thématique de recherche. Tous deux indiquent un agrégat cellulaire relativement de petite taille (< 200 µm) où de fortes interactions cellule-cellules sont établies. Cependant, les sphéroïdes tumoraux constituent l'exception. Ces sont des agrégats de taille plus grande qui, en leur sein, contiennent un corps nécrotique du fait de la déplétion en oxygène et nutriment.[16] Le terme organoïde fait parfois référence à des agrégats où les structure cellulaires sont bien définies et similaires au tissu d'origine tels que des crypts intestinaux [18,19], des cystes de glandes mammaires[20] ou encore les sinusoïdes du foie. Ce sont généralement des modèles basés sur des techniques plus complexes.

Par ailleurs, les sphéroïdes sont toujours utilisés comme modèle pour la compréhension de mécanismes d'auto-assemblage qui se produit naturellement au cours de l'embryogenèse, la morphogenèse et l'organogenèse. Ils ont permis de mettre en évidence les acteurs moléculaires d'adhésion cellulaires impliqués dans ces mécanismes.[21]

Diverses méthodes sont employées pour former ces sphéroïdes ou organoïdes. Dans ce chapitre, les méthodes de culture cellulaire 3D existantes seront détaillées. Pour chacune d'elles, nous donnerons les avantages et inconvénients qui les caractérisent.

Certaines sont basées sur l'utilisation de supports de faible adhésion cellulaire, d'autres sur la mise en suspension des cellules en mode dynamique. Raghavan et ses collaborateurs se sont intéressés à comparer les différentes techniques formant un sphéroïde en termes de morphologie du sphéroïde, d'arrangement cellulaire et de sensibilité aux composés chimiques pour des essais de toxicologie.[22]

I.2 Les méthodes conventionnelles de la culture cellulaire 3D

Les méthodes de culture cellulaire dites conventionnelles sont classées selon la présence d'un échafaudage tridimensionnel au sens large. On distinguera principalement deux types de catégories : les méthodes de culture cellulaires 3D dites *scaffold free* des *scaffold based*.

I.2.1 Les cultures cellulaires sans échafaudage : Scaffold free cell culture

I.2.1.1 Technique ultra low attachment (ULA)

Une façon simple d'aboutir à la formation d'un sphéroïde tridimensionnel est de limiter l'adhésion des cellules au support en modifiant les propriétés de la surface. Etant donné que les protéines ou autres biomolécules peuvent s'absorber au polystyrène des boîtes de pétri ou des plaques à puits par des interactions hydrophobes ou ioniques, la modification de la surface par un polymère hydrophile non

chargé permet d'inhiber ces interactions non spécifiques entre les cellules et la surface. Ainsi, les cellules sont maintenues en suspension. Cette méthode permet d'établir les interactions cellules-cellules au détriment des interactions cellules-substrat et favorise la formation de sphéroïdes. Pour limiter l'adhésion des cellules au substrat, des plaques de puits recouvertes de l'agarose[23] ou au poly-2-hydroxyethyl méthacrylate sont utilisées. Basé sur ce principe, Ivascu *et.al*[24] ont développé une méthode pour former un sphéroïde de cellules cancéreuses sur des plaques de puits à fond coniques préalablement traités avec du poly-2-hydroxyethyl méthacrylate. Il est déposé sur les plaques de puits et séché pendant trois jours avant l'ajout de cellules. Après ensemencement des puits, les plaques sont centrifugées pour favoriser les interactions entre les cellules.

Dans l'objectif d'étudier certains dysfonctionnements cérébraux, certains chercheurs ont utilisé ces microplaques de puits à faible adhésion pour développer un organoïde de cellules souches pluripotentes comme modèle cérébral. [14,25]

La formation des sphéroïdes dans des plaques de puits augmente grandement le potentiel à haut criblage de cette méthode. Par ailleurs, pour répondre à une demande forte de standardisation de la méthode, plusieurs compagnies ont développé et commercialisé des plaques de puits déjà traitées, dédiées à la formation de sphéroïde de taille uniforme.

I.2.1.2 Technique de la goutte pendante

Cette technique s'appuie sur le fait que les cellules s'agrègent pour former une structure 3D en absence de surface sur laquelle elles pourraient adhérer.

Elle utilise par exemple une plaque de puits où une petite cavité est formée au fond du puit pour permettre la formation d'une goutte pendante de milieu de culture. Les cellules sont suspendues dans cette goutte et incubées aux conditions physiologiques jusqu'à la formation d'un sphéroïde.[26,27] Par cette technique, Messner et ses collaborateurs ont réussi à former des sphéroïdes d'hépatocytes qui exercent les fonctions physiologiques spécifiques telles que le stockage de glycogène et la formation des canalicules biliaires (Figure I. 3).[28] D'autres auteurs procèdent différemment : ils déposent la suspension de cellules sur le couvercle d'une plaque de puits ou d'une boîte de pétri puis la retournent. Les gouttes sont maintenues en place par tension de surface. Par gravité, les cellules se concentrent et forment un sphéroïde unique.

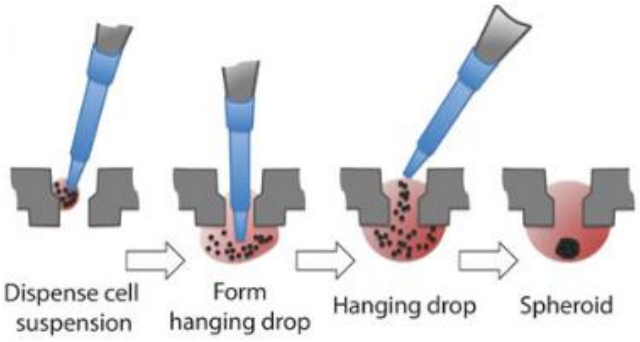

Figure I. 3 : Représentation schématique de la technique de la goutte pendante. Image issue de Paper *et al*.[29]

I.2.1.3 Technique de la suspension cellulaire

Cette fois-ci, la formation du sphéroïde est favorisée par la mise en suspension des cellules sous agitation. Il s'agit d'une méthode généralement utilisée à l'échelle semi-industrielle. Cette méthode permet à la fois de s'affranchir du gradient de température, de pH, de l'oxygène dissous, de l'apport en nutriments et métabolites et également d'éviter la sédimentation des agrégats cellulaires. Ainsi, elle s'affranchit des limites des systèmes de culture en mode statique. La mise en suspension des cellules est réalisée par des bioréacteurs en rotation ou encore des mélangeurs. Ces équipements ont été conçus pour assurer un environnement tridimensionnel homogène et pouvoir contrôler les paramètres de culture nécessaires à la reproductibilité, la robustesse et le faible coût de la méthode.[30,31,32] Cependant dans des tanks d'agitation, la performance de la méthode peut être affaiblie par les évènements de collision entre les cellules et la pâle ou encore le développement d'un régime hydrodynamique turbulent qui conduisent tous deux, à un stress cellulaire pouvant induire la mortalité cellulaire. Aussi, cette méthode présente le désavantage de former des sphéroïdes de taille hétérogène. Massai et ses collaborateurs ont travaillé sur la conception d'un bioréacteur versatile pour la formation de sphéroïde des cellules cancéreuses humaines de poumon Calu-3 et ont montré qu'à faible cisaillement, les cellules étaient correctement préservées.[33]
Une façon de maintenir l'intégrité des sphéroïdes pour des cultures cellulaires de longue durée est de les faire adhérer faiblement au support tout en évitant leur étalement. Pour cela, des surfaces recouvertes de galactose où le sphéroïde adhère à la surface *via* des interactions non spécifiques impliquant les récepteurs galactose-asialoglycoproteine sont utilisées.[34]

I.2.2 Les cultures cellulaires avec échafaudage : *Scaffold based cell culture*

La deuxième catégorie de méthodes de culture cellulaire 3D est basée sur la présence d'un support matriciel de type hydrogel ou poreux. Dans cette partie, après une brève définition des hydrogels, nous présenterons les différentes applications dans lesquelles ils sont employés et enfin nous recenserons les différentes catégories d'hydrogels couramment utilisés en culture cellulaire.

I.2.2.1 Les hydrogels et ses principales applications en biologie cellulaire

Les hydrogels sont des réseaux tridimensionnels hydrophiles qui sont capables de piéger des quantités importantes d'eau, ce qui leur confère des propriétés biophysiques similaires à celles du tissu conjonctif.[35] Ils sont constitués de protéines ou de chaînes de polymères enchevêtrées, d'origine naturelle ou synthétique.

Les hydrogels sont caractérisés par leur diversité en termes de propriétés mécaniques notamment de porosité et de propriétés de surface. Ils sont largement utilisés pour des applications biomédicales et pharmaceutiques. Les hydrogels ont servi à l'immobilisation de cellules notamment pour la libération contrôlée de molécules telles que l'insuline sécrétée par les cellules de Langerhans et l'éthanol produit par les levures au cours de la fermentation.

La diffusion des molécules à travers de l'hydrogel dépend de la porosité, de sa structure géométrique et de ses propriétés de surface qui affecte son affinité à la molécule.

L'alginate est notamment un bon candidat pour la libération de protéines. Les protéines sont encapsulées dans des billes qui les protègent de la dégradation jusqu'à leur relargage. Il est possible alors de contrôler la cinétique de libération de ces macromolécules.[36] Ces hydrogels constituent le milieu environnant des cellules, il est donc primordial que ces derniers soient biocompatibles.

Il existe principalement deux méthodes pour immobiliser des cellules : soit en surface soit en volume, on parle alors d'adhésion et d'encapsulation respectivement.

L'adhésion, comme son nom l'indique, est basée sur l'attachement des cellules à un substrat donné. Il y a une reconnaissance spécifique de type ligand – récepteur entre un motif protéique à la surface de l'hydrogel et un récepteur cellulaire. Outre les critères mentionnés précédemment requis pour une immobilisation cellulaire, les hydrogels utilisés pour l'adhésion doivent présenter à leur surface ces récepteurs. Plusieurs facteurs affectent l'adhésion et le comportement cellulaire vis-à-vis de l'hydrogel, tels que : la structure moléculaire de l'hydrogel et de l'agent de réticulation et la chimie de surface de l'hydrogel. Lorsque l'hydrogel est dépourvu de récepteurs aux protéines de mammifères, celui-ci peut être

fonctionnalisé pour acquérir des propriétés bio adhésives.[37] Les hydrogels poreux constituent un exemple de support pour l'adhésion des cellules.

Enfin l'immobilisation par micro-encapsulation fait référence au confinement des cellules individualisées ou en amas par une membrane semi-perméable. Cette méthode sera développée à la section I.3.

En ingénierie tissulaire, les hydrogels doivent satisfaire un certain nombre de critères fonctionnels et promouvoir la formation d'un nouveau tissu. Ces critères incluent des propriétés physiques (mécanique et dégradation), des caractéristiques de performances biologiques telles que l'adhésion cellulaire. Un aspect majeur de ces hydrogels destinés à l'ingénierie tissulaire est leur biocompatibilité. En effet, leur présence devient problématique lorsqu'ils induisent une réponse inflammatoire. Une attention particulière doit être portée à l'utilisation des hydrogels pour ces applications.

Plusieurs paramètres sont donc à considérer lors du choix de l'hydrogel. En culture cellulaire, l'application qui nous intéresse, les propriétés majeures sont la bioadhésion, la stabilité du matériau et ses propriétés biophysiques et mécaniques.

Les hydrogels naturels et ses dérivés

De par leur nature, ces hydrogels contiennent dans la plupart des cas des molécules endogènes qui sont impliquées dans la transduction de signaux cellulaires. Deux sources biologiques distinguent les hydrogels naturels.

Certains sont d'origine animale, ils dérivent des protéines telles que le collagène, la laminine, la fibrine, ou des composants de la matrice extracellulaire tel que l'acide hyaluronique ou encore le matrigel® et d'autres sont d'origine végétale, ce sont fréquemment des polysaccharides tels que l'alginate ou la cellulose.

De source animale : la matrice extracellulaire et ses composantes

La matrice extracellulaire (MEC) est définie comme un milieu ou réseau complexe de protéines fibreuses (collagène, élastine), de glycoprotéine (la fibronectine et la laminine) et de protéoglycanes. La matrice est sécrétée par les cellules (des fibroblastes dans la plupart des cas) dans laquelle elles sont. Outre son rôle mécanique bien connu de support des cellules (cartilage, os), elle est grandement impliquée dans la signalisation cellulaire qui régulent la morphologie, l'adhésion, la prolifération cellulaire et détermine le devenir de la cellule.[38] Au niveau moléculaire, la MEC assure l'adhésion cellulaire, qui correspond à la reconnaissance moléculaire entre les intégrines présentes à la surface des cellules et les motifs d'adhésion présents sur les protéines de la matrice extracellulaire.

Les protéines de collagène appartiennent à la famille des protéines fibreuses et sont retrouvées chez tous les organismes multicellulaires. C'est le composé majoritaire du derme et de la peau et représente 25% de la masse protéique totale chez le règne animal. Parmi les différents types de collagène, le type I est le plus utilisé et c'est autour de celui-ci que nous nous focaliserons dans ce manuscrit. Le collagène de type I se retrouve dans le compartiment stromal et au niveau de la structure osseuse et est largement utilisé en culture cellulaire 3D. Cette protéine est extraite de diverses sources biologiques telles que le derme bovin, le tendon de queue de rat ou encore le placenta humain. Les propriétés physico-chimiques de la protéine de collagène de type I seront détaillées aux chapitres II et III. La gélatine qui est la forme amorphe du collagène est également couramment utilisée comme biomatériel. La gélatine est composée d'une séquence d'aminoacides identique à celle du collagène mais à la différence de celui-ci, la gélatine ne présente pas de structure hélicoïdale.

La matrice de membrane basale connue sous le nom de **Matrigel®** est une préparation soluble extraite et sécrétée par les cellules du sarcome Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) de souris. Il s'agit d'une tumeur riche en composés de la matrice extracellulaire tels que la laminine (composé majoritaire), le collagène de type IV, des protéoglycanes à héparane sulfate et un certain nombre de facteurs de croissance. Cependant du fait de sa composition inconnue, il est difficile d'identifier le facteur endogène responsable d'une certaine réponse cellulaire observée.

De source végétale

La cellulose est le polysaccharide le plus abondant dans la nature et présente de nombreux avantages tels que la biodégradabilité, la biocompatibilité, la non-toxicité, le faible coût et une stabilité chimique et thermique. Il s'agit d'un polysaccharide linéaire composé d'unités 1,4-β-D-glucopyranosyl. La réticulation des chaînes moléculaires de cellulose implique des liaisons hydrogènes intra- et intermoléculaires. L'utilisation de la cellulose est en fait limitée du fait qu'elle ne soit pas soluble dans l'eau. Des modifications chimiques de la cellulose sont alors réalisées afin de la solubiliser.

L'alginate est également un polysaccharide naturel issu des algues brunes du genre *Phaeophyceae.* Il est principalement présent sous forme de sel de calcium insoluble. Le principe de l'extraction est de convertir ce sel insoluble en un sel de sodium soluble. Son extraction est un procédé en deux étapes qui comprend[39] :

- une pré-extraction à l'acide chlorhydrique dilué :

  $Ca(Alg)_2 + 2\ H^+ \rightarrow 2\ HAlg + Ca^{2+}$

- une extraction à l'hydroxyde de sodium :

  $HAlg + Na^+ \rightarrow NaAlg + H^+$

Malgré son utilisation intensive aux essais *in vitro* et *in vivo*, il reste cependant des réticences quant à la biocompatibilité de cette matière première. En effet, l'alginate qui est extrait des algues brunes est grandement sensible aux contaminations. De plus, les méthodes chimiques d'extraction peuvent également introduire des contaminants supplémentaires. La transplantation de microcapsules contenant des îlots de Langerhans, formées à partir d'alginate non purifié chez des rats diabétiques a déclenché une réaction inflammatoire autour de ces capsules.[40] Les risques d'immunogénicité dépendent de certains paramètres tels que :

- la quantité et la nature des contaminants présents initialement dans la matière première ;
- la méthode de purification ;
- la composition chimique et le ratio des blocs guluronique/mannuronique.

Il a été montré que l'utilisation d'alginate riche en résidus mannuronique induit une production de cytokines dix fois plus importante par rapport à un alginate riche en résidus guluronnique.

Une des caractéristiques intrinsèques de l'alginate est son incapacité à se lier aux cellules de mammifères, due à l'absence à sa surface de motif d'adhésion cellulaire. Un grand intérêt est alors porté sur la fonctionnalisation de l'alginate pour favoriser l'adhésion des cellules à l'hydrogel. Un motif d'adhésion cellulaire (sous forme de peptide) est greffé sur le groupement carboxylique des résidus glycosylés *via* le couplage carbodiimide. Les séquences peptidiques RGD (Arginine - Glycine - Acide aspartique) ont été largement utilisées comme ligand aux récepteurs d'intégrines d'un grand nombre de types cellulaire.[41]

D'autres séquences peptidiques dérivées de protéines de la matrice extracellulaire ont également été utilisées telles que la séquence DGEA (Acide aspartique - Glycine - Glutamine - Alanine) et YIGSR (Tyrosine - Isoleucine - Glycine -Sérine - Arginine) pour améliorer l'adhésion des cellules neuronales à l'hydrogel.[42]

Le **Chitosane** est un dérivé de la chitine, obtenu après acétylation partielle. La chitine est issue de l'exosquelette des crustacés, des champignons et des insectes. Il est composé d'une séquence répétitive (1,4) -beta-D-glucosamine. Le chitosane est un polymère cationique et est largement utilisé pour des applications en immobilisation cellulaire ou en ingénierie tissulaire. Sa disponibilité, biodégradabilité et biocompatibilité font de la chitosane un bon candidat pour la culture cellulaire et l'ingénierie tissulaire. Ses propriétés physiques peuvent être contrôlées par réaction de dépolymérisation, déacétylation ou encore en modifiant les interactions hydrogène entre les groupements amine et hydroxyl de la molécule.[43] Le chitosane est également utilisé en mélange avec l'alginate.

Les hydrogels naturels présentent certains désavantages à leur utilisation, que nous citerons simplement :

- une source animale ;
- une variabilité de composition inhérente entre lots ;
- une complexité de la purification de la matière première (au vue du coût et du procédé multi-étapes). Par ailleurs, de par leur composition souvent complexe, il est parfois difficile de déterminer l'origine moléculaire d'une réponse cellulaire.

Pour s'affranchir de la limite liée à l'origine de la molécule, certains auteurs se sont intéressés à leur production *via* des méthodes de biotechnologie, c'est le cas de l'acide hyaluronique.[44]

Par ailleurs, les hydrogels naturels ne répondent pas toujours aux besoins de stabilité et sont parfois assez limités en termes de propriétés mécaniques. Ainsi, ont émergé les hydrogels synthétiques qui sont de potentielles alternatives aux hydrogels naturels.

Les hydrogels synthétiques

L'avantage majeur de l'utilisation d'hydrogels synthétiques, est qu'il est possible de concevoir des hydrogels à façon aux propriétés physiques et biologiques souhaitées. Ces hydrogels sont biologiquement inertes mais couplés à des composés biologiques, ils peuvent présenter des propriétés biologiques telles que l'adhésion cellulaire. A titre indicatif, nous pouvons citer le poly ethylene glycol (PEG)[17], le poly vinyl alcool (PVA)[45] et le poly 2-hydroxy ethyl methacrylate (Poly-HEMA)[46].

L'hydrogel de PEG représente le *« gold standard »* dans ce domaine, du fait de ses propriétés intrinsèques de faible adsorption protéique, de son profil inflammatoire minimal, de sa non toxicité démontrée lors des tests *in vivo*, de sa disponibilité et la facilité à le fonctionnaliser. L'intérêt de l'utilisation du PEG a été démontré à travers diverses applications de culture cellulaire ; de la différenciation cellulaire, la mécano biologie à l'angiogenèse.[47, 48]

Trois principales méthodes sont utilisées pour former un hydrogel de PEG aux propriétés bioactives, incluant l'irradiation des polymères de PEG, la polymérisation de radicaux libres et des réactions chimiques spécifiques telles que la réaction de condensation[49],la réaction d'addition de Michael[50], les réactions de click chemistry[51]et la réaction enzymatique.[52,53] Le polymère de PEG présente en bout de chaînes deux groupements réactifs hydroxyls, qui peuvent réagir avec un grand nombre de groupements chimiques donnant lieu à un large panel de polymères conjugués aux biomolécules. La méthode la plus utilisée pour la formation d'hydrogel de PEG, est la photopolymérisation. Des polymères PEG conjugués à des molécules bioactives ont été développés pour mimer la MEC. En effet la MEC constitue le modèle pour la conception de matrice aux propriétés bioactives en culture cellulaire.[54,55,56]

Le fait que les propriétés physico-chimiques et biologiques des hydrogels synthétiques puissent être modifiées de manière reproductible, qualifie ces hydrogels de candidat idéal pour étudier l'influence des propriétés de la matrice sur les fonctions cellulaires de manière systématique.

I.2.2.2 Les supports matriciels solides

Les matrices solides pour la culture cellulaire 3D sont conçues à partir d'un large panel de matériaux tels que le métal, la céramique, le verre ou des polymères. Ces derniers sont couramment utilisés car offrent de nombreuses possibilités en termes de structure, de porosité et de rigidité en comparaison aux hydrogels. Une multitude de techniques sont utilisées pour former ces matrices solides telles que la lithographie, l'electrospinning, l'impression 3D… Cette technique permet la formation de fibres de polymères dont les dimensions sont du même ordre de grandeur que celles de la matrice extracellulaire (le diamètre varie entre 3 nm et 5 µm)[57].

Il existe cependant des limites à leur utilisation. Il faut savoir que la matrice extracellulaire constitue l'infrastructure des cellules à l'échelle nanométrique. Des altérations topographiques de cette matrice reconstituée peuvent perturber les interactions cellules-matrice et induire un comportement singulier chez les cellules. Par ailleurs, du fait de leurs propriétés assez éloignées du tissu biologique, une maîtrise des propriétés chimiques de surface, des propriétés mécaniques, de perméabilité est primordiale pour assurer l'adhésion et la croissance cellulaire.

I.2.2.3 Des propriétés majeures des hydrogels pour la culture cellulaire

La matrice extracellulaire est un réseau composé de protéines et de protéoglycanes, qui à la fois sert d'ancrage aux cellules et régule les voies de signalisation cellulaire. Les interactions entre les cellules et la matrice environnante sont fondamentalement impliquées dans les mécanismes physiologiques au cours du développement tissulaire. De par leur capacité à mimer les tissus mous, les hydrogels sont des matériaux très attrayants pour développer des matrices analogues à la matrice extracellulaire. Naturels ou synthétiques, les hydrogels offrent un large spectre de propriétés chimiques et mécaniques.

Les propriétés des hydrogels peuvent être classées sous deux catégories : les propriétés de surface et les propriétés en volume. Ces propriétés peuvent interagir ensemble pour réguler diverses fonctions physiologiques. Dans cette section, nous décrirons les différents moyens physico-chimiques pour reconstruire des matrices d'hydrogels aux diverses propriétés qui influencent le comportement cellulaire.

Une approche couramment utilisée pour ajouter des propriétés bioadhésives aux hydrogels est la fonctionnalisation de l'hydrogel. Celle-ci peut être réalisée par diverses méthodes à savoir la bioconjugaison, par couplage entre les fonctions N-hydroxysuccinimide et amine, la réaction d'addition de Michael, la copolymérisation ou encore la réaction thiol-acrylate.

Le peptide d'adhésion cellulaire le plus utilisé est la séquence RGD, qui se lie aux intégrines des protéines de la matrice extracellulaire. Ces séquences peptidiques permettent alors l'attachement des cellules aux hydrogels biologiquement inertes. Cependant la présence seule de ces séquences RGD ne suffit pas systématiquement à réguler les voies de signalisation impliquées dans certaines fonctions physiologiques telles que la différenciation des cellules souche. Ceci s'explique par le fait que la matrice extracellulaire native présente des composantes bioadhésives de différentes conformations et densité qui modulent les fonctions cellulaires. S'ajoutent aux peptides, les polysaccharides qui sont aussi impliqués dans les interactions cellules-matrice.

Au sein des hydrogels 3D, la rigidité du matériau joue un rôle majeur en influençant le comportement cellulaire et le remodelage de la matrice par les cellules. La rigidité de l'hydrogel dépend de la concentration, de l'arrangement des chaînes de polymères et de la densité de réticulation. Engler et ses collaborateurs[58] ont montré que la différenciation des cellules souches mésenchymateuses est dépendante de la rigidité du substrat sur lequel les cellules reposent. Les cellules neuronales se différencient sur des matrices avec un module de Young entre 0.1 et 1 kPa, entre 8 et 17 kPa pour des cellules myogéniques et enfin entre 25 et 40 kPa pour des cellules ostéogéniques. Ainsi les propriétés de la matrice diffèrent grandement selon le type tissulaire. La rigidité de la matrice d'hydrogel influence également la capacité des cellules à remodeler l'espace environnant.

Plusieurs approches ont été étudiées pour augmenter la rigidité des hydrogels. La compression est une des méthodes utilisées pour produire des hydrogels de collagène aux propriétés mécaniques plus importantes.[59,60] Les technique de réticulation par voie physique (photo-réticulation) ou chimique (agents de réticulation tels que le glutéraldéhyde ou la génipine) permettent de stabiliser l'hydrogel en augmentant les points de réticulation. Ainsi l'hydrogel devient moins sensible aux dégradations enzymatiques par exemple.

I.3 Des systèmes microfluidiques : les *organ on chip*

Historiquement, la technologie microfluidique a trouvé ses premières applications dans le domaine analytique, pour lequel elle offre de nombreuses possibilités : celle d'utiliser de très faibles quantités d'échantillons et de réactifs, de procéder à la séparation et à la détection d'échantillons à haute résolution et sensibilité et de réduire la durée de l'analyse par l'utilisation de fines colonne chromatographiques.[61]

L'utilisation d'outils microfluidiques dans le procédé présente plusieurs avantages, à savoir :

- une réaction rapide à l'échelle micrométrique ;
- un environnement réactionnel homogène ;
- la possibilité de concevoir une réaction multi-étapes ;
- une amélioration en termes d'efficacité ;
- une miniaturisation et la parallélisation du système pour une production en masse ;
- une économie due à une réduction de la consommation en réactifs.

Récemment, les outils microfluidiques ont intensément été utilisés pour de nombreux champs d'application en biologie cellulaire notamment par la création de microenvironnements contrôlés pour des essais *in vitro* reproductibles. L'approche microfluidique permet de contrôler précisément le transport des fluides, de reproduire les fonctions biologiques, d'étudier les interactions et comportements cellulaires et enfin de mener des études de criblage à haut débit.
En culture cellulaire 3D, deux types de systèmes issus de la technologie microfluidique sont développés : les gouttes utilisées comme des bioréacteurs et les *organ-on-chip*. Le modèle de gouttes sera décrit à la section I.4.

La résolution spatiale est à la base de plusieurs systèmes microfluidiques de culture cellulaire 3D. Elle permet de structurer les cellules et le microenvironnement extracellulaire, d'établir des co-cultures aux pôles apico-basales, de créer des gradients chimiques et de mettre en place des systèmes de perfusion de milieu. Dans les techniques classiques de culture cellulaire, la structuration du microenvironnement est souvent établie par une membrane pour assurer l'adhésion cellulaire ou encore la compartimentalisation du système.

La nouvelle tendance de l'utilisation des hydrogels dans les systèmes microfluidiques offre la possibilité d'orienter l'auto-assemblage des cellules vers des structures spécifiques à un type tissulaire *via* ce que l'on appelle des structures guides tels que les crêtes ou les piliers.

Bitschel *et al.*[62] ont développé un modèle de vaisseau sanguin présentant un lumen par une technique originale de mise en forme d'un hydrogel de collagène. L'hydrogel est introduit dans un canal microfluidique. Par contraste de viscosité des fluides et de pression, l'entrée d'un liquide crée un lumen au sein de cet hydrogel. L'invasion puis l'adhésion des cellules endothéliales en monocouches permet alors de former une structure similaire à un vaisseau sanguin.

Par ailleurs, des gradients de concentration de biomolécules sont retrouvés dans divers phénomènes biologiques tels que l'angiogenèse, l'invasion et la migration. De par leur capacité à contrôler l'espace, les systèmes microfluidiques sont pertinemment utilisés pour contrôler finement et reproduire ces gradients chimiques. Des outils microfluidiques ont été développés pour étudier l'effet de facteurs angiogéniques et anti-angiogéniques dans des essais d'invasion tumorale[63,64].

Similairement, Han *et al.* ont étudié la migration trans-endothéliale de neutrophiles sous un gradient de molécules chemo-attractantes. A travers cet essai, ils mettent en évidence les points forts de l'outil microfluidique à compartimentaliser et contrôler la formation d'un gradient. Ils montrent que les neutrophiles répondent différemment aux deux chémo-attractants et corrèlent la rigidité de la matrice à la vitesse de migration des cellules.[65]

La capacité de perfusion d'une culture cellulaire 3D est un atout majeur et caractéristique des techniques microfluidiques. Les avantages associés à la perfusion sont un renouvellement constant de nutriment, un rejet des métabolites et un contrôle en apport en oxygène.

L'émergence des outils microfluidiques a permis de créer des modèles de culture cellulaire physiologiquement pertinents pour simuler certaines fonctions physiologiques comme les fonctions respiratoires, cardiaques et vasculaires.[66]

La capacité des systèmes microfluidiques à contrôler l'espace cellulaire ouvre la voie vers la culture de plusieurs types cellulaires qui offre une meilleure représentation des tissus biologiques.

Ainsi les techniques de culture cellulaire conventionnelles macroscopiques présentent le désavantage de consommer un grand nombre de cellules, une quantité importante de milieu de culture et d'autres ressources pour les essais *in vitro*. Alors que les techniques micro fluidiques offrent, quant à elles, les possibilités d'établir une co-culture spatialement contrôlée, de générer et de contrôler un gradient chimique et d'intégrer un système de perfusion. En effet, en miniaturisant le système de culture, on favorise une culture homogène en évitant des gradients de concentration de molécules (nutriments, facteurs de croissance).

I.4 L'encapsulation

I.4.1 Présentation de la technologie

La technologie d'encapsulation date des années 1950 lorsque Green et ses collaborateurs ont encapsulé du colorant par technique de coacervation de la gélatine et de la gomme arabique pour la production de papier sans carbone[67]. Par la suite, le développement de ces capsules a conduit à l'émergence des capsules pour différentes applications. La technologie de la microencapsulation a été employée de nombreux domaines, cosmétiques, agroalimentaire, pharmacie et papeterie…

Sous le terme encapsulation sont regroupées toutes les techniques qui permettent d'isoler une substance au sein d'une particule. Ces particules peuvent être classées en deux groupes de structures différentes :

- les capsules, particules creuses constituées d'une enveloppe formée par un film continu d'un matériau qui isole la substance encapsulée au cœur de cette entité (système réservoir) ;
- les sphères ou billes, particules pleines constituées d'un réseau continu de matériau support dans lequel est dispersée la substance à encapsuler (système matriciel).

Le choix de la technique d'encapsulation est déterminé en fonction des propriétés physico-chimiques du matériel du cœur, de la membrane et de l'application souhaitée. Plusieurs techniques ont été développées pour former des capsules de fonctionnalités diverses. Cependant, dans cette section, nous aborderons seulement les techniques couramment utilisées pour la culture cellulaire.
Par ailleurs, cette technologie implique deux principales étapes : la formation de gouttes contenant les cellules suivies de la formation d'une membrane qui enveloppe ces gouttes.

I.4.2 Formation de gouttes

La formation de gouttes s'opère par l'établissement d'un ligament liquide suivie de sa fragmentation en présence d'une interface. La création d'une surface, entre deux milieux présentant une tension de surface, a un coût énergétique. Cet état est donc thermodynamiquement instable. Par brisure du ligament en gouttes, cette énergie interfaciale est minimisée. L'instabilité capillaire à l'origine de ce phénomène de brisure du jet est appelée instabilité de Rayleigh-Plateau, décrit dans la littérature il y a plus d'un siècle (Figure I. 4).[68]
Deux procédés sont couramment utilisés pour former des gouttes : l'émulsification et l'atomisation. La déstabilisation d'un cylindre liquide est présente au niveau de ces deux procédés. Dans le cas de

l'émulsification, le cisaillement de la phase dispersée par la phase continue est à l'origine de la formation du cylindre. Alors que dans le cas de l'atomisation, le cylindre s'établit par inertie ou champ électrique.

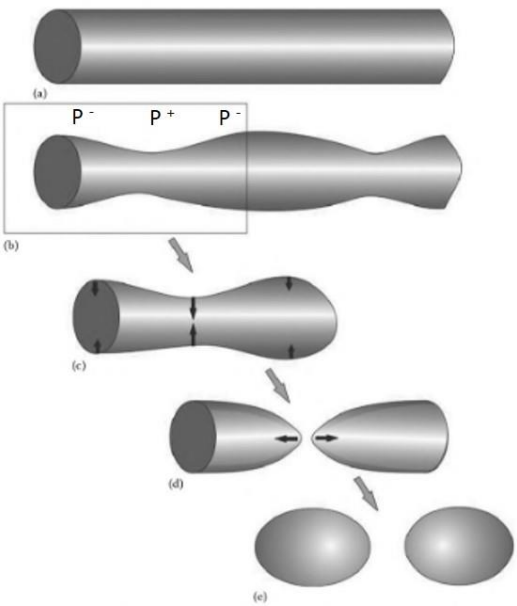

Figure I. 4 : Mécanisme physique de l'instabilité de Rayleigh-Plateau. Jet cylindrique (a) est soumis à des perturbations externes de pression qui le déforme (b). Les déformations en surface sont amplifiées par les effets de la pression de Laplace (c) jusqu'à ce que le jet se fragmente (d) en des gouttes de forme sphérique (e).

Emulsification

Les émulsions sont des mélanges diphasiques de deux liquides non miscibles, caractérisées par la présence d'une interface. Le principe d'émulsification consiste à incorporer une phase (la phase dispersée) dans une autre phase (la phase continue) sous forme de gouttelettes. Dans ce cas, l'application d'un cisaillement permet la formation du ligament liquide.

Cette dispersion de phase utilise différentes techniques telles que la sonification, l'homogénéisation à haute pression ou encore l'agitation mécanique. L'émulsification macroscopique conduit souvent à une polydispersité des gouttes et à un taux d'encapsulation jugé assez critique pour des applications biomédicales et pharmaceutiques.

Le développement de la technologie microfluidique, qui manipule des fluides à l'échelle nano- et micrométrique, a introduit de nombreuses opportunités pour améliorer le procédé de fabrication.

Atomisation

Le procédé d'atomisation constitue la deuxième approche pour former des gouttes. Ici, la formation des gouttes se produit dans l'air.

La formation de gouttelettes par l'injection lente d'un liquide à travers une buse forme des gouttes pendantes. Ceci résulte de la compétition entre la capillarité (force qui retient la goutte) et la gravité. C'est le régime *dripping*, où les gouttes se détachent à proximité de l'orifice d'un capillaire. La taille des gouttes est fonction du diamètre de l'orifice de la buse. La formation des gouttes dans le régime *dripping* produit généralement des gouttes à de faibles taux de production. Lorsque le débit augmente progressivement jusqu'à atteindre une vitesse suffisamment importante pour que l'énergie cinétique dépasse l'énergie de surface, un jet liquide est établi. On parle alors de régime *jetting*. Lorsque la gravité peut être négligée, la vitesse critique pour l'établissement d'un jet peut être exprimée grâce au nombre de Weber[69] :

$$We = \frac{\rho d v^2}{\gamma} > 4 \qquad \text{(I. 1)}$$

où ρ est la masse volumique du fluide (en $kg.m^{-3}$)
d le rayon du jet (en m)
v la vitesse du jet ($m.s^{-1}$)
et γ la tension de surface ($mN.m^{-1}$)

Des gouttes calibrées

Pour obtenir des gouttes calibrées, des techniques actives de production de gouttes ont été développées. Dans le cas de l'atomisation, des ondes acoustiques[70], des perturbations harmoniques de vitesse sont utilisées à l'aide d'un actuateur piezoélectrique[71], un champ électrique[72] ou encore de l'outil microfluidique.

Les émulsions obtenues par l'outil microfluidique offrent l'avantage majeur de générer des gouttes dans un environnement contrôlé, ce qui constitue une meilleure alternative aux méthodes classiques notamment pour la production d'émulsions monodisperses. L'uniformité des gouttes est la principale

caractéristique recherchée pour assurer des propriétés constantes du matériau et ainsi un comportement prédictible dans de nombreuses applications.

En comparaison à la méthode conventionnelle d'émulsification, la technologie microfluidique permet de générer des gouttes calibrées dont la taille peut être régulée par le rapport de débits des fluides de la phase continue et dispersée.

Divers systèmes microfluidiques existent. On distingue : le cross flow, le co-flow, le flow focusing et le step. Un exemple de système microfluidique est représenté à la Figure I. 5, il s'agit du co-flow. Dans cette géométrie, l'écoulement des fluides interne et externe se fait de manière co-axiale. Lorsque les fluides s'écoulent à de faible débit, des gouttes monodisperses sont formées à l'extrémité de l'orifice du capillaire. Il s'agit du régime dripping (Figure I. 5b). A des débits plus élevés, un jet est formé puis se brise en gouttes (Figure I. 5c). Des gouttes monodisperses produites par cet outil microfluidique sont illustrées à la (Figure I. 5d).

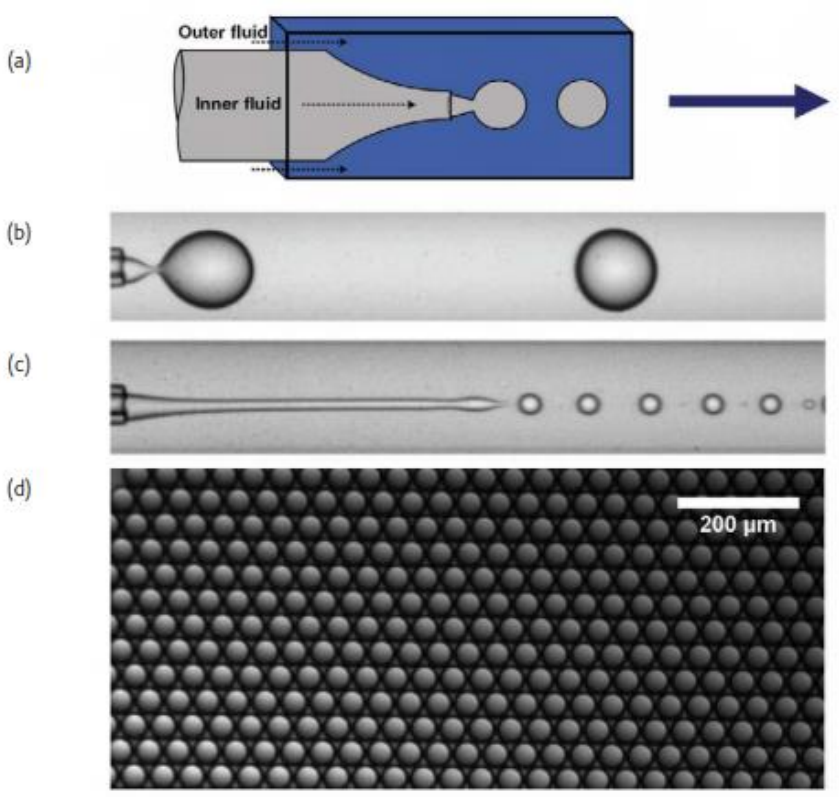

Figure I. 5 : Formation d'une émulsion simple dans une géométrie co-flow. (a) Représentation schématique d'un outil microfluidique permettant la formation de gouttes. Les flèches indiquent la direction de l'écoulement des fluides. (b) Formation de gouttes en régime dripping et (c) en régime jetting. (d) Des gouttes monodisperses sont produites via cet outil. Images issues de Utada et al.,[73-74].

I.4.3 Des gouttes aux particules solides

Les gouttes sont par la suite solidifiées pour obtenir des microsphères de matrice ou encore des capsules de structure core/shell simple ou multicouches. Nous allons présenter brièvement les techniques couramment utilisées.

La coacervation complexe correspond à un phénomène de séparation de phase liquide - liquide qui se produit entre des polymères de charges opposées par interactions électrostatiques. Plusieurs paramètres physico-chimiques tels que le pH, la concentration en polymères, la force ionique affectent significativement la formation du complexe.

La polymérisation interfaciale implique deux monomères solubles dans leur phase immiscible respective, qui sont mis en contact à l'interface. La réaction de polymérisation qui en résulte forme un film de polymère à l'interface des gouttes d'un milieu dispersé.

La transition sol-gel d'un polymère est basée sur sa capacité à former un hydrogel. La réaction de gélification implique la plupart des cas des interactions entre des polymères chargés et des contre-ions de charges opposées. D'autres techniques telles que la polymérisation radicalaire utilisent l'irradiation de la lumière ultra-violet.

I.4.4 La microfluidique appliquée à la culture 3D

L'utilisation de gouttes générées par les outils microfluidiques permet de compartimentaliser les cellules et de favoriser l'auto-assemblage des cellules pour former un sphéroïde. Parmi les méthodes conventionnelles de formation de sphéroïdes décrites à la section I.2, certaines résultent en la formation de sphéroïdes de taille hétérogène (notamment les cultures en suspension) et d'autres nécessitent plusieurs étapes de manipulation (technique de la goutte pendante). Cependant grâce à la génération de gouttes calibrées, les techniques microfluidiques permettent de former des sphéroïdes uniformes.

Chan *et al.* ont proposé un système microfluidique pour la formation de gouttes uniformes par double émulsion. Il montre que ces gouttes constituent un bioréacteur pertinent pour la formation et le relargage du sphéroïde. Pour cela, il utilise deux systèmes de *flow focusing* : le premier servant à produire l'émulsion w/o et le second à ajouter une phase aqueuse externe pour constituer *in fine* une double émulsion w/o/w. La phase aqueuse externe permettra de faciliter la diffusion des molécules. Par l'ajout d'un surfactant dans la phase huileuse, il montre que la formation du sphéroïde est accélérée (de 4 jours à 150 min). Par la suite,

il libère le sphéroïde pour éventuellement l'incorporer dans une matrice d'hydrogel. Le système microfluidique utilisé est illustré à la Figure I. 6.[75]

Généralement, la formation de sphéroïdes dans des gouttes liquides nécessite par la suite son encapsulation dans une matrice (hydrogel). Celle-ci nécessite plusieurs étapes de manipulation, qui complexifie le procédé et risque d'endommager l'intégrité des sphéroïdes. En effet, par action de pipetage, les sphéroïdes sont exposés à des stress mécaniques qui risquent d'agréger les sphéroïdes.[76, 77]

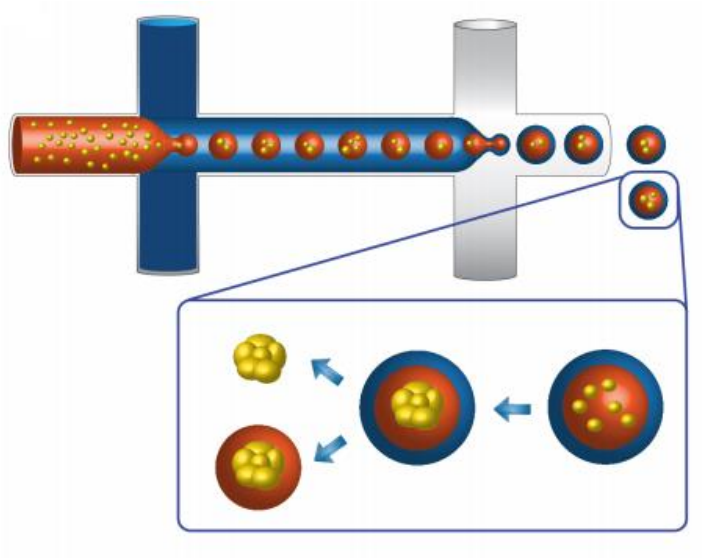

Figure I. 6 : Représentation schématique montrant la formation de sphéroïdes dans des gouttes de la double émulsion. Les cellules encapsulées s'agrègent pour former un sphéroïde unique qui sera par la suite libéré pour éventuellement l'incorporer dans une matrice. Image issue de Chan *et al.,*[75].

D'autres auteurs ont aussi généré des billes d'hydrogel par double émulsion. Dolega *et al.*[78] ont par exemple développé un système microfluidique basé sur la technique de flow-focusing pour produire des billes de Matrigel. Ces billes leur ont servi pour développer des *acini* de cellules épithéliales de prostate et du sein. Par cette technique, les cellules sont directement encapsulées dans une matrice extracellulaire, évitant ainsi une deuxième étape d'incorporation du sphéroïde dans une matrice comme c'est le cas pour les cellules encapsulées dans des gouttes liquides.

I.5 Formation des capsules d'alginate par fragmentation d'un jet composé

A présent nous allons présenter une technique d'encapsulation développée récemment au laboratoire. Il s'agit d'un procédé de formation de capsules submillimétriques à cœur liquide possédant une fine membrane d'hydrogel d'alginate.[79] Dans cette section du manuscrit, nous allons décrire les

caractéristiques notables de ce procédé et des capsules qui en résultent pour une encapsulation cellulaire. Par la suite nous recenserons les principaux travaux basés sur cette technologie.

I.5.1 Le principe du procédé

Le principe d'encapsulation repose sur la co-extrusion et la fragmentation dans l'air de fluides suivie par la gélification de l'enveloppe des bi-gouttes formées (Figure I. 7).

Un jet composé est soumis à une perturbation harmonique à l'aide d'un actuateur piézoélectrique pour permettre de contrôler l'instabilité capillaire et ainsi d'obtenir des gouttes calibrées. Une électrode placée au niveau de la zone de fragmentation du jet composé permet de charger les bi-gouttes formées. Les interactions répulsives conduisent à la séparation des bi-gouttes afin d'éviter le phénomène de coalescence dans l'air. Ainsi, nous parvenons à produire des objets de taille identique de l'ordre de 500 µm. Les bi-gouttes sont ensuite immergées dans un bain permettant de gélifier la solution de coque. Cette méthode mène à la production de capsules à une fréquence de l'ordre de 1 kHz, ce qui ouvre la voie vers des applications à haut débit.

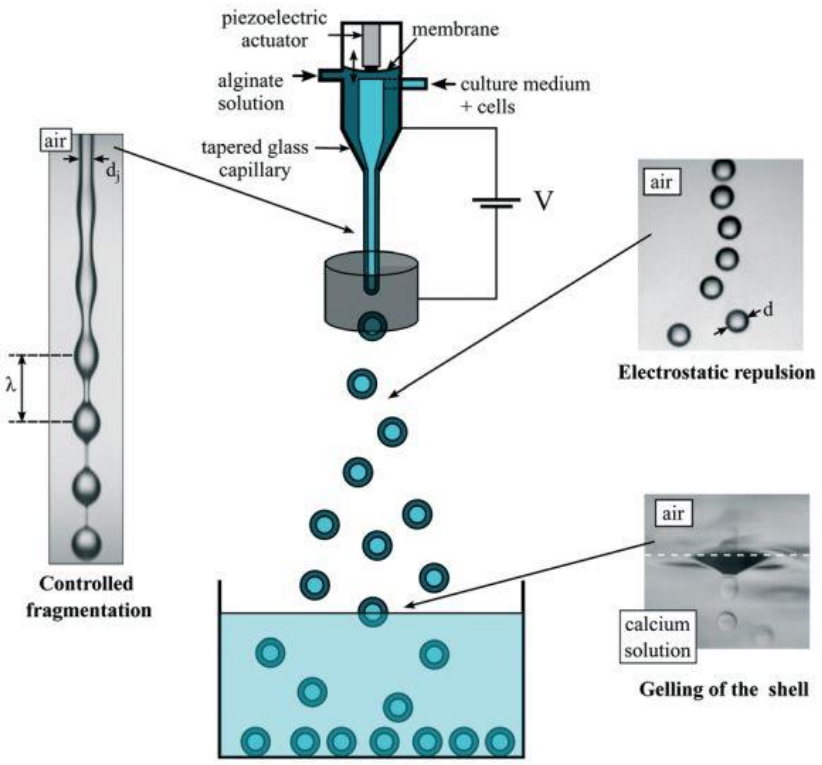

Figure I. 7 : Représentation schématique du procédé de formation de capsules sub-millimétriques d'hydrogel à cœur liquide.[79]

Les propriétés des capsules

Au cours de sa thèse, Rolland[80] a étudié le comportement mécanique de la membrane d'hydrogel d'alginate des capsules. A travers des tests de compression, elle a caractérisé la part élastique de l'hydrogel en mesurant un module de Young de l'ordre de 70 kPa. Par ailleurs, elle a également démontré que la déformation maximale appliquée aux capsules dans le régime élastique est inversement proportionnelle au rapport entre l'épaisseur de la membrane et le rayon de la goutte. Cette déformation est donc liée à l'élasticité de l'hydrogel qui est liée linéairement à la concentration en alginate.

Par ailleurs Rolland, a également caractérisé la perméabilité de la membrane d'alginate par des suivis de libération de molécules à travers celle-ci. Concrètement, elle a mesuré la concentration de molécules initialement encapsulées et libérées dans un milieu externe où sont placées les capsules. En variant la masse molaire de ces molécules, elle réussit à déterminer le rayon de coupure de l'hydrogel d'alginate qui est de l'ordre de 10 à 20 nm pour des solutions d'alginate à 2% en masse. La porosité de l'hydrogel d'alginate qui constitue la membrane de la capsule est une propriété importante dans la structure de la capsule. En effet, elle assure le transport facilité par diffusion et le renouvellement de molécules de faible masse molaire telles que les gaz et les nutriments (source de carbone, vitamines…). Il y a un véritable échange à travers la membrane qui est piloté par le gradient chimique de part et d'autre de la membrane. En revanche cette membrane constitue une barrière aux microorganismes tels que les virus et les bactéries.

Ainsi par ses propriétés mécaniques et de perméabilité, la membrane d'alginate assure une barrière protectrice aux cellules au sein de la capsule.

Standardisation de la méthode d'encapsulation

Comme nous l'avons décrit précédemment, en fonction des débits imposés, des propriétés physiques des fluides utilisés, l'écoulement est soit caractérisé par un régime *dripping* ou *jetting*. Pour former des capsules submillimétriques, il nous faut travailler dans des conditions où un jet est formé. Ce jet composé est établi par l'écoulement des fluides de coque et de cœur à travers un injecteur.

Basée sur la technique d'atomisation, ce procédé utilise simplement des solutions de polymères hydrophiles en phase aqueuse contrairement aux méthodes basées sur l'émulsification.[78]

Des applications de ces capsules

Depuis son développement, ce procédé a permis l'encapsulation d'un bon nombre de microorganismes et de cellules de mammifères allant des micro-algues aux cellules hématopoïétiques pour diverses applications (Figure I. 8).

Les travaux de Alessandri *et al*.[81] ont abouti à la formation de sphéroïdes de cellules tumorales au sein de ces capsules. Par prolifération cellulaire, la taille du sphéroïde augment jusqu'à une taille critique où le sphéroïde exerce une pression sur la membrane de la capsule. Ces capsules ont été utilisées comme capteur mécanique pour mesurer la pression exercée par les cellules lors de leur prolifération.

Des microalgues ont également été mises en culture dans ces capsules pour la bioproduction de molécules d'intérêt comme des lipides pour des applications plutôt axées vers la cosmétique verte.

Figure I. 8 : Capsules contenant des algues. Crédits : H. Doméjean, N. Bremond

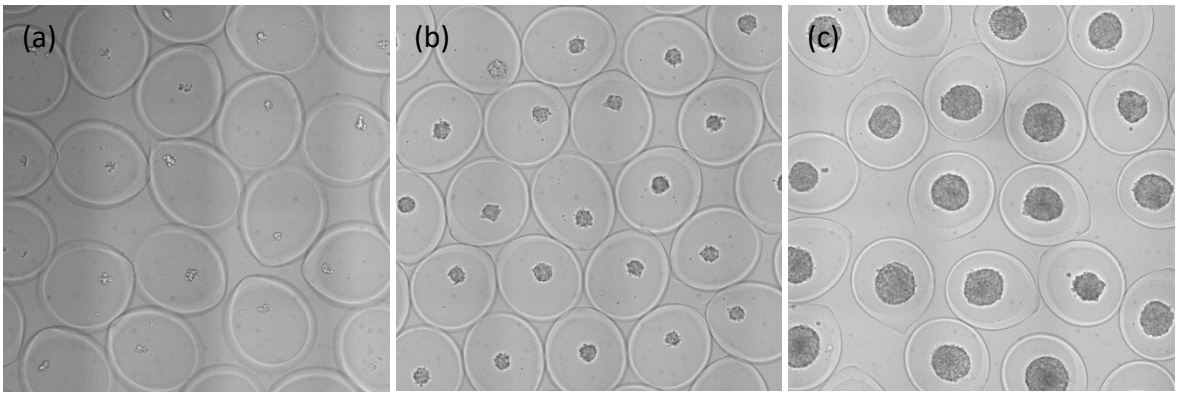

Figure I. 9 : Capsules formant un sphéroïde de cellules de colon de rat CT26 à 1 jour (a), 3 jours (b) et 7 jours (c) après encapsulation. Crédits : A, Funfak.

II. Matériels et méthodes

II.1 Matériels

II.1.1 Le dispositif expérimental

Tout au long de cette thèse, nous avons utilisé un injecteur en résine époxy. Ils ont été fabriqués par stéréolithographie par la société Proform avec une résolution de 50 µm. Ces injecteurs possèdent trois voies d'entrée des fluides. A l'extrémité de cet injecteur, un capillaire en verre est inséré dans l'orifice et collé. Ces capillaires en verre borosilicate ont été fournis par Harvard Apparatus. Ils ont un diamètre externe et interne de 1 et 0,78 mm respectivement. Dans l'objectif de former des capsules de l'ordre de 400 µm, le diamètre interne à l'extrémité du capillaire est réduit à 200 µm avant son insertion au niveau de l'injecteur. Un protocole de préparation de ces capillaires mis en place par Doméjean au cours de sa thèse a été utilisé. Nous rappelons ici brièvement les étapes de ce protocole. Les capillaires sont tout d'abord étirés à l'aide d'une étireuse à capillaire (Narishige PC-10), coupés à la microforge (Narishige MF-900), puis poncés pour enlever les défauts de découpe à l'aide de papier abrasif recouvert de silice avec une rugosité allant de 1 à 10 µm. Ces capillaires subissent ensuite un traitement hydrophobe pour éviter les phénomènes de mouillage lors de leur utilisation. Pour cela, la surface des capillaires est nettoyée et activée au plasma de gaz oxygène. L'extrémité de ces capillaires est ensuite immergée dans une solution commerciale Aquapel. Enfin, la longueur de ces capillaires est réduite à 5 mm pour minimiser le contact entre les fluides au sein de l'injecteur. La longueur du capillaire collé résulte en une section droite de longueur 3 mm qui est confinée dans l'orifice de l'injecteur et une section convergente de longueur 2 mm. La Figure II. 1 illustre l'ensemble du dispositif d'encapsulation.

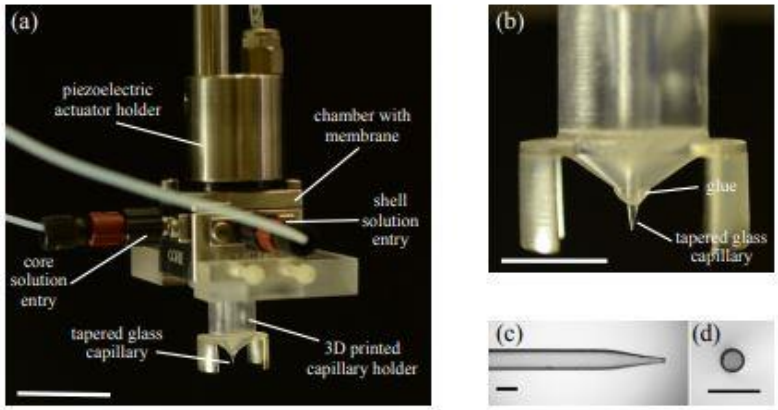

Figure II. 1 : (a) Vue d'ensemble du dispositif d'encapsulation. La barre d'échelle est de 2 cm. (b) Injecteur imprimé en 3D. La barre d'échelle est de 1 cm. (c) Vue de côté d'un capillaire en verre étiré. La barre d'échelle est de 1 mm. (d) Vue de face de l'extrémité du capillaire en verre étiré. La barre d'échelle est de 0,5mm.

L'écoulement des fluides à travers cet injecteur est généré par des pousse-seringues (Harvard Apparatus, PhD Ultra) permettant de maintenir un débit constant. Le dispositif d'imagerie est constitué par une source de lumière LED permettant un éclairage homogène et une caméra rapide (Photron, FastCam SA3) couplée à un microscope (Olympus).

II.1.2 Matériaux

II.1.2.1 Collagène

Le collagène de type I (Collagen I, Rat tail) est fourni par la compagnie Corning. Il est issu de l'extraction acide du tendon de queue de rat. Dans les solutions stock fournies, le collagène est dispersé dans une phase continue d'acide acétique à 20 mM. Ces solutions sont stockées à 4°C.

L'observation de la solution stock par microscopie optique a révélé la présence d'agrégats de collagène. Par microscopie optique, on distingue deux types d'agrégats : on observe de rares agrégats plutôt fibrillaires de taille importante (Figure II. 2) et des agrégats à l'apparence de cristaux (Figure II. 3) qui seraient d'après le fournisseur, du collagène ayant subi par les conditions environnantes des cycles de congélation et décongélation. Des molécules à l'état de monomères et d'oligomères ont déjà été détectées par analyse chromatographique.[82]

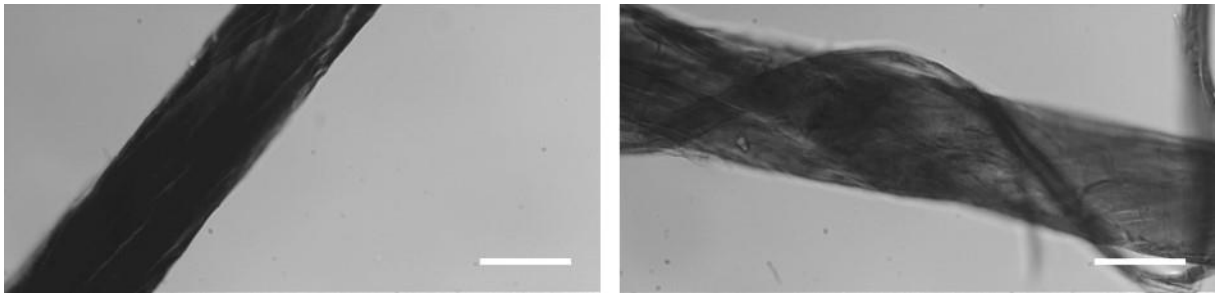

Figure II. 2 : Des agrégats fibrillaires de collagène contenus dans la solution stock. La barre d'échelle correspond à 20 µm.

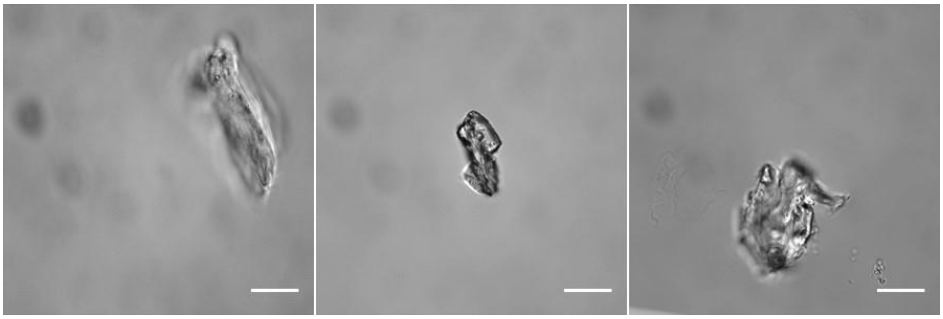

Figure II. 3 : Agrégats de collagène ayant subi des cycles de congélation/décongélation. La barre d'échelle correspond à 20 µm.

Pour rendre compte de la polydispersité de la dispersion colloïdale, une mesure granulométrique basée sur la diffraction laser a été réalisée à l'aide du Mastersizer. Les densités en volume et en nombre en fonction de la classe granulométrique d'une dispersion de collagène diluée dans 20 mM d'acide acétique sont reportées à la Figure II. 4. D'après les mesures de diffraction, la distribution en taille des agrégats contenus dans la dispersion stock est relativement large. Elle varie de la dizaine à plusieurs centaines de µm. La polydispersité de la dispersion colloïdale résulte d'une hydrolyse incomplète du collagène lors de son extraction de la matrice biologique. La taille de ces agrégats s'est avérée être critique au cours de l'extrusion de la solution de collagène. En effet, ces particules obstruent le capillaire de l'injecteur. Par conséquent, nous décidons de soustraire ces agrégats de la suspension stock de collagène par filtration. Nous choisissons de procéder par gravité à l'aide de tamis cellulaires en nylon de porosité 5 µm. Après filtration de la solution stock de collagène, le jet constitué d'un cœur de collagène n'est dorénavant plus interrompu par ces agrégats.

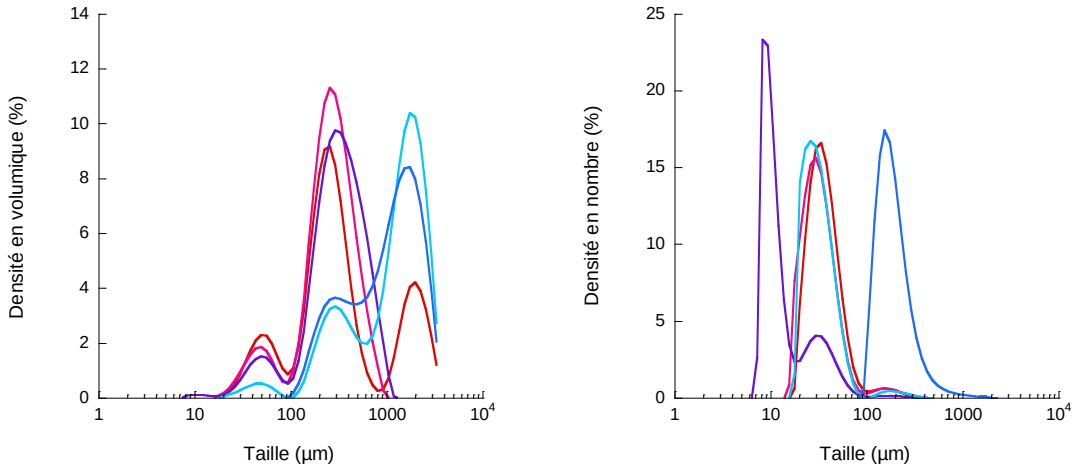

Figure II. 4 : Distribution en taille des agrégats de collagène dans la solution stock. (a) densité en volume et (b) densité en nombre en fonction de la classe granulométrique. Quatre mesures ont été réalisées.

La solution neutre de collagène est préparée à une concentration de 2 $mg.mL^{-1}$ par dilution de la solution stock de collagène avec soit du milieu de culture Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma) soit du tampon phosphate salin (PBS, Sigma), de l'eau MilliQ et par l'ajout de l'hydroxyde de sodium pour ajuster le pH du milieu à un pH physiologique entre 7,3 et 7,4. Nous avons choisi d'une part d'utiliser un milieu de culture couramment utilisé pour la culture de cellules de mammifères (milieu DMEM) pour

assurer un milieu physiologique et nutritif idéal aux cellules à encapsuler et d'autre part pour permettre la gélification du collagène une fois les capsules formées.

II.1.2.2 Alginate

Deux types d'alginate de sodium sont utilisés, la PROTANAL LF200 FTS et la PROTANAL LF 10/60. Elles sont fournies par la compagnie FMC Biopolymer. Tous deux ont un grade pharmaceutique.
Au cours de sa thèse, par des mesures de diffusion statique de la lumière à différents angles, Rolland[80] a pu déterminer la masse molaire moyenne et le rayon de gyration moyen de la PROTANAL LF 200FTS :

- La masse molaire moyenne : $M_w = 150.10^3$ $g.mol^{-1}$
- Le rayon de gyration moyen : $R_g = 90$ nm

Ces grandeurs sont données en termes de moyennes puisque le polymère est distribué en taille.

Comme nous l'avions mentionné précédemment au chapitre I, il s'agit d'un polysaccharide issu des algues brunes. Chimiquement, l'alginate est un copolymère linéaire constitué de blocs (1,4) -β-D-mannuronate (M) et α-L-guluronate (G) (Figure II. 5). Les blocs sont composés de résidus consécutifs G, de résidus consécutifs M et de résidus alternatifs G-M. La composition du polymère en termes de ratio des blocs G/M, la longueur des blocs G, son poids moléculaire sont autant de facteurs qui influencent les propriétés physiques du polymère en solution et de son hydrogel qui en résulte.[30]

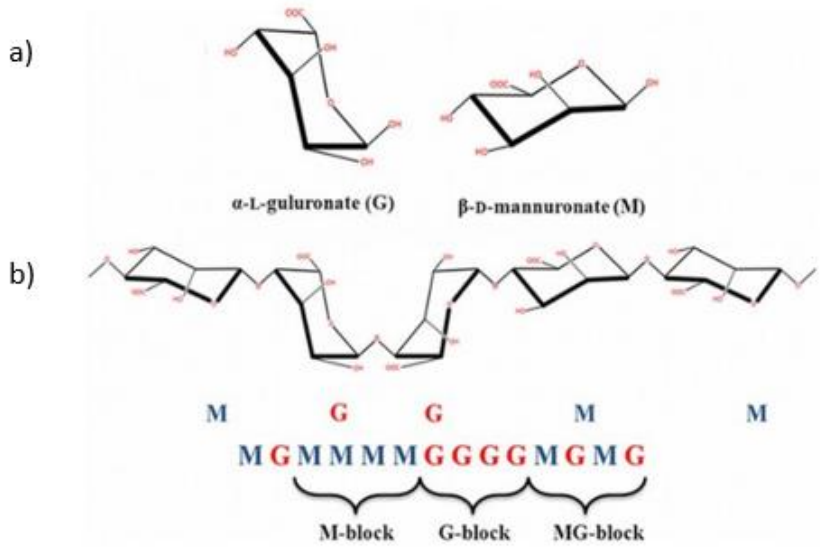

Figure II. 5 : Structure chimique de l'alginate. (a) Conformations des monomères (unités élémentaires) qui composent le polymère. (b) réarrangement des blocs linéaires du polymère. Image issue de Juajrez *et al.*[83]

Transition sol-gel

La transition sol-gel de l'alginate implique exclusivement les blocs G du polymère dans la réticulation des chaînes avec les ions divalents. Le modèle de la *boîte à œuf* décrit la configuration dans laquelle les chaînes des blocs G sont réticulées en présence de cations divalents. Ces réticulations sont permises par la présence des interactions électrostatiques entre les groupements carboxyliques chargés négativement et les charges positives des ions divalents. L'ion divalent le plus couramment utilisé est l'ion calcium (Ca^{2+}) (Figure II. 6). Cependant d'autres cations divalents favorisent cette transition sol-gel tels que le baryum Ba^{2+}et le cuivre Cu^{2+}. Ainsi, ce type de liaison classe l'hydrogel d'alginate dans la catégorie des hydrogels physiques. Ces types de gels sont réversibles et l'utilisation de molécules chélatantes de l'ion divalent telles que l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) permet de repasser à l'état de solution.

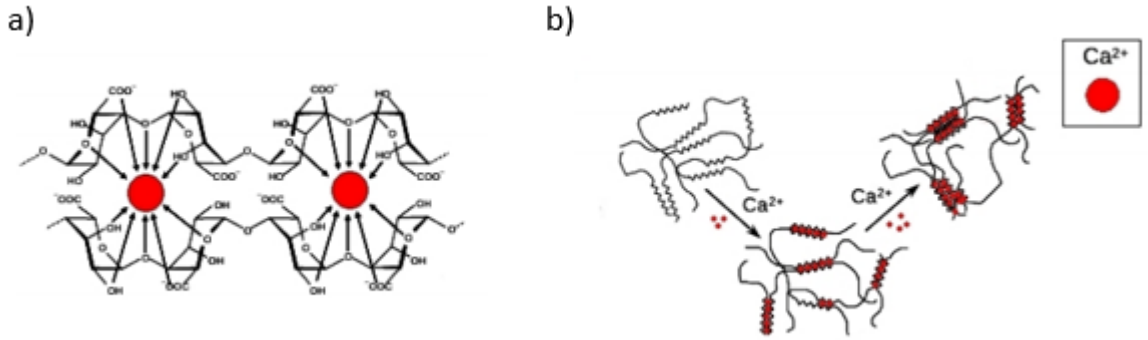

Figure II. 6 : Modèle de boîte à œuf. (a) Un cation calcium a recours à quatre unités G pour la réticulation des chaînes du polymère. (b) L'emboîtement des chaînes autour de l'ion et l'association latérale des chaînes permettent la formation du gel. Image issue de.[84]

II.1.2.3 Hydroxyéthylcellulose (HEC) et polyéthylène glycol (PEG)

Le 2-hydroxyethylcellulose est un polysaccharide. La masse molaire de la HEC utilisée est de $M_w = 1{,}3.10^6$ $g.mol^{-1}$. Sa structure chimique est illustrée à la Figure II. 7.

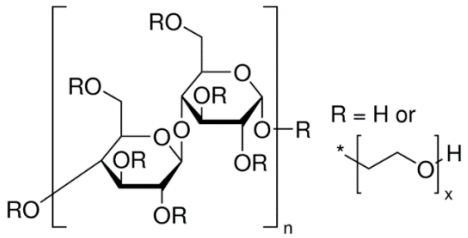

Figure II. 7 : Structure chimique du polymère HEC

Le PEG utilisé a une masse molaire de 20 000 $M_w = 2.10^4$ $g.mol^{-1}$. Les deux polymères sont fournis par Sigma.

II.1.3 Préparation des fluides de biopolymères

A l'exception du collagène, les solutions d'alginate, de HEC et de PEG sont globalement solubilisées dans de l'eau ultra pure MilliQ, purifiées, pasteurisées et filtrées avant d'être utilisées. Nous détaillons ici les protocoles suivis :

La solution d'alginate est solubilisée durant une nuit par agitation magnétique à température ambiante. Du tensioactif SDS à 0,5 mM est ajouté. Les solutions de HEC et de PEG, quant à elles sont solubilisées à l'aide d'un agitateur à tige de type turbine (VWR, référence 441-1228) (8 heures, 2000 rpm). Une fois solubilisées, les trois solutions sont centrifugées (1 heure, 8421 g) afin d'éliminer les particules insolubles contenues initialement dans la matière première. Le surnageant est conservé. Par la suite, les solutions sont pasteurisées (1 heure, 65°C) à l'étuve. Toutes les dix minutes, les solutions sont agitées manuellement pour assurer une diffusion homogène de la chaleur au sein de l'échantillon. Enfin, les solutions sont filtrées à 5 µm pour éliminer d'éventuels particules insolubles susceptibles de perturber l'écoulement lors du procédé d'encapsulation.

Dans le cadre d'une encapsulation cellulaire, la solution de cœur qui recevra les cellules est préparée aux conditions physiologiques de pH et d'osmolarité. Le pH physiologique de la solution compris entre 7,2 et 7,4 est atteint par ajout d'hydroxyde de sodium à 1M. Le milieu est tamponné avec du tampon non ionique HEPES à une concentration molaire de 25 mM (ThermoFisher, référence 15630106). Pour ajuster l'osmolarité de la solution, du sorbitol est ajouté à une concentration de 250 mM. Ces concentrations ont été déterminées suite aux mesures d'osmolarité des solutions à différentes concentrations molaires de solutés (Figure II. 8). De la streptomycine/pénicilline à 1% (V/V) est ajoutée aux solutions pour éviter tous risques de contamination bactérienne.

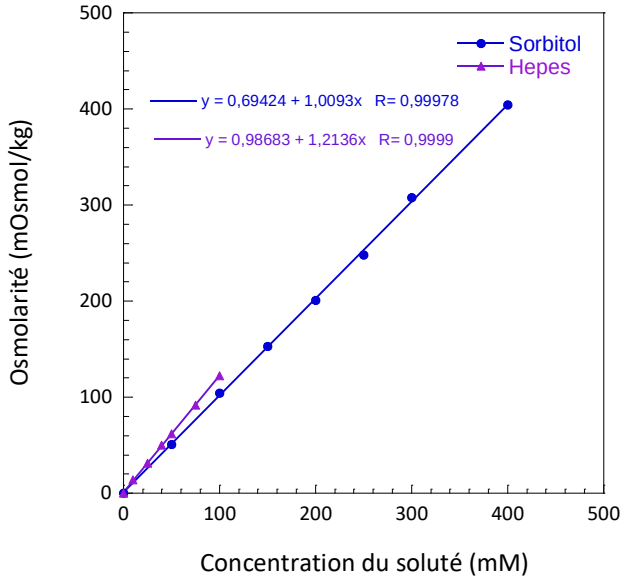

Figure II. 8 : Courbes de calibration de l'osmolarité en fonction de la concentration en soluté en solution.

II.2 Méthodes

II.2.1 Procédé d'encapsulation par co-extrusion

Dans cette section, nous présenterons les étapes du procédé de formation du jet composé et décrirons les mécanismes physiques sous-jacents. Par la suite, nous présenterons des cas d'instabilités au sein du jet composé.

II.2.1.1 Formation d'un jet composé

A travers l'injecteur à trois entrées, l'écoulement des fluides concentrique est d'abord confiné puis un jet est établi dans l'air lorsque ce confinement est supprimé. La Figure II. 9 illustre l'écoulement maintenu concentrique de trois fluides. Les fluides de cœur et de coque sont de l'eau et le fluide intermédiaire est une solution de glycérol.

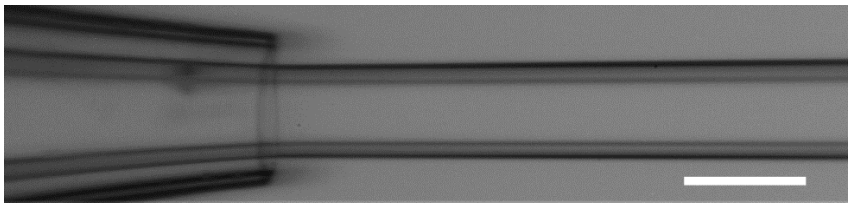

Figure II. 9 : Co-écoulement concentrique des fluides. Cœur et coque : eau ; Intermédiaire : solution de glycérol à 60 %m. Q_{tot} = 300 mL.h^{-1} ; Rq = 2 ; rq = 1. La barre d'échelle correspond à 200 µm.

Au moment de la transition d'un écoulement confiné (à l'intérieur du capillaire) à un écoulement libre, celui-ci subit des variations des conditions aux limites. Il passe des conditions de vitesse nulle aux parois aux conditions où les contraintes de cisaillement deviennent nulles à la surface libre. Ceci induit une relaxation du profil de vitesse passant d'un profil de type Poiseuille vers un profil bouchon. Nous noterons v_{conv}, la vitesse du profil bouchon :

$$v_{conv} = \frac{Q_{Coeur} + Q_{IML} + Q_{Coque}}{\pi\, R_{jet}^2} \qquad \text{(II. 1)}$$

où Q_{coeur}, Q_{IML} et Q_{coque} sont les débits d'injection des fluides de cœur, de la phase intermédiaire et de la coque respectivement ;
R_{jet} le rayon du jet.

Lors de la co-extrusion, le fluide de coque est toujours constitué d'une solution d'alginate LF200FTS à une concentration massique de 1,8%. Quant aux fluides de cœur et de la phase intermédiaire, ils sont constitués de solutions de HEC, d'eau, ou encore de collagène selon la configuration des capsules souhaitée. La plupart des fluides utilisés sont des fluides viscoélastiques dont les propriétés seront présentées par la suite. Au cours de la co-extrusion, la suppression du cisaillement au niveau du capillaire entraine la relaxation des contraintes normales ce qui favorise le gonflement du jet des fluides viscoélastiques utilisés. Nous observons alors une décélération de la vitesse moyenne du jet.

Battement du jet composé

Au cours de ses travaux, Doméjean[85] a montré que le battement résulte d'une instabilité hydrodynamique dû à un contraste des propriétés viscoélastiques entre les fluides de cœur et de coque. Il observe que le centre du fluide de cœur oscille au cours du temps. Le motif hélicoïdal qui caractérise cette

instabilité est corrélé aux fluctuations de la position du centre du jet. L'amplitude de ce battement dépend à la fois de la composition des fluides du jet composé et du rapport des débits imposés.

Il a été montré également que ce phénomène de battement est amplifié par la présence d'ions dans la solution de cœur. Comme l'alginate est un polyelectrolyte, les ions présents écrantent les répulsions électrostatiques entre les chaînes du biopolymère entraînant un changement de conformation et ainsi les propriétés viscoélastiques de la solution d'alginate. Dans le cadre d'une encapsulation de cellules, la présence de sel provenant des milieux de culture, perturbe alors ce co-écoulement. Contenu dans tous les milieux de culture à une concentration de l'ordre de 150 mM, le chlorure de sodium est primordial pour maintenir l'osmolarité physiologique comprises entre 270 et 310 mOsmol/kg. Le battement d'un jet composé dont le cœur contient 150 mM NaCl est illustré à la Figure II. 10Figure II. 10. Tout comme l'ion sodium, le proton peut également interagir avec l'alginate. Nous remarquons que la présence d'acide acétique dans le cœur d'un jet composé induit son battement. Pour évaluer cette instabilité, nous nous sommes intéressés à quantifier le battement. Pour cela, nous mesurons l'écart du centre du jet à l'axe de l'injecteur à une distance équivalente à dix fois le diamètre du jet de la sortie de l'injecteur, notée Xc (Figure II. 11). Ces fluctuations de la position du jet composé sont mesurées au cours du temps. Nous reportons à la Figure II. 12, l'écart-type σy_c (x) de la position du centre du jet y_c obtenu avec un cœur contenant 150 mM de chlorure de sodium et d'acide acétique et d'eau milliQ et une coque constituée d'alginate à 1.8%m. Nous remarquons qu'en présence des deux types d'ions, les valeurs de σ(x) sont relativement élevées. Cependant nous notons une différence sur l'amplitude des fluctuations entre les ions. Le diamètre du jet est approximativement de 200 µm et les valeurs de σ(x) atteignent des valeurs de l'ordre du diamètre et 50 % du diamètre en présence d'ion sodium et de proton respectivement. Ainsi selon la nature de l'ion, l'amplitude de l'instabilité primaire est différente.

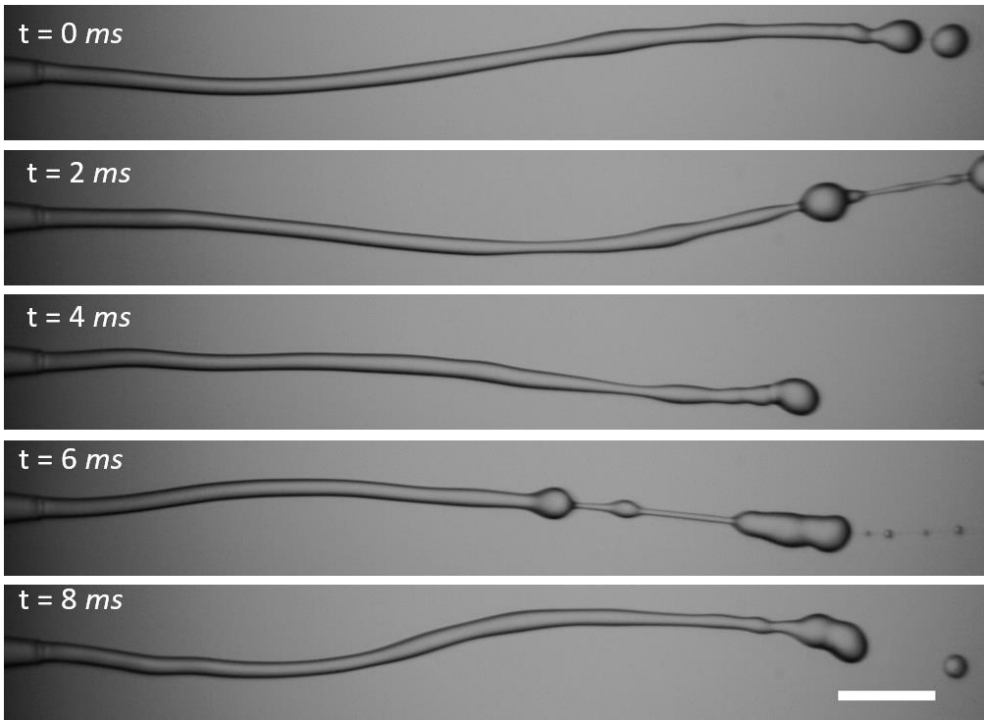

Figure II. 10 : Battement d'un jet composé d'un cœur d'eau contenant 150 mM NaCl et d'une coque constituée d'une solution d'alginate à 1,8 %m. Diamètre de l'injecteur = 200 µm ; Q_{tot} = 180 ; Rq = 4. La barre d'échelle est de 1 mm.

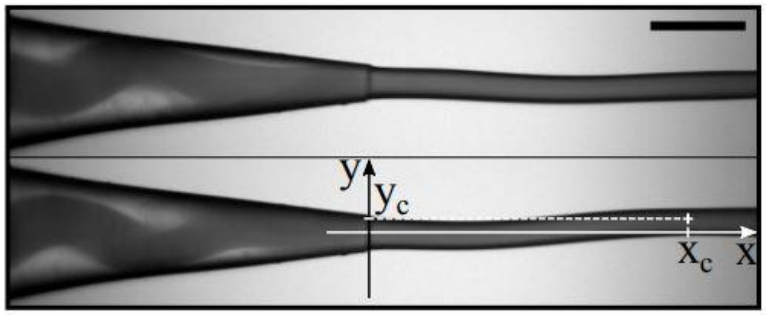

Figure II. 11 : Image illustrant le battement du jet composé tout au long de l'axe et la position du centre du jet. Le cœur du jet composé contient 75 mM de chlorure de sodium. Pour mieux discerner le fluide de cœur de celui de la coque, le fluide de cœur a été coloré. La barre d'échelle est de 500 µm. Image issue de Doméjean *et al.*,[79]

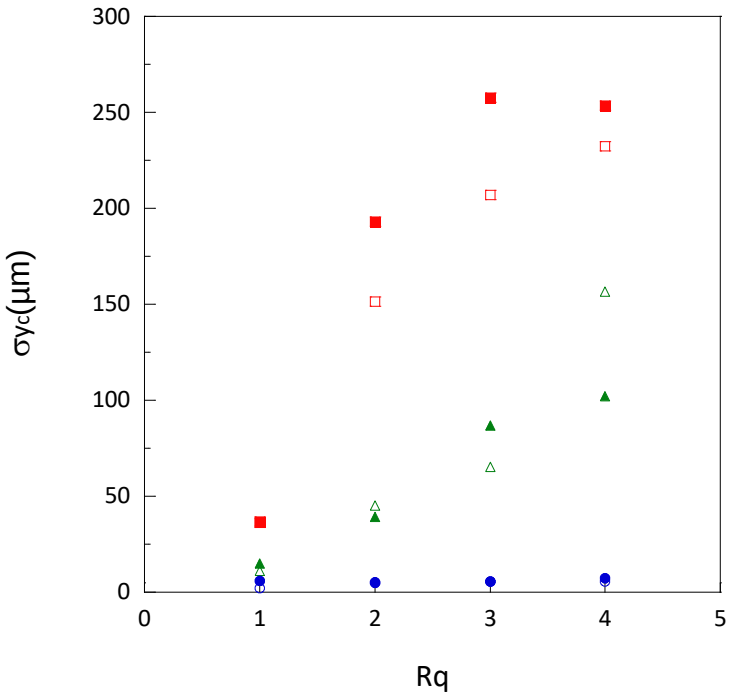

Figure II. 12 : Quantification du battement du jet composé. Mesure des fluctuations transversales de la position centrale du jet σ_{yc} en fonction du ratio de débits entre le cœur et la coque pour différentes compositions du fluide de cœur. Cœur : ○ eau, △ eau avec 150 mM CH_3COOH et □ eau avec 150 Mm NaCl. Les symboles vides et solides correspondent respectivement aux Qtot = 160 $mL.h^{-1}$ et Q = 180 $mL.h^{-1}$.

Il est primordial de limiter ce battement car cette instabilité diminue l'efficacité d'encapsulation. En effet, l'épaisseur de la couche d'alginate est alors inhomogène et peut se rompre lors de l'impact dans le bain de gélification.

Au cours de sa thèse, Doméjean a montré que l'ajout de HEC dans le cœur permettait de retrouver un co-écoulement stable toujours en présence de NaCl.

Afin de limiter cette instabilité exacerbée par la présence de sel, une autre approche a été envisagée. L'ajout d'un fluide intermédiaire de charge nulle pourrait écranter les interactions entre les ions contenus dans le cœur et l'alginate de la coque. Pour évaluer l'effet de l'ajout de ce fluide intermédiaire, nous nous proposons de quantifier les fluctuations transversales σ_{yc} en fonction du rapport des débits entre le fluide de cœur et intermédiaire. Le débit du fluide de coque est maintenu constant pour chaque condition. Les mesures sont reportées à la Figure II. 13. Nous remarquons que l'écart type σ_{yc} diminue à mesure que l'on augmente le rapport de débits entre le fluide IML et le fluide de cœur jusqu'à un rapport de débits critique

approximatif de 0,2 à partir duquel l'écart type devient constant. A ce rapport de débits, la distance entre le fluide de cœur et de coque qui correspond à l'épaisseur de la couche d'IML devient alors plus grande que la distance de la diffusion des ions. Cette distance de diffusion dépend de la position de l'interface des fluides qui, elle, dépend du rapport des débits et des propriétés viscoélastiques des fluides.

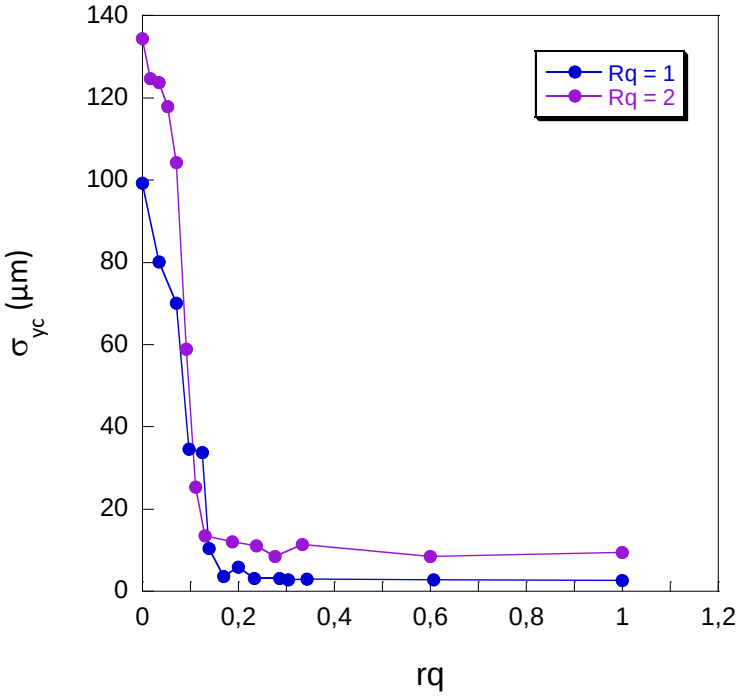

Figure II. 13 : Mesures de l'écart-type σ_{yc} de la position du centre du jet en fonction du ratio de débits entre l'IML et le cœur du jet composé pour deux rapports de débits Rq = 1 et Rq = 2. Le débit total est constant Qtot = 180 mL/h.

Une fois le jet établi, celui-ci se fragmente en gouttes *via* une instabilité capillaire. Le mécanisme physique sous-jacent à la formation de gouttes sera décrit dans la section qui suit. Afin de contrôler la fragmentation du jet composé, nous imposons une excitation harmonique à l'aide d'un actuateur piezoélectrique (P-820.10 du fournisseur PI). D'autres moyens d'excitation énoncés au chapitre I existent.

II.2.1.2 Fragmentation d'un jet composé

Dans le cas de l'atomisation, la création d'une surface libre δS à l'interface liquide / air a une tension de surface notée Υ et un coût énergétique de δS x Υ. La formation d'un cylindre liquide par effet

inertiel constitue un état thermodynamiquement instable. Celui-ci se fragmente spontanément afin de minimiser la surface et ainsi abaisser son énergie de surface. La tension de surface est donc le moteur de l'instabilité.

Pour un volume de fluide donné, la surface interfaciale est moindre pour un ensemble de gouttes sphériques de rayon r que pour un cylindre de rayon R, plus précisément le rapport des surfaces est :

$$\frac{Aire\ des\ gouttes}{Aire\ du\ cylindre} = \frac{3R}{2r} \qquad \text{(II. 2)}$$

Ainsi le rapport des surfaces est d'autant plus faible que les gouttes formées sont plus grosses (et donc moins nombreuses) : la minimisation de l'aire interfaciale doit conduire à des gouttes les plus gros possibles. L'instabilité correspond à la transition vers un état de moindre énergie interfaciale.

La taille des gouttes est liée la longueur d'onde de l'instabilité qui se propage à la surface du jet. Toute perturbation de longueur d'onde supérieure à une longueur d'onde critique $\lambda_{cr} = 2\pi R$ est instable car elle entraine une réduction de la surface du jet.

L'existence d'une tension de surface Υ entre le jet et l'air crée un saut de pression ΔP de part et d'autre de l'interface du jet. Les zones de constriction du jet, les nœuds, sont en surpression alors que les ventres sont en dépression. Si l'on raisonne en termes de courbure de l'interface du jet, ce gradient de pression s'exprime sous la forme :

$$\Delta P = P_{int} - P_0 = \gamma C \qquad \text{(II. 3)}$$

Où P_{int} la pression à l'intérieur du jet, P_0 la pression atmosphérique et C la courbure de l'interface du jet.

Les pressions aux points A et B des nœuds et des ventres respectivement sont déterminées à partir des courbures axiales et orthoradiales dont les équations sont les suivantes :

$$C_A = \alpha \left(\frac{2\,\pi}{\lambda}\right)^2 + \frac{1}{R + \alpha} \qquad \text{(II. 4)}$$

et

$$P_{int}^{A} = P_0 + \gamma . C_A \qquad \text{(II. 5)}$$

$$C_B = -\alpha \left(\frac{2\,\pi}{\lambda}\right)^2 + \frac{1}{R - \alpha} \qquad \text{(II. 6)}$$

et

$$P_{int}^{B} = P_0 + \gamma . C_B \qquad \text{(II. 7)}$$

L'expression devient :

$$P_{int}^{B} - P_{int}^{A} = -2\gamma . \frac{4\pi\alpha}{\lambda^2} + \gamma . \frac{2\alpha}{R^2 - \alpha^2} \qquad \text{(II. 8)}$$

Où α représente l'amplitude de la perturbation du rayon du jet.

La perturbation est qualifiée d'instable si elle peut s'amplifier, générant un écoulement des nœuds vers les ventres (Figure II. 14), autrement dit si $P^B > P^A$ et donc si $\lambda > 2\pi r$.

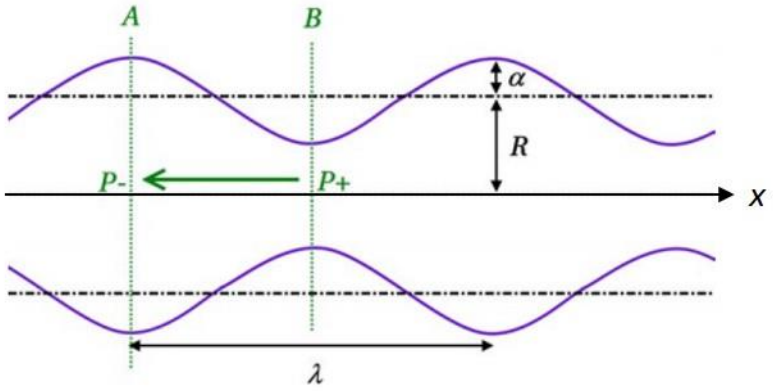

Figure II. 14 : Perturbation de longueur d'onde λ et d'amplitude α à la surface d'un jet cylindrique de rayon R. La flèche verte représente l'écoulement généré par le gradient de pression.[85]

Cependant toutes les longueurs d'onde ne se développent pas à la même vitesse et il existe une longueur d'onde optimale, repérée par Savart, qui est celle associée à la vitesse la plus élevée.

L'analyse temporelle réalisée par Rayleigh consiste à étudier la stabilité du jet soumis à des perturbations infinitésimales périodiques du rayon du jet de pulsation ω associée à un nombre d'onde *k* et d'amplitude α :

$$\alpha = \alpha_0 \, e^{-i\omega(k)t} \cos(kx) \qquad \text{(II. 9)}$$

Où α_0 est l'amplitude initiale de la perturbation

Cette analyse permet de calculer la valeur du taux de croissance *Im(ω)* associée à chaque nombre d'onde. La Figure II. 15 illustre une courbe de dispersion pour un jet d'eau. Sur cette courbe, sont reportés les taux de croissance associés au nombre d'onde *k.*

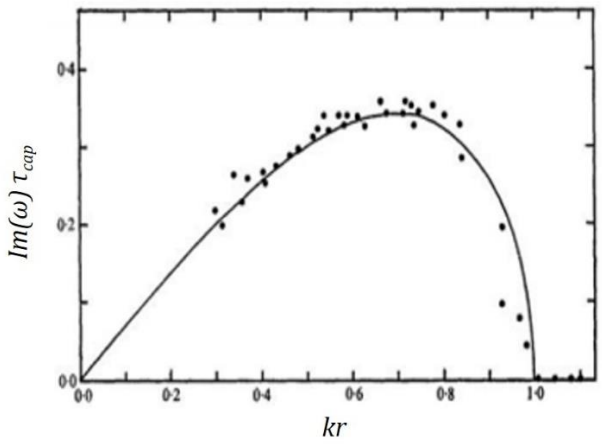

Figure II. 15 : Courbe de dispersion obtenue par l'analyse temporelle de Rayleigh pour un jet d'eau. La ligne représente la courbe théorique et les points sont les mesures expérimentales réalisées par Goedde et Yuen.

La prise en compte de la viscosité des fluides fait intervenir le nombre d'Ohnesorge noté *Oh*. Celui-ci rend compte de la compétition entre les forces visqueuses et les forces capillaires.

$$Oh = \frac{\eta}{\sqrt{\rho \gamma R}} \qquad \text{(II. 10)}$$

Les courbes de dispersion sont reportées à la Figure II. 16 pour différents nombres de *Oh.* Par ces courbes nous déduisons que l'augmentation de la viscosité du fluide engendre une diminution du taux de croissance et du nombre d'onde optimal. Par conséquent l'instabilité est amortie.

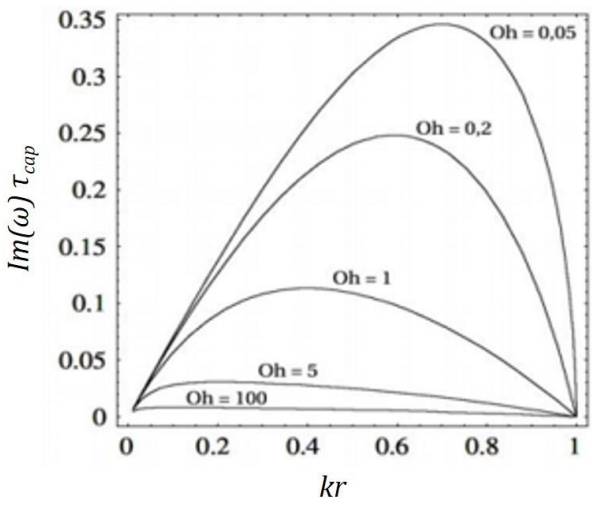

Figure II. 16 Courbes de dispersion théoriques obtenue par l'analyse linéaire temporelle pour différentes viscosités de fluides caractérisés par le nombre de *Oh*.

Dans le cas d'une fragmentation d'un jet non contrôlé, plusieurs longueurs d'onde se développent entrainant des évènements de coalescence au sein du jet et qui aboutissent à la formation de gouttes polydisperses (Figure II. 17 a). L'émission d'une perturbation harmonique à l'aide d'un actuateur piézoélectrique permet de sélectionner une longueur d'onde permettant alors d'obtenir des gouttes monodisperses (Figure II. 17 b). Cependant malgré le contrôle de ces perturbations, des évènements de coalescence sont observés au sein de la fragmentation (Figure II. 17 c) du jet ou encore après celle-ci (Figure II. 17 d). Ces évènements de coalescence sont dus à l'instabilité capillaire où les forces capillaires et visqueuses amplifient les fluctuations de vitesse du jet. Celles-ci sont induites par l'interface instable d'un co-écoulement constitué de deux fluides aux propriétés viscoélastiques différentes.

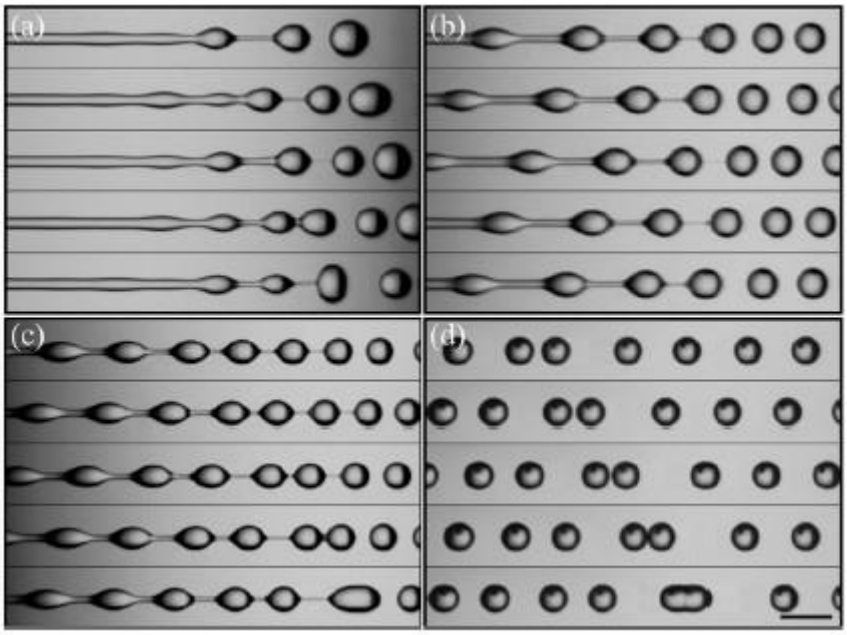

Figure II. 17 : Séquences temporelles montrant la fragmentation d'un jet libre (a), la fragmentation régulière d'un jet sous perturbation harmonique (b), des évènements de coalescence au sein du jet (c) et dans l'air (d) dues à des fluctuations de vitesse du jet composé menant à la formation de gouttes polydisperses. L'intervalle de temps entre deux séquences consécutives est de 1 ms et la barre d'échelle est de 1 mm. Image issue de Doméjean *et al.*,[79]

Doméjean[86] a montré que ces fluctuations de vitesse sont atténuées lorsque le nombre de Weber, We est supérieur à 10. Ce nombre adimensionnel correspond au rapport entre les effets inertiels et la tension superficielle. Il dépend du rapport de débits des fluides et de leurs propriétés viscoélastiques.

Pour limiter ce phénomène de coalescence, les conditions de débits des fluides utilisés et de l'actuation doivent être ajustées. L'optimisation de ces paramètres pourra alors conduire à la formation de gouttes monodisperses. Celles-ci sont collectées dans un bain de calcium à une concentration massique de 1%. Comme nous l'avions énoncé précédemment, ces cations divalents induisent la transition sol-gel de la solution d'alginate et ainsi la formation de capsules. L'ajout de tensioactif dans la solution d'alginate et le bain de calcium (SDS et Tween 20 respectivement) permet de préserver l'intégrité de la coque d'alginate lors de la pénétration des gouttes dans le bain.

II.2.2 Méthodes physico-chimiques de caractérisation

II.2.2.1 Spectroscopie UV-Visible

La spectroscopie UV-visible correspond à l'interaction entre la matière et le rayonnement UV-visible. Elle est utilisée pour mesurer l'absorbance de la lumière par l'échantillon à une longueur d'onde fixe ou sur une gamme de longueur d'onde. L'absorbance est liée à la capacité d'un échantillon à absorber un rayonnement.

A longueur d'onde fixe, l'intensité de la lumière traversant l'échantillon est mesurée. D'après la loi de Lambert, l'absorbance de l'échantillon est liée à I_t, l'intensité de la lumière transmise à travers l'échantillon et I_0 l'intensité de lumière incidente et s'écrit :

$$A = \log\frac{I_0}{I_t} \qquad \text{(II. 11)}$$

D'après la loi de Beer- Lambert, pour des solutions diluées, l'équation de l'absorbance *A* s'écrit :

$$A = \varepsilon\, c\, l \qquad \text{(II. 12)}$$

où

ε est le coefficient d'extinction ($mL.mg^{-1}.cm^{-1}$)

l est le chemin optique qui correspond aux dimension de la cuvette (cm)

et *c* la concentration de la solution ($mg.mL^{-1}$)

L'absorbance est donc proportionnelle à la concentration du soluté dans la solution, ce qui permet de mesurer la concentration d'un échantillon après calibration.

Toutes les mesures présentées dans ces travaux ont été réalisées à l'aide du spectrophotomètre Jasco V-760. Des cuves en quartz de 1 mm et 1 cm de trajet optique ont été utilisées pour réaliser les mesures avec des volumes respectifs de 350 µl et 1,2mL. Une cellule Jasco HMC-711 thermostatée par circulation d'eau est utilisée afin d'ajuster la température de mesure.

Avant chaque mesure d'absorbance de l'échantillon, la baseline, effectuée en absence de cuve, est mesurée. Par la suite une mesure d'absorbance du solvant est réalisée et constitue la mesure de référence.

La spectroscopie a été utilisée pour deux études.

La première consiste à déterminer la concentration de collagène dans l'échantillon après avoir établi une courbe de calibration. Un spectre d'absorption a d'abord été réalisé pour déterminer la longueur d'onde d'absorption maximale de la molécule de collagène. Au spectre de la Figure II. 18 a, deux pics de différentes d'intensités sont détectés. A λ = 267 nm l'absorbance est maximale. Ce signal correspond à la présence de collagène sous forme de monomères. Ainsi, nous avons établi la courbe de calibration à la Figure II. 18 b. Un deuxième pic aux longueurs d'onde au-dessus de 300 nm et d'intensité au moins 6 fois moins importante correspond cette fois à la présence d'oligomères de taille suffisamment importante pour diffuser la lumière. Aux longueurs d'onde au-delà de 300 nm, la courbe de mesure d'absorbance s'ajuste à la loi de forme, $k\,\lambda^{-n}$ où k et n sont des constantes d'ajustement.[87]

La deuxième étude consiste à suivre l'agrégation du collagène par mesure de turbidité des échantillons au cours du temps. Cette méthode est largement utilisée pour étudier la formation des fibrilles de collagène. En réalisant des spectres d'absorption d'une solution de collagène concentrée à $1 mg.mL^{-1}$, à pH neutre et à 20°C au cours du temps à intervalle régulier (Figure II. 19 a), nous observons le phénomène de diffusion de la lumière des agrégats de collagène à des longueurs d'onde au-delà de 300 nm. Compte tenu, de ces spectres, nous décidons de suivre l'agrégation du collagène à la longueur d'onde de 340 nm.

Une courbe sigmoïdale caractéristique de l'agrégation est illustrée à la Figure II. 19b. Elle présente trois phases.

Une ***phase de latence***, où aucune variation d'absorbance n'est détectée. Un temps de latence est caractéristique de cette phase.

Une ***phase de croissance***, où l'absorbance varie de façon exponentielle.

Une ***phase plateau*** où l'absorbance est maintenue à une valeur constante. Cette phase est caractérisée par l'absorbance finale notée A_e et la constante de temps $t_{1/2}$ correspondant au temps à laquelle l'absorbance est à la moitié de sa valeur finale.[88]

La cinétique d'agrégation du collagène peut être exprimée par l'équation suivante :

$$\frac{dA_t}{dt} = k\,(A_e - A_t)^n \qquad \text{(II. 13)}$$

Où A_t correspond à la mesure d'absorbance à temps *t*, A_e l'absorbance à l'état d'équilibre, *k* la constante cinétique et *n* l'ordre de réaction.

Pour simplifier le modèle, nous admettons que l'agrégation du collagène obéit à la loi de premier ordre. Ainsi l'équation (II. 13) peut s'écrire :

$$-\ln\ (A_e - A_t) = kt + c \qquad \text{(II. 14)}$$

A $t = 0$, on a $A_t = A_0$. A partir de l'équation (II. 13) on peut écrire :

$$c = -\ln(A_e - A_0) \qquad \text{(II. 15)}$$

En combinant l'équation (II. 14) et l'équation (II. 15), on obtient :

$$-\ln\frac{A_e - A_t}{A_e - A_0} = kt \qquad \text{(II. 16)}$$

En traçant $\ln\frac{A_e - A_t}{A_e - A_0}$ en fonction du temps *t*, on peut calculer la constante *k*.

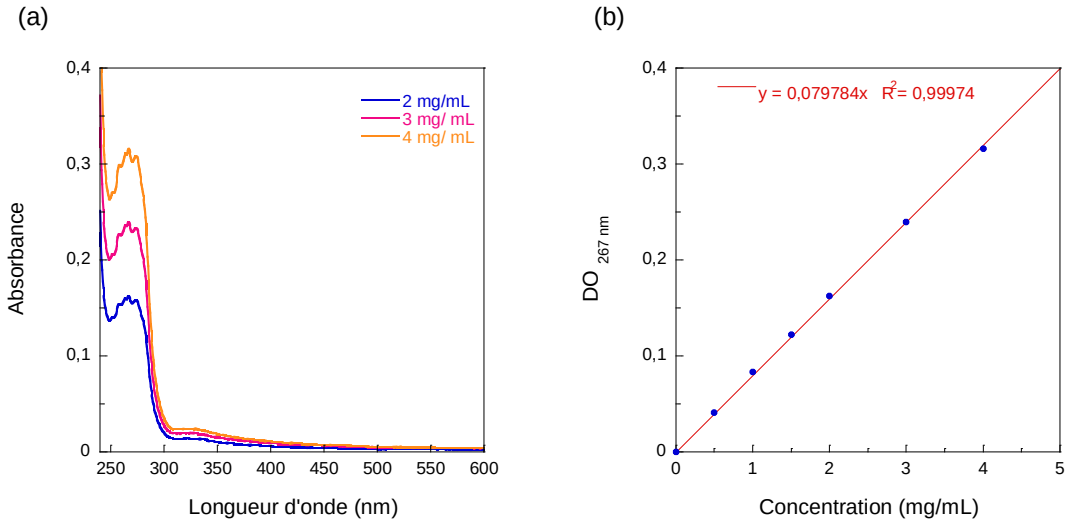

Figure II. 18 : (a) Spectre d'absorbance d'une solution de collagène en conditions acide (20 mM acide acétique) à différentes concentrations et (b) courbe de calibration du collagène. Mesure d'absorbance à λ = 267 nm à différentes concentrations.

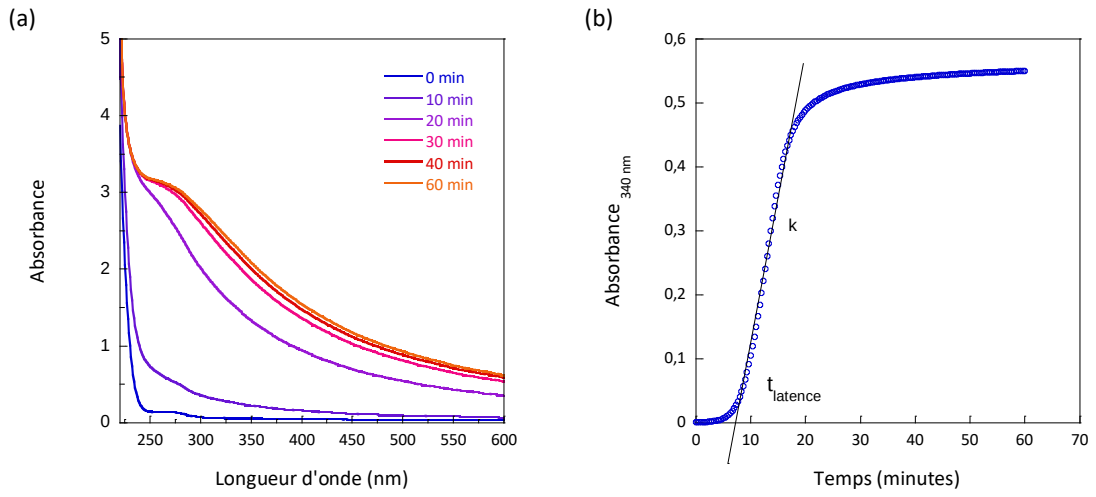

Figure II. 19 : (a) Spectres d'absorption d'une solution de collagène. Conditions : 1mg.mL^{-1}, pH neutre et à 20°C. (b) Une Courbe sigmoïdale caractérise l'agrégation du collagène. Conditions : 2mg.mL^{-1}, pH neutre et à 20°C

II.2.2.2 Rhéologie

Théorie

La rhéologie étudie le comportement mécanique des matériaux sous écoulement. Un rhéomètre mesure les propriétés rhéologiques des fluides en fonction d'un taux ou d'une fréquence de déformation. Il existe deux types d'écoulement de fluides en rhéologie : l'écoulement par cisaillement (celui étudié dans cette thèse) et par extension. Par cisaillement, l'échantillon est confiné entre deux plans parallèles séparés d'une distance *h*. Une force tangentielle est appliquée à l'un des deux plans qui le déplace d'une distance *x*. Par la suite nous allons rappeler certaines grandeurs de bases en rhéologie (Figure II. 20).

- Contrainte de cisaillement σ correspond à la force *F* exercée par un matériau en écoulement sur une surface *S* dans une direction parallèle à l'écoulement.

$$\sigma = \frac{dF}{dS} \tag{II. 17}$$

- Déformation γ réfère à la déformation relative du matériau.

$$\gamma = \frac{x}{h} \tag{II. 18}$$

- Gradient de cisaillement est le rapport entre la vélocité *V* du plan en mouvement et la distance qui sépare les plans *h.*

$$\gamma = \frac{V}{h} \tag{II. 19}$$

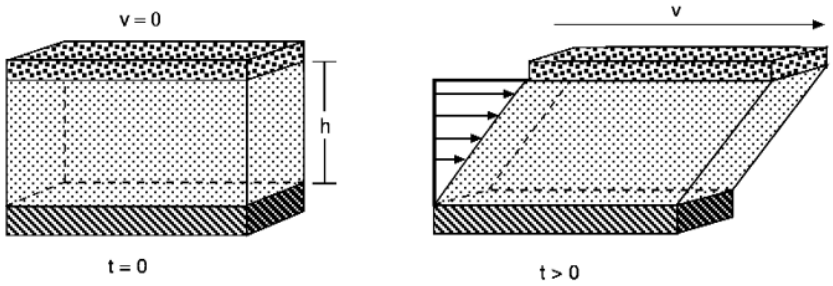

Figure II. 20 : Cisaillement d'un fluide entre deux plans parallèles séparés d'une distance h. Au temps t = 0, le système est au repos, au temps t > 0 plan du haut est déplacé d'une distance x. Image issue de Khan *et al.,* [89].

- Pour un solide de Hooke *σ = G γ avec G le module de cisaillement.*

  Pour un fluide visqueux $\sigma = \eta\ \dot{\gamma}$ avec η la viscosité de cisaillement. Pour un fluide Newtonien, η est indépendant du taux de cisaillement. Pour un fluide complexe, la viscosité varie avec le taux de cisaillement. Lorsque η diminue en augmentant le taux cisaillement, le fluide est qualifié de rhéofluidifiant. Inversement lorsque la viscosité augmente en augmentant le taux de cisaillement, le fluide est qualifié de rhéo-épaississant.[90]
- Pour les fluides viscoélastiques, les caractéristiques sont partagées entre les solides de Hooke et les fluides visqueux.

Méthodes de mesures rhéologiques

Seules les deux méthodes de mesure utilisées seront décrites dans cette section.

- Mesure en écoulement permanent : Au cours de ce test, un taux de cisaillement est appliqué à l'échantillon et la contrainte de cisaillement est mesurée ou inversement, tout dépend du type de rhéomètre. Dans notre cas, il s'agit d'un rhéomètre qui applique une contrainte de cisaillement (*stress controlled rheometer*). A l'issu de ce test, la viscosité de cisaillement peut être déduite grâce à la relation :

$$\eta = \frac{\sigma}{\dot{\gamma}} \qquad \text{(II. 20)}$$

- Mesure dynamique en oscillation : Au cours de ce test, une déformation sinusoïdale est appliquée au fluide $\gamma = \gamma_0\ sin(\omega t)$ (Figure II. 21).

où γ_0 est l'amplitude de déformation et ω la fréquence d'oscillation. La Figure II. 21 illustre l'écoulement par déformation oscillatoire.

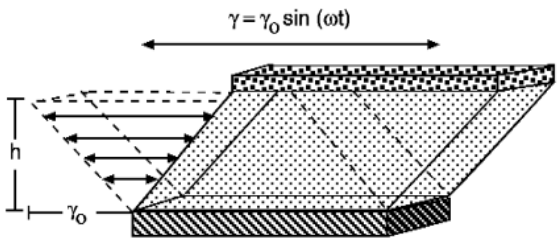

Figure II. 21 : Cisaillement par oscillation d'un fluide entre deux plans parallèles séparés d'une distance h. Le plan supérieur se déplace de façon sinusoïdale avec une amplitude de déformation maximale γ_0. Image issue de Khan *et al.*,[89]

En régime linéaire, la contrainte générée est également sinusoïdale et s'écrit :

$$\sigma = \sigma_0 \, sin(\omega t + \delta) \tag{II. 21}$$

En utilisant les identités trigonométriques, la contrainte peut être décomposée en deux éléments :

$$\sigma = \sigma_0 \, [\cos(\delta) \, sin(\omega t) + sin(\delta) \, cos(\omega t)] \tag{II. 22}$$

Cette équation peut être exprimée en termes des modules complexes G' et G'' :

$$\sigma = \gamma_0 \, [G' \, sin(\omega t) + G'' \, cos(\omega t)] \tag{II. 23}$$

où le module élastique est :

$$G' = \frac{\sigma_0}{\gamma_0} \, cos(\delta) \tag{II. 24}$$

et le module visqueux est :

$$G'' = \frac{\sigma_0}{\gamma_0} \, sin(\delta) \tag{II. 25}$$

Les modules élastique G' et visqueux G'' sont respectivement en phase avec la déformation imposée $\gamma = \gamma_0 \sin(\omega t)$ et avec le gradient de cisaillement $\dot{\gamma} = \gamma_0 \, sin(\omega t)$. Ils nous informent sur les propriétés

élastiques et visqueuses du matériau et représentent l'énergie de stockage et l'énergie de dissipation respectivement. Le module complexe G* est défini comme :

$$G^* = G' + iG'' \quad \text{(II. 26)}$$

Où $i = \sqrt{-1}$. La valeur absolue de G* est donné :

$$|G^*| = \sqrt{G'^2 + G''^2} \quad \text{(II. 27)}$$

Les deux tests en oscillation utilisés sont :

- Test dynamique balayage en stress (*dynamic stress sweep test*) : nous mesurons les modules élastiques et visqueux sur un intervalle de contrainte de cisaillement σ à une fréquence donnée. Ce test permet d'établir la gamme de linéarité viscoélastique en termes de stress de l'échantillon. Dans ce régime linéaire les modules *G'* et *G''* ne dépendent pas de la contrainte appliquée.

- Test dynamique balayage en fréquence (*dynamic frequency sweep test*) : les modules rhéologiques sont mesurés sur une gamme de fréquence à une contrainte de cisaillement du régime de linéarité viscoélastique. Ce test nous informe sur le comportement du matériau à différents temps.

Les mesures ont été réalisées sur le rhéomètre AR-G2. La géométrie utilisée est un cône-plan avec un diamètre de 60 mm, un angle de 2° et un gap de 55 µm. Les mesures sont contrôlées en température grâce au peltier et réalisées à 20 °C. Après avoir déposé l'échantillon, de l'eau ultra pure milliQ est placée sur la géométrie prévue à cet effet et recouvert par un couvercle pour éviter toute évaporation au cours de la mesure.

L'alginate de référence Protanal LF 200FTS est principalement utilisée comme solution de coque dans le procédé de formation des capsules. Cette solution est préparée à une concentration massique de 1.8 %. Les courbes d'écoulement à l'équilibre des solutions d'alginate à différentes concentrations sont représentées à la Figure II. 22. Ces courbes illustrent le comportement rhéofluidifiant de la solution. A faible cisaillement, la viscosité est constante puis décroit avec l'augmentation du gradient de cisaillement. Les courbes ont été ajustées avec le modèle de Carreau-Yasuda.

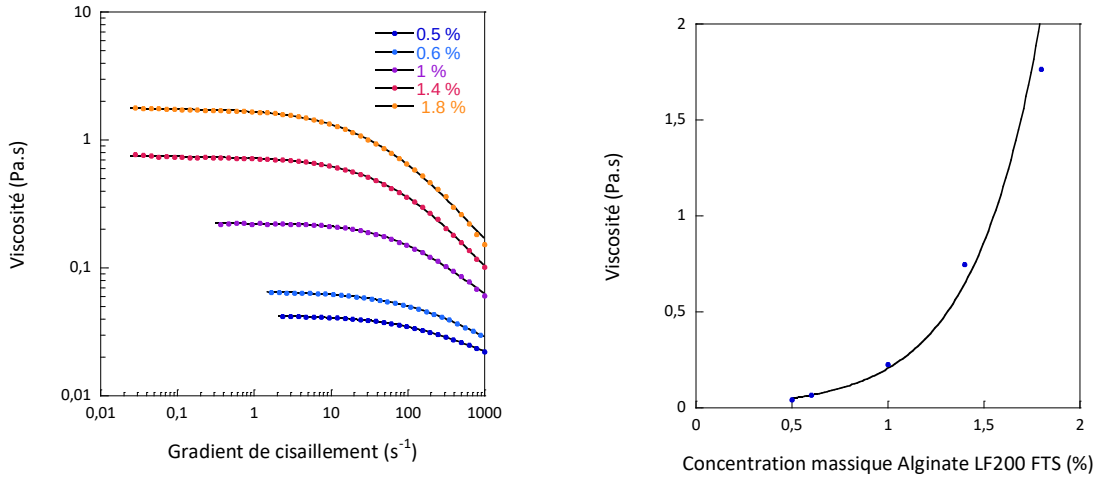

Figure II. 22 : (a) Courbes d'écoulement des solutions d'alginate LF200FTS à différentes concentrations. Les courbes en noire correspondent aux courbes d'ajustement réalisées avec le modèle de Carreau-Yasuda. (b) Mesures des viscosités à faible cisaillement en fonction de la concentration massique d'alginate. Les mesures sont réalisées à 20°C.

Les mesures des modules élastiques et visqueux ainsi que la viscosité complexe en fonction de la fréquence d'oscillation sont reportées à la Figure II. 23. Cette représentation correspond au spectre mécanique du matériau et informe sur la microstructure de celui-ci. Sur toute la gamme de fréquence balayée, le module visqueux est supérieur au module élastique (G'' > G'). Ceci signifie que le matériau a un caractère visqueux dominant. Cependant nous parvenons à mesurer un module élastique significatif. La solution d'alginate LF200FTS est donc qualifiée de fluide viscoélastique.

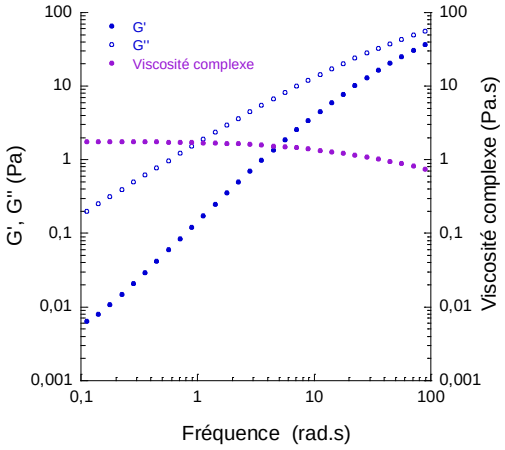

Figure II. 23 : Modules élastique (G'), visqueux (G'') et viscosité complexe d'une solution d'alginate LF200FTS à une concentration massique de 1.8 %.

La HEC, quant à elle est principalement utilisée comme fluide de cœur. Une solution à une concentration massique de 0,6% est préparée pour ensuite pouvoir diluer la solution de collagène à une concentration de 2 mg/mL.

Des mesures de viscosités à faibles cisaillements de HEC en fonction de la concentration sont reportées à la Figure II. 24. Nous remarquons que la pasteurisation diminue légèrement la viscosité de la solution à des concentrations relativement élevées. Par exemple à une concentration de 0,6 % la viscosité varie de 1,12 Pa.s à 0,95 Pa.s soit une diminution de 15%.

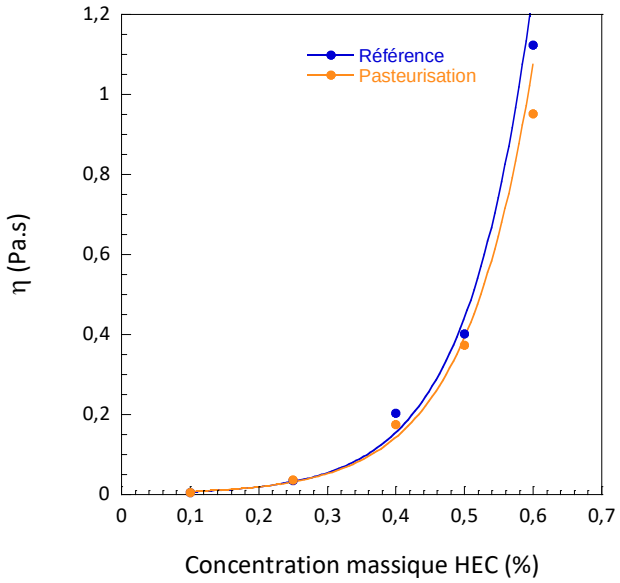

Figure II. 24 : Mesures de la viscosité à faibles cisaillements en fonction de la concentration massique en HEC. La condition Référence correspond à la solution d'alginate n'ayant pas subi le traitement thermique de pasteurisation.

Concernant la solution de collagène, des mesures de viscosité ont été réalisé à faible cisaillement (jusqu'à 100 s^{-1}). Nous déterminons une viscosité de 10 mPa.s pour une concentration de 2mg/mL filtrée à 5 µm.

II.2.2.3 Marquage par fluorescence

Pour visualiser le réseau fibrillaire de collagène au sein des capsules, celui-ci peut être marqué par fluorescence. Pour cela, nous avons utilisé la carboxytétraméthylrhodamine (TAMRA). La réaction de marquage est produite entre les groupements fonctionnels ester de la rhodamine et amine de la protéine

de collagène, à pH 7,4. Un protocole de marquage du collagène sous forme d'hydrogel au sein des capsules a alors été mis en place :

Une solution mère de TAMRA à 10 mg/mL est préparée dans le solvant diméthylsulfoxyde (référence 276855, Sigma Aldrich), aliquotée et stockée à -20°C. Pour marquer approximativement 500 µL de collagène contenu dans un milieu de culture de 20 mL, nous ajoutons 5 µl de cette solution de TAMRA préalablement préparée soit à une concentration finale de 2,5µg/mL.

Cette réaction est réalisée après gélification du collagène pour ne pas perturber celle-ci. Une étape de lavage des capsules est réalisée pour permettre la diffusion de la quantité de rhodamine libre en excès à travers la membrane d'alginate qui constitue une membrane de dialyse.

III. Ecoulement et encapsulation de suspensions denses

Dans le cadre d'une encapsulation cellulaire, nous avons vu au chapitre précédent que l'utilisation de matériel biologique a nécessité l'adaptation du dispositif expérimental d'encapsulation par la mise en place d'un système d'injection séquentiel. Ce système permet de réduire considérablement le volume des échantillons à quelques centaines de microlitres tout en assurant des débits élevés de l'ordre de la centaine de mL/h. Cette stratégie adoptée s'accompagne du phénomène de dispersion convective, dite de Taylor[91] qui résulte en un gradient longitudinal de concentration des particules. La première partie de ce chapitre est donc consacrée à l'étude de la dispersion convective de ces particules au sein d'un écoulement dans un tube.

Par ailleurs parmi les types cellulaires, certains ne prolifèrent pas. Il est donc nécessaire d'encapsuler les cellules à des concentrations relativement élevées pour former un sphéroïde de taille fonctionnelle. Or, nous avons observé qu'à ces concentrations les capsules formées sont polydisperses. La seconde partie de ce chapitre sera dédiée à déterminer l'origine de cette polydispersité et à présenter quelques stratégies visant à atténuer les instabilités sous-jacentes.

III.1 Dispersion convective dans un écoulement segmenté

Convective dispersion of particles in a segmented flow

Wafa Bouhlel,[1, 2] Jérôme Bibette,[1] and Nicolas Bremond[1],

[1]*Laboratoire Colloïdes et Matériaux Divisés,*

CNRS, Chemistry Biology & Innovation,

ESPCI Paris, PSL Research University,

10 rue Vauquelin, F-75005 Paris, France

[2]*Sorbonne University, 4 place Jussieu 75005 Paris, France*

(Dated : October 11, 2018)

Convective dispersion of solutes is inherent to flow in channels because of the non-uniformity of the velocity profile. When diffusion is negligible, for large particles for example, the trajectory of particles can be solely described by a kinematic approach. Here, we investigate such a phenomenon for micrometer size beads flowing in a circular pipe. We show that the presence of large bubbles, namely in the case of a segmented flow, either prevents the convective dispersion or leads to the accumulation of particles at the rear of bubbles. The destabilization of the initially homogeneous suspension occurs when liquid inertia comes into play. Indeed, for moderate Reynolds number of the particles, particles move away from the wall, thus exploring different flow lines that finally impact the axial dispersion features. Moreover, since the bubbles impose an axial boundary condition of the mean velocity, a net flux of particles directed along the flow direction is built up. This work is motivated by the understanding of the flow behavior of biological samples, and especially in the context of cell encapsulation.

III.1.1 Introduction

Flow of particle suspensions in channels is encountered in many situations from natural systems, such as blood flow, to engineering processes like in food, pharmaceutical or biotechnology industries. Such a flow exhibits peculiar behaviors depending on the properties of the particles, in terms of size, surface roughness and deformability, their concentration, and the suspending fluid properties along with the average velocity and channel features. A well studied phenomenon is the spatial redistribution of particles in confined flows due to lateral migration of particles [1, 2]. At a low Reynolds number, i.e. in the creeping flow approxima-tion, isolated rigid spheres follow streamlines as prescribed by the Stokes equation. However, this is not the case for concentrated suspension where collision between particles leads to a lateral migration of spheres from high shear region to low shear region, and thus from the wall to the channel center [3–5]. The lateral motion can be induced by the proximity of a rigid wall [6] or induced by irreversible collisions due to solid-solid contact enhanced by surface roughness [7–10]. For soft particles, like vesicles, cells or emulsion drops, that can be deformed under shear is enough, lateral migration is even observed at low Reynolds numbers for isolated particles [11] and enhanced during collision of particles [12]. In addition, non-newtonian properties of the suspending fluid can either induce lateral migration towards the centerline or the wall for particles flowing in a pipe [13–15].

For moderate Reynolds numbers, liquid inertia widens the force spectrum experienced by particles that are attracted towards preferential locations in confined flows. This phe-nomenon has been first reported for a cylindrical geometry where particles accumulate at approximatively half the distance between the wall and the tube's centrer [16, 17]. Since then, this effect has been the subject of numerous theoretical analysis [18–24] allowing to estimate the lift force encountered by particles in a shear flow, close or not to a wall, and the corresponding equilibrium position. Experiments have been undertaken at even larger Reynolds showing a good agreement with theoretical predictions, excepted for Reynolds numbers larger than 500 where particles tend to accumulate closer to the centerline [25].

This peculiar behavior of particles focusing in specific regions of channels has been recently exploited in microfluidic systems for cell ordering and sorting applications [26–31]. This strategy based on inertial microfluidics, where particles tend to self organized in train [32], is also relevant for cell encapsulation in emulsion droplets to overcome inherent statistical distribution of cell number at low

concentrations [33]. For other techniques of cell encapsulation relying on liquid atomization [34–36], that requires to involve liquid inertia for creating liquid jets [37], the flow features of suspended cells impact on the encapsulation process. Moreover, for such an encapsulation strategy, the ability to manipulate relatively small amount of biological samples, a few ml, is a key feature when handling precious sam-3ples. Since the process is a continuous one, that involves flow rates of the order of 100 ml/h, precious samples to be encapsulated should be injected in a sequential way into the main flow of the continuous phase, in a similar fashion as for chromatography. Convective dispersion that leads to longitudinal variation of solute concentration is then inevitably in action [38].

Here, we investigate the convective dispersion features of a suspension of neutrally buoy-ant microparticles flowing in a pipe at moderate Reynolds numbers and volume fractions. Adding long bubbles that bound the sample can in principle limit this concentration heterogeneity, as it is done in flow chemistry [39]. We thus study the features of suspensions in a segmented flow and observe a striking behavior when liquid inertia comes into play.

III.1.2 Materials and Methods

Two kind of particles having different size are used. The first ones are carbon nanotubes (CNT) labelled Graphistrengh C100 (Arkema). As previously described [40], carbon nan-otubes are dispersed in water at a concentration of 0.2 wt% by sonication in the presence of 0.1 wt% surfactants (Brij 35, Sigma Aldrich). The corresponding mean hydrodynamic diameter is 190 nm as measured by light scattering method (Nanosizer, Malvern). The second particles are polystyrene (PS) beads (Dynoseeds TS 20, Microbeads) having an average diameter d of 20 µm. They are also dispersed in water with the help of surfactants (Tween 20, Sigma Aldrich). In addition, the density of the aqueous phase is matched with the beads one by adding a non-ionic molecule (Nycodenz, Proteogneix). A stock suspension of beads at a volume fraction of 20 % is prepared by adding 0.1 wt% of Tween20 and 10 wt% of Nycodenz. All solutions are made by using ultra pure water (Milli-Q).

The experimental set-up is sketched in Figure 1 (a). The continuous phase is injected with a syringe pump (PhD Ultra, Harvard Apparatus) through a teflon tube having an inner diameter of 0.83 mm. The fluid either flows straight to the measurement area or passes through a parallel circuit where the sample is loaded. The direction is controlled by switching the closing state of two pinch valves (Bio-Chem Fluidics) located on each arms of such a loop. Teflon being a ductile material, a 2 cm long elastic tube made of

tygon is placed at the location of each pinch valve. The sample is loaded in a 40 cm long teflon tube and inserted into the derivation arm equipped with manual ono valves (Upchurch, Idex), thus avoiding fluid leakage when inserting the sample.

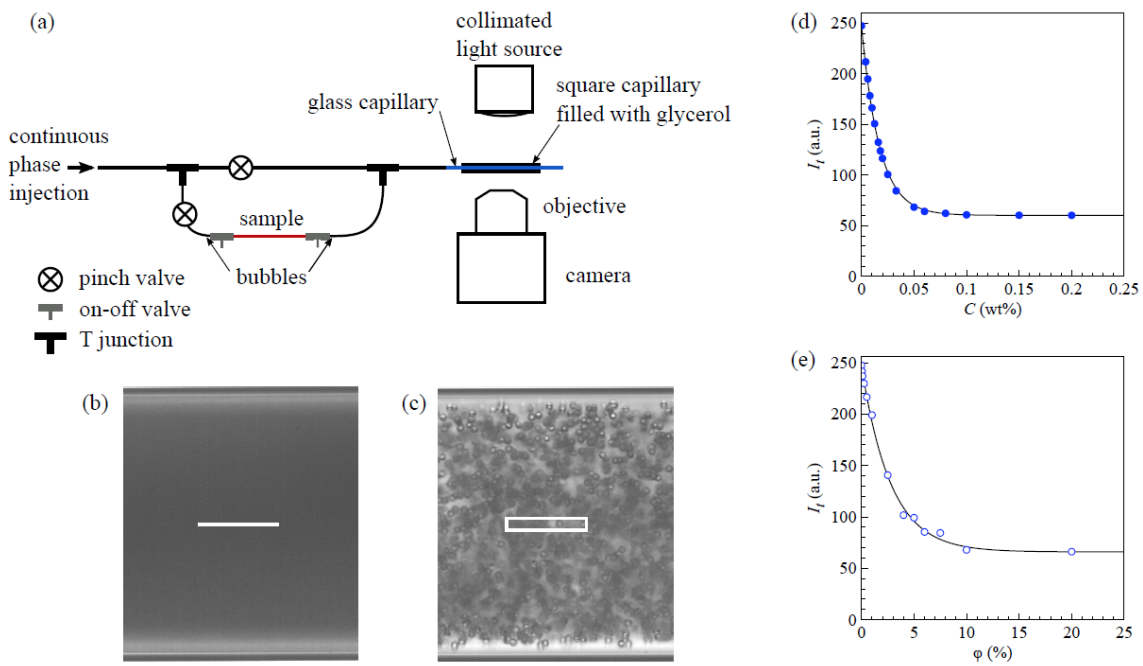

Figure 1:(a) Schematics of the experimental set-up. (b) Snapshot of CNT suspension flowing in the glass capillary. The white line shows the area from which the average transmitted light It is evaluated. (c) Snapshot of PS beads suspension flowing in the glass capillary. The white rectangle delimits the area from which It is measured. (d) Calibration curve of CNT suspension. (e) Calibration curve of PS beads suspension. The continuous lines represent Eq.1 from which the attenuation coefficient ε is estimated.

Air can be introduced in the main circuit just prior to the on-o valves before closing them. This allows to bound the sample with bubbles having a length larger than the tube diameter. The teflon tube after the second T junction is connected to a glass round capillary having a diameter of 0.78 mm (Vitrocom) with the help of a flexible tube. Since the diameter of the tube at the measurement location is smaller than the tube where the fluid is mostly flowing, the time is then multiplied by the square of the diameter ratio when compared to the theoretical prediction to respect mass conservation. The capillary is inserted in a square glass capillary (Vitrocom) filled with glycerol for limiting optical distortion introduced by the round capillary. The capillaries are glued on a glass plate and set on a transmitted light microscope (DMI3000, Leica). An objective with a 10x magnification is coupled to a camera (Fastcam 1024-PCI, Photron). Examples of the images recorded during experiments with both suspensions are shown in Figure 1(b) and (c). The system being not free of optical aberrations, the concentration of particles is determined

by measuring the transmitted light along the axis of the capillary averaged along a single pixel line of 100 pixels for CNT suspensions and within a rectangular box having the same length and a width of 14 pixels, about a bead diameter, in the case of beads suspensions. The calibration curve for CNT and micrometer beads are reported in Figure 1 (d) and (e), respectively. The transmitted light I_t follows a Beer-Lambert law

$$I_t = (I_0 - I_\infty)\, e^{-\varepsilon c} + I_\infty \qquad \text{Eq. 1}$$

Where ε is an attenuation coefficient, I_0 is the transmitted light without any particles, I_∞ the transmitted light when the concentration c of particles tends to infinity. Here, c is either a weight percentage (C) of the CNT or a volume fraction (ϕ) of the PS beads. ε is the only fit parameter, I_0 and I_∞ being directly deduced from the intensity measurements. The attenuation coefficient is equal to 59 per wt% for CNT and to 0.36 per % for PS beads.

III.1.3 Results and discussion

The dispersion of solutes in a Poiseuille flow has been first described by Taylor [38] and later on generalized by Aris [41]. When the diffusion of the solutes or particles is negligible, i.e. for large Péclet number $Pe = aU/D$ where a is the lateral channel size, U the mean solvent velocity and D the diffusion coefficient of the particles in the solvent, the convective dispersion features is solely ruled by kinematics. For a cylindrical geometry, the velocity profile is $u = u_m\,(1 - \frac{r^2}{a^2})$ where u_m is the maximal velocity reached at the center of the channel of radius a and r is the radial coordinate. A particle initially located at $\{z_0, r_0\}$ is then advected at a velocity $u\,(r_0)$. Its longitudinal location z at time t is thus simply $z = z_0 + u_m\left(1 - \frac{r_0^2}{a^2}\right)t$. The fluid fraction φ occupied by the sample at a distance $z = Li$, initially contained between $z = 0$ and $z = -L_S$, is then determined by the radial locations of the front interface of the sample $r_f\,(Li, t)$ and the back one $r_b(L_i + L_s, t)$. Indeed, ϕ is equal to $(r_f/a)^2 - (r_b\,/a)^2$ for a cylindrical geometry and to $r_f\,/a - r_b/a$ for a planar one. Due to optical deformation introduced by the curvature of the glass capillary of the present experimental set-up, the solutes concentration is measured in the middle of the capillary along its axis. In that case, the volume fraction estimation is similar to a planar case and is

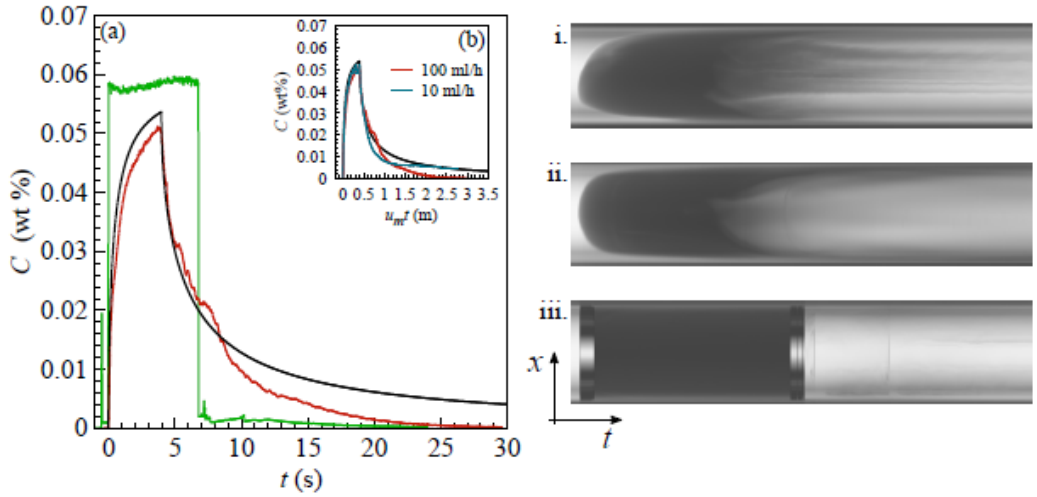

Figure 2: (Color online) (a) Time evolution of the concentration of a carbon nanotubes solution undergoing a convective dispersion at a flow rate of 100 ml/h in a capillary having a radius of 420 µm (-) along with the evolution predicted by Eq. 2 (-). The axial dispersion is almost cancelled out by adding a large bubble at each end of the sample (-). (b) Dispersion curves for two different flow rates and the theoretical one. The time is multiplied by the maximum velocity um. Corresponding spatio-temporal diagrams built along the transverse plan of the capillary for q = 100 ml/h (i), q = 10 ml/h (ii) and when bubbles are present at q = 100 ml/h (iii).

given by

$$\begin{aligned} t &< \frac{L_i}{u_m} & \Phi &= 0 \\ \frac{L_i}{u_m} \leq t &< \frac{L_i + L_s}{u_m} & \Phi &= \left(1 - \frac{L_i}{u_m t}\right)^{1/2} \\ \frac{L_i + L_s}{u_m} &\leq t & \Phi &= \left(1 - \frac{L_i}{u_m t}\right)^{1/2} - \left(1 - \frac{L_i + L_s}{u_m t}\right)^{1/2} \end{aligned} \qquad \text{Eq. 2}$$

The value of Φ being estimated by turbidimetry, we assumed that the light attenuation measured during a convective dispersion experiment corresponds to a solution having a solute concentration equal to ΦC_0, where C_0 is the solute concentration of the loaded sample. As previously discussed, the light transmitted through homogeneous samples of various compositions follows a Beer-Lambert law (Eq. 1) for both particles under study (Figure 1 (d) and (e)).

The convective dispersion of nanometer size particles is first reported. A suspension of carbon nanotubes at a concentration of 0.06 wt% is first injected at a flow rate of 100 ml/h.

As mentioned in the introduction, this flow rate is of the order of magnitude of the one used during cell encapsulation by the jet co-extrusion technique [36]. The time evolution of the CNT concentration measured at a distance L_i from the downstream front of the injected sample equal to 10 cm is reported in Figure 2 (a). The time evolution predicted by Eq. 2 is also shown. The concentration first rises up to about 0.05 % and then decreases when the back interface arrives at the measurement point. There is a rather good agreement between theory and experiment up to the first 8 s but then the amount of particles is observed to drop down much faster than predicted. The corresponding spatio-temporal diagram built along the transverse plan of the capillary is shown in Figure 2 (i). Wavy streaks are observed when CNT concentration starts to decrease. This feature might be linked to the turn at 90° at the T junction located prior to the detection area. The channel Reynolds number, $Re_c = 2au_m/\upsilon$ where υ is the aqueous phase viscosity, being equal to 84, secondary flow, or Dean flow, in the transverse direction due to centrifugal force is susceptible to occur [42]. A more homogeneous concentration field is indeed recovered for a flow rate, and thus a Reynolds number, ten times lower (Figure 2 (ii)). The time evolution of the concentration is then better predicted by a purely convective dispersion mechanism as shown Figure 2 (b). We note that since flat initial interfaces between two miscible liquids are difficult to experimentally achieve, corrugations of the sample interfaces inevitably lead to concentration inhomogeneities in the transverse direction, especially revealed after the concentration peak. Bubbles having a length larger than the tube diameter can be introduced in order to compartmentalize the sample like in segmented flow chemistry [39]. The corresponding time evolution of the concentration, measured for the largest flow rate, is shown Figure 2 (a) and (iii). The concentration is almost constant between the bubbles, starting with a value of about 0.058 % and reaching 0.06 % at the front of the second bubble. We also note traces of CNT behind the later bubble. Here, the flow velocity is such that there exists a lubricating water film between the bubbles and the tube's wall. The bubbles are then moving at a velocity slightly larger than the average liquid velocity [43]. As a consequence, the continuous phase thus dilutes the solution from the front bubble and the solutes flow out of the sample from the rear bubble. In that case, the average dilution is about 3%. We now wonder how larger particles behave in such a flow configuration. The time evolution of the volume fraction φ of a micrometer beads suspension injected in the same condition as in the experiment reported in Figure 2 (a), is shown in Figure 3 (a). The time evolution of φ predicted by Eq. 2 is also shown. Like for a CNT suspension, after reaching a maximum, the amount of beads decreases faster that predicted.

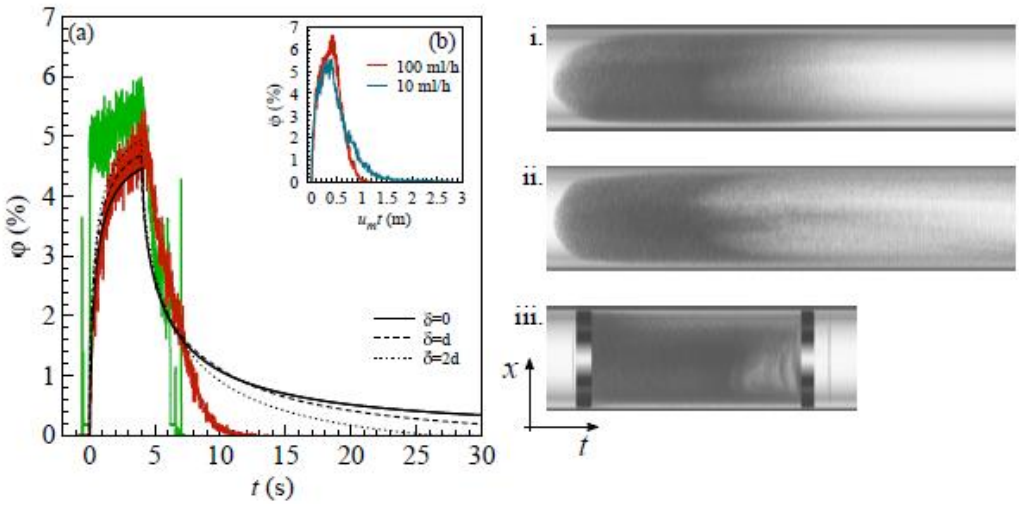

Figure 3:(Color online) (a) Time evolution of the volume fraction of a polysterene beads suspension, having a diameter *d* of 20 μm, undergoing a convective dispersion at a flow rate of 100 ml/h in a capillary having a radius of 420 μm (-) and when two large bubbles bound the sample (-). The evolution predicted by Eq.2 with various thickness δ of a depletion layer near the wall is also shown. The initial volume fraction φ_0 is 5%. (b) Dispersion curves for two different flow rates with φ_0 equal to 6%. The time is multiplied by the maximum velocity u_m. Corresponding spatio-temporal diagram built along the transverse plan of the capillary for $q = 100\ ml/h$ (i), $q = 10\ ml/h$ (ii) and when bubbles are present at $q = 100\ ml/h\ (iii)$.

However, the difference is more pronounced since particles are swept out in less than 15 s for beads while traces of CNT are still present after 30 s. When the flow rate is divided by 10, the volume fraction decreases again less rapidly but the maximum value reached by φ is different (Figure 3(b)). For the highest flow rate, this value is even larger than the sample one φ_0. Another striking observation is the distribution of beads when the sample is bounded by two long bubbles (Figure 3 (a)). The volume fraction starts atφ_0, increases to about 5.8 % and then decreases as it does without any bubble at the rear.

This peculiar behavior is the signature of lateral migration experienced by the beads. In- deed, the fast density drop can be associated to a depletion of particles at the wall that do not explore low velocities responsible of a slow decay of φ. The thickness of this depletion layer has been experimentally shown to be a decreasing function of the initial particle concentration [13].

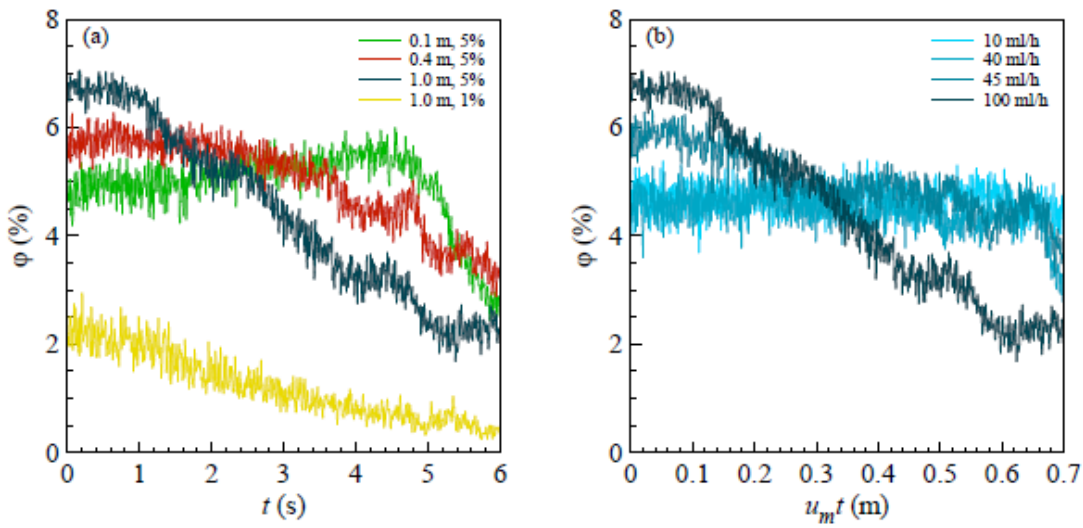

Figure 4: Color online) (a) Time evolution of the volume fraction of a suspension of micrometer beads bounded by two large bubbles measured at three downstream distances L_i and for two initial volume fractions φ_0. (b) Influence of the flow rate on the distribution of beads sandwiched between two bubbles and measured at L_i = 1 m. For comparing different flow rates, time is multiplied by the maximum velocity u_m.

Also, the concentration profile is evolving with time since particles migrate radially to reach a steady state that depends on the bulk concentration and the channel Reynolds number [4, 5, 44]. In order to simply illustrate the impact of the depletion layer, let us assume that there exists a layer near the wall of thickness δ depleted in particles and that the concentration of particles is then uniform, i.e. $\phi = 0$ for $\mathrm{r} > \mathrm{a} - \delta$ and $\phi = (\mathrm{r}_f - \mathrm{r}_b)/(\mathrm{a} - \delta)$ for $\mathrm{r} \leq \mathrm{a} - \delta$. The bulk volume fraction φ_0 is multiplied by $(1/(1 - \delta/\mathrm{a}))^2$ to conserve mass. As reported in Figure 3 (a), Eq. 2 results in a trend similar to experiments when ϕ and φ are modified in that way. In that case, the time t_0 at which the volume fraction is null is $t_0 = (L_i + L_0)/\left(1 - \left(1 - \frac{\delta}{a}\right)^2\right)$ which tends to infinity when δ tends to 0. However, in the case of finite size particles, the depletion layer thickness is bounded by $a/2$ due to steric hindrance.

What does happen if the measurement location is further moved downstream ? The time evolution of φ, for a sample initially at a volume fraction of 5 % bounded by two bubbles and flowing at a flow rate of 100 ml/h is reported in Figure 4 (a) for $L_i$equal to 0.1 m, 0.4 m and 1 m. One can clearly see an accumulation of particles at the rear of the front bubble that increases with L_i.

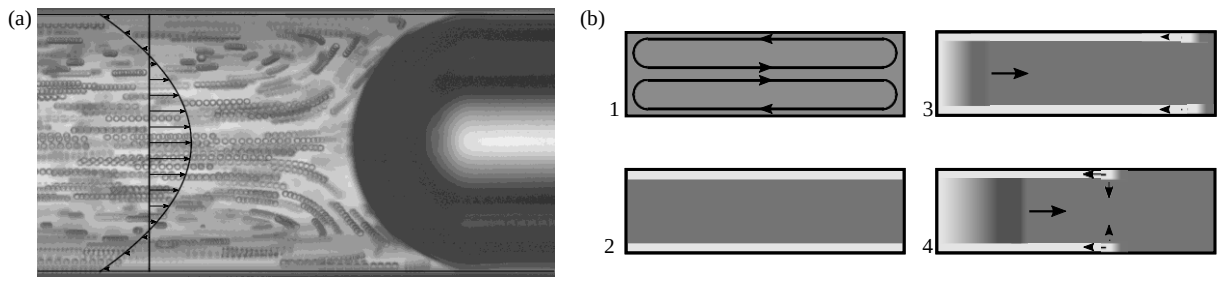

Figure 5: (a) Trajectories of beads a the rear of the leading bubble in the reference frame of the latter (φ_0= 0.5%). The image is a superposition of 10 snapshots with a time interval of 0.5 ms. The velocity field is also shown. (b) Mechanism for the development of longitudinal variation of particle concentration ; 1 : recirculation of a homogeneous suspension contained in a closed vessel ; 2 : addition of a depletion layer near the wall ; 3 : propagation of a low volume fraction into the core from the left side and an high volume fraction from the right through the layer near the wall. 4 : coupling with a migration of particles from the wall to the core. Volume fraction is shown in grayscale.

There exists a peak of volume fraction that propagates towards the front bubble and reaches here about 7 %. While the initial volume fraction is moderate, collision between particles is frequent. These collisions are known to induce a lateral migration, even at low Reynolds number. However, when φ_0 is set to 1 %, the accumulation feature is still present and the maximum reached by φ is even twice φ_0. The lift force experienced by the beads at such Reynolds number, $\mathrm{Re}_c = 84$, is high enough to promote a reorganization of the beads in the transverse plan that impacts their dispersion in the longitudinal direction. We mention that a companion Reynolds number $Re_p = Re_c \times (d/4a)^2$ is usually introduced in such a context [21]. The corresponding particule Reynolds number is equal to $\mathrm{Re}_p = 0.012$. If now the flow rate is divided by 10, this phenomenon is not visible anymore (Figure 4(b)). Interestingly, we note a sharp transition between an homogeneous state and an accumulation state when the flow rate is increased from 40 ml/h to 45 ml/h, thus for $Re_c > 34$ and $Re_p > 0.005$. This suggests an amplification mechanism that might be due to collision induced migration.

As previously discussed, a depletion layer of particles near the wall reduces the overall dispersion of a suspension (Figure 3(a)). In order to illustrate its effect in the case of an axially confined flow, let us follow the same simple model where $\phi = 0$ for $r > a - \delta$ and $\phi = 1$ for $\mathrm{r} \leq \mathrm{a} - \delta$. The long bubbles travel at velocity $\mathrm{u}_b = (1 + \alpha)\mathrm{U}$ where the slip coefficient α is of the order of the $(\eta U/\gamma)^{2/3}$ [43], where is the fluid viscosity and y the surface tension. Here, the capillary number $Ca = \frac{\eta U}{\gamma}$ is at most equal to 10^{-3} corresponding to a bubble velocity u_b 3 % larger than the average fluid velocity U. In the reference frame of the bubble, the fluid velocity is

$$u'(r) = \left(\frac{1-\alpha}{2} - \left(\frac{r}{a}\right)^2\right) \qquad \text{Eq. 3}$$

This flow profile is valid at a distance from the bubble of the order of the tube's radius a as illustrated in Figure 5(a). By assuming that particles travel at the local fluid velocity, the density flux of particle is j = $\varphi_0'\phi(r)u'$, where $\varphi_0' = \varphi_0(1/(1-\frac{\delta}{a}))^2$. The flux of particles passing through the cross section of the pipe is then

$$J = 2\pi \int_0^{a-\delta} j(r) r dr$$
$$= \frac{\pi}{2} a^2 \left(\frac{1}{1-\delta/a}\right)^2 \left((1-\alpha)\left(1-\frac{\delta}{a}\right)^2 - \left(1-\frac{\delta}{a}\right)^4\right) \qquad \text{Eq. 4}$$

There is therefore a net flux of particles directed towards the leading bubble if $\frac{\delta}{\mathrm{a}} > 1 - (1 - \alpha)^{1/2}$. When $\delta = 0$, like in the experiment with a carbon nanotube suspension, the flux becomes negative since the bubbles travel faster than the average liquid velocity. Since CNT can flow through the lubricating film, particles are left behind the rear bubble and the suspension is diluted from the front bubble (Figure 2(a)). For PS beads, since their size is larger than the lubricating film, only a few particles could escape (Figure 3 (a)) maybe thanks to a mechanism recently discussed where particles adhere to the interface [45].

Whatsoever, particles are principally trapped between the two bubbles and proper boundary condition of the flux should be set at each liquid-air interface in order to assess the flow feature of such a bounded suspension. As observed in Figure 5 (a), in the reference frame of the bubble, particles are moving towards the bubble apex at the center and flow back close to the wall. A mechanism for the building-up of a longitudinal variation of particle concentration can now be proposed. Since the flow is confined, the streamlines are closed and form an elongated vortex ring (Figure 5 (b)-1). Starting from a homogeneous suspension, one may wonder how of such a suspension under recirculating flow is stable when a depletion layer near the wall is added (Figure 5 (b)-2). On the left hand side, corresponding to the rear bubble, a low volume fraction region from the wall invades the core. On the right hand side, at the front bubble location, high volume fraction of the core refills the near wall region (Figure 5 (b)-3). If the lift force is high enough, particles will migrate away from the wall before reaching the left hand side (Figure 5 (b)-4). In that way, the volume fraction of particles continues to decrease on this side and a region of more concentrated particles propagates towards the front bubble (Figure 4(a)). Otherwise, the concentration of particles is re-homogenized.

III.1.4 Conclusion

In this work, we report an experimental investigation on flowing suspensions in a pipe in presence or not of long confined bubbles. Here, the suspensions are dilute and flow at moderate Reynolds for which inertia affects the motion of particles that migrate away from the wall. When a finite volume of the suspension is injected in the flow of the continuous phase free of particles, we observe that particle migration has a strong impact on the distribution of particles undergoing a convective dispersion. Indeed, particles are swept away faster because of the existence of a depletion layer of particles at the wall that do not ex- plore low velocities responsible otherwise of a slow decay of particle concentration. If now the sample is bounded by two long bubbles, a striking behavior occurs where particles tend to accumulate behind the leading bubble. This phenomenon is shown to occur from low volume fractions, where collision between particles are rare, to moderate ones and above a critical Reynolds number. Also, for a moderate volume fraction (at 5%), observations close to the transition suggest an amplification mechanism that could involve particle collision. All the results are rationalized with the help of a minimal model that accounts for the presence of a depletion layer near the wall but with a homogeneous concentration of particles in the outer region. A more sophisticated model is then required for describing the dynamics of the destabilization of the initially homogeneous suspension that would account for the establishment of particle accumulation at the rear bubble linked to a redistribution of particles in the radial direction.

The phenomenon of particule accumulation in such multiphase flow is shown here to occur when liquid inertia comes into play but we believe that it is more generic. Indeed, a criterion to satisfy is the establishment of a layer near the wall depleted in particles, as it is observed for the flow of concentrated suspensions at low Reynolds numbers or in the case where particles are deformable, like for biological samples or emulsions.

[1] L. Leal, “Particle motions in a viscous fluid,” Ann. Rev. Fluid Mech. **12**, 435 (1980).

[2] A. Kumar and M. D. Graham, “Margination and segregation in confined flows of blood and other multicomponent suspensions,” Soft Matter **8**, 10536 (2012).

[3] D. Leighton and A. Acrivos, “The shear-induced migration of particles in concentrated suspensions,” J. Fluid Mech. **181**, 415 (1987).

[4] C. J. Koh, P. Hookham, and L. G. Leal, “An experimental investigation of concentrated suspension flows in a rectangular channel,” J. Fluid Mech. **266**, 1 (1994).

[5] M. K. Lyon and L. G. Leal, “An experimental study of the motion of concentrated suspensions in two-dimensional channel flow. part 1. monodisperse systems,” J. Fluid Mech. **363**, 25 (1998).

[6] M. Zurita-Gotor, J. Blawzdziewicz, and E. Wajnryb, “Swapping trajectories: a new wall-induced cross-streamline particle migration mechanism in a dilute suspension of spheres,” J. Fluid Mech. **592**, 447 (2007).

[7] P. A. Arp and S. G. Mason, “The kinetics of flowing dispersions : Ix. doublets of rigid spheres (experimental),” J. Colloid Interface Sci. **61**, 44 (1977).

[8] D. J. Pine, J. P. Gollub, J. F. Brady, and A. M. Leshansky, “Chaos and threshold for irreversibility in sheared suspensions,” Nature **438**, 997 (2005).

[9] F. R. Da Cunha and E. J. Hinch, “Shear-induced dispersion in a dilute suspension of rough spheres,” J. Fluid Mech. **309**, 211 (1996).

[10] P. Pham, B. Metzger, and J. E. Butler, “Particle dispersion in sheared suspensions: Crucial role of solid-solid contacts,” Phys. Fluids **27**, 051701 (2015).

[11] G. Coupier, B. Kaoui, T. Podgorski, and C. Misbah, “Noninertial lateral migration of vesicles in bounded poiseuille flow,” Phys. Fluids **20**, 111702 (2008).

[12] M. Loewenberg and E. J. Hinch, “Collision of two deformable drops in shear flow,” J. Fluid Mech. **338**, 299 (1997).

[13] A. Karnis, H. L. Goldsmith, and S. G. Mason, “The flow of suspensions through tubes : V. inertial e↵ects,” Can. J. Chem. Eng. **44**, 181 (1966).

[14] F. Gauthier, H. L. Goldsmith, and S. G. Mason, “Particle motions in nonnewtonian media. ii. poiseuille flow,” Transactions of the Society of Rheology **15**, 297 (1971).

[15] B. Ho and L. Leal, "Migration of rigid spheres in a two-dimensional unidirectional shear flow of a second-order fluid," J. Fluid Mech. **76**, 783 (1976).

[16] G. Segré and A. Silberberg, "Radial particle displacements in poiseuille flow of suspensions," Nature **189**, 209 EP (1961).

[17] G. Segré and A. Silberberg, "Behaviour of macroscopic rigid spheres in poiseuille flow part 2. experimental results and interpretation," J. Fluid Mech. **14**, 136 (1962).

[18] S. I. Rubinow and J. B. Keller, "The transverse force on a spinning sphere moving in a viscous fluid," J. Fluid Mech. **11**, 447 (1961).

[19] P. Sa↵man, "The lift on a small sphere in a slow shear flow," J. Fluid Mech. **22**, 385 (1965).

[20] R. G. Cox and H. Brenner, "The lateral migration of solid particles in poiseuille flow —i theory," Chem. Eng. Sci. **23**, 147 (1968).

[21] B. Ho and L. Leal, "Inertial migration of rigid spheres in two-dimensional unidirectional flows," J. Fluid Mech. **65**, 365 (1974).

[22] J. A. Schonberg and E. Hinch, "Inertial migration of a sphere in poiseuille flow," J. Fluid Mech. **203**, 517 (1989).

[23] J. B. McLaughlin, "Inertial migration of a small sphere in linear shear flows," J. Fluid Mech. **224**, 261 (1991).

[24] E. S. Asmolov, "The inertial lift on a spherical particle in a plane poiseuille flow at large channel reynolds number," J. Fluid Mech. **381**, 63 (1999).

[25] J.-P. Matas, J. F. Morris, and É. Guazzelli, "Inertial migration of rigid spherical particles in poiseuille flow," J. Fluid Mech. **515**, 171 (2004).

[26] D. Di Carlo, D. Irimia, R. G. Tompkins, and M. Toner, "Continuous inertial focusing, ordering, and separation of particles in microchannels," Proc. Natl. Acad. Sci. USA **104**, 18892 (2007).

[27] D. Di Carlo, J. F. Edd, K. J. Humphry, H. A. Stone, and M. Toner, "Particle segregation and dynamics in confined flows," Phys. Rev. Lett. **102**, 094503 (2009).

[28] A. A. S. Bhagat, S. S. Kuntaegowdanahalli, and I. Papautsky, "Inertial microfluidics for continuous particle filtration and extraction," Microfluid. Nanofluid. **7**, 217 (2009).

[29] D. Di Carlo, "Inertial microfluidics," Lab Chip **9**, 3038 (2009).

[30] W. Lee, H. Amini, H. A. Stone, and D. Di Carlo, "Dynamic self-assembly and control of microfluidic particle crystals," Proc. Natl. Acad. Sci. USA **107**, 22413 (2010).

[31] H. Amini, E. Sollier, W. M. Weaver, and D. Di Carlo, "Intrinsic particle-induced lateral transport in microchannels," Proc. Natl. Acad. Sci. USA **109**, 11593 (2012).

[32] J.-P. Matas, V. Glezer, É. Guazzelli, and J. F. Morris, "Trains of particles in finite-reynolds-number pipe flow," Phys. Fluids **16**, 4192 (2004).

[33] J. F. Edd, D. Di Carlo, K. J. Humphry, S. Köster, D. Irimia, D. A. Weitz, and M. Toner, "Controlled encapsulation of single-cells into monodisperse picolitre drops," Lab Chip **8**, 1262 (2008).

[34] U. Prusse, L. Bilancetti, M. Bucko, B. Bugarski, J. Bukowski, P. Gemeiner, D. Lewinska, **III.** Manojlovic, B. Massart, C. Nastruzzi, et al., "Comparison of di↵erent technologies for alginate beads production," Chem. Pap. **62**, 364 (2008).

[35] K. Alessandri, B. R. Sarangi, V. V. Gurchenkov, B. Sinha, T. R. Kiessling, L. Fetler, F. Rico, S. Scheuring, C. Lamaze, A. Simon, et al., "Cellular capsules as a tool for multicellular spheroid production and for investigating the mechanics of tumor progression in vitro," Proc. Natl. Acad. Sci. USA **110**, 14843 (2013).

[36] H. Domejean, M. de la Motte Saint Pierre, A. Funfak, N. Atrux-Tallau, K. Alessandri, P. Nas- soy, J. Bibette, and N. Bremond, "Controlled production of sub-millimeter liquid core hydrogel capsules for parallelized 3d cell culture," Lab Chip **17**, 110 (2017).

[37] H. Doméjean, J. Bibette, and N. Bremond, "Traffic collision during the breakup of an aqueous viscous compound jet," Phys. Rev. Fluids **1**, 063903 (2016).

[38] G. I. Taylor, "Dispersion of soluble matter in solvent flowing slowly through a tube," Proc. R. Soc. Lond. A **219**, 186 (1953).

[39] M. T. Kreutzer, F. Kapteijn, J. A. Moulijn, and J. J. Heiszwolf, "Multiphase monolith reactors: Chemical reaction engineering of segmented flow in microchannels," Chem. Eng. Sci. **60**, 5895 (2005).

[40] L. Mottet, D. Le Cornec, J.-M. Noël, F. Kanoufi, B. Delord, P. Poulin, J. Bibette, and N. Bremond, "A conductive hydrogel based on alginate and carbon nanotubes for probing microbial electroactivity," Soft matter **14**, 1434 (2018).

[41] R. Aris, "On the dispersion of a solute in a fluid flowing through a tube," Proc. R. Soc. Lond. A **235**, 67 (1956).

[42] S. A. Berger, L. Talbot, and L. S. Yao, "Flow in curved pipes," Ann. Rev. Fluid Mech. **15**, 461 (1983).

[43] F. P. Bretherton, "The motion of long bubbles in tubes," J. Fluid Mech. **10**, 166 (1961).

[44] P. R. Nott and J. F. Brady, "Pressure-driven flow of suspensions: simulation and theory," J. Fluid Mech. **275**, 157 (1994).

[45] Y. E. Yu, S. Khodaparast, and H. A. Stone, "Armoring confined bubbles in the flow of colloidal suspensions," Soft matter **13**, 2857 (2017).

III.2 Instabilités d'un jet composé d'une suspension cellulaire dense

Dans le cas des hépatocytes primaires humains, la concentration de 10 millions de cellules/mL soit approximativement 120 cellules/capsule est requise pour former un sphéroïde compact d'un diamètre moyen de 150 µm. Nous avons observé qu'à ces concentrations l'encapsulation de ces suspensions cellulaires aboutit à la formation de capsules hétérogènes en taille (Figure III. 1). Cette polydispersité résulte de la coalescence des bi-gouttes au sein de la fragmentation du jet composé.

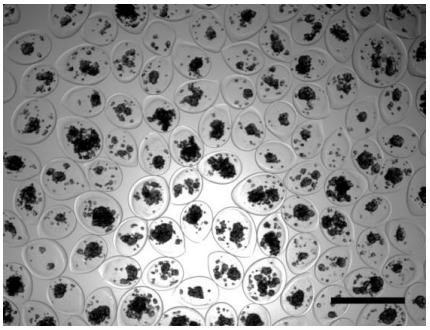

Figure III. 1 : Polydispersité des capsules contenant des hépatocytes encapsulés à 10 millions de cellules/mL. Débit d'injection = 230mL/h. Rapport des débits entre le fluide cœur contenant les cellules et le fluide de coque constitué d'une solution d'alginate Rq=1,4. Diamètre de l'injecteur = 200µm. La barre d'échelle représente 1mm. Crédit Léo Chamayou.

Etant donné que nous disposons de suspensions cellulaires en quantité très limitée, nous avons fait le choix d'utiliser des particules modèle pour notre étude. Il s'agit de particules sphériques et dures en polystyrène (PS) de la taille de 20 µm en moyenne. Dans cette étude, seule la taille des objets est prise en compte. Or, comme nous l'avons mentionné à la section III.1 d'autres facteurs peuvent influencer l'écoulement dont l'élasticité des particules par exemple. Nous ignorons donc ici le rôle possible joué par la déformabilité des cellules lors de l'extrusion et la fragmentation du jet d'une suspension et nous concentrons sur l'effet de la présence d'objets d'une taille comparable à la dimension caractéristique du jet.

Comme précédemment discuté, afin d'éviter l'agrégation et la sédimentation des particules de polystyrène, nous les dispersons dans une phase continue contenant du Tween 20 à 0,1% (V/V) et du Nycodenz à 10% (V/V).

En prenant l'exemple sur une encapsulation des hépatocytes, nous avons déterminé une fraction volumique de travail de 5%. Lorsque nous établissons un jet composé d'un cœur d'une suspension de particules de PS à cette fraction volumique et d'une coque d'alginate, nous observons des évènements de

coalescence au sein du jet et celui-ci est soumis au battement. Ces phénomènes sont respectivement illustrés aux Figure III. 2 et Figure III. 3.

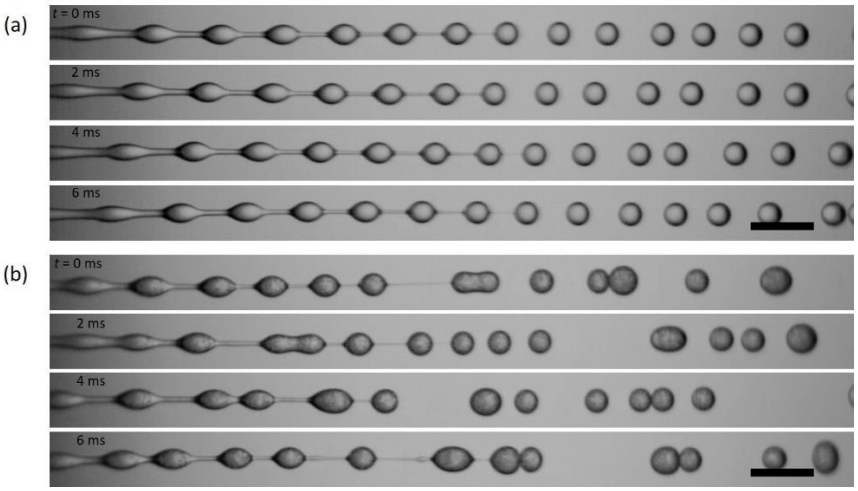

Figure III. 2 : (a) Fragmentation régulière et (b) coalescence d'un jet composé respectivement d'un cœur de la phase continue et d'une suspension de particules à $\phi_v = 5\%$. La phase continue de la solution de cœur est composée d'une solution de Tween 20 à 0,1% (V/V) et de Nycodenz à 10% (V/V). La solution de coque est une solution d'alginate à 1,8%m. Débit total d'injection = 180 mL /h. Rapport des débits = 2. Amplitude et fréquence de l'actuation piézoélectrique : 20 V et 1900 Hz respectivement. Diamètre de l'injecteur = 200 µm. Les barres d'échelle représentent 1 mm.

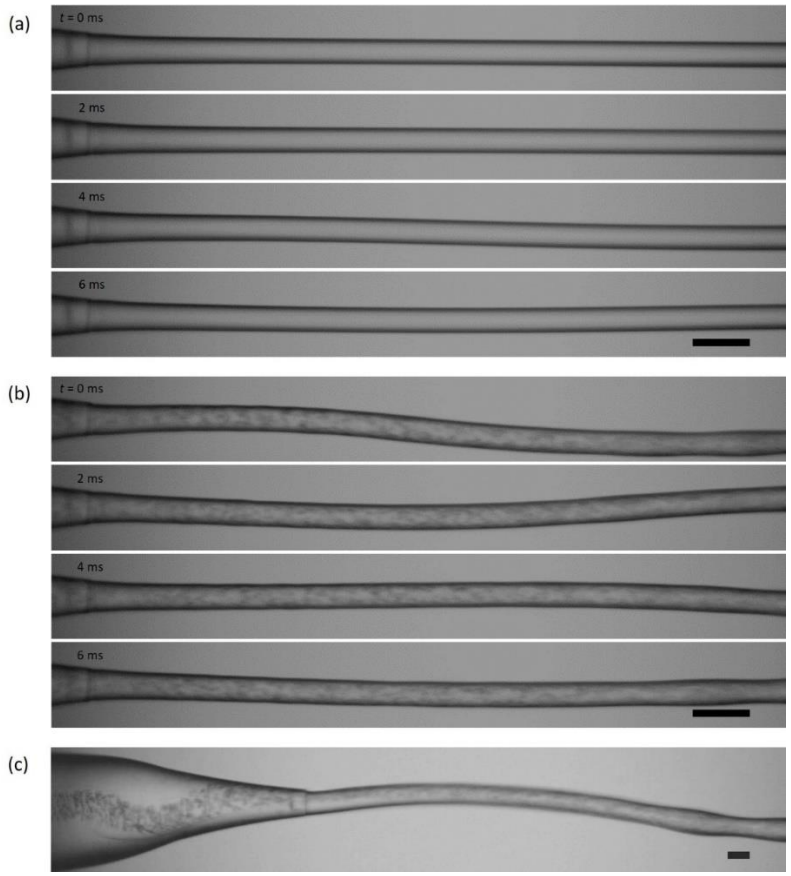

Figure III. 3 : (a) Jet libre stable et (b) soumis à un battement composé respectivement d'un cœur de la phase continue et d'une suspension de particules à ϕ_v = 5%. (c) Observations des oscillations du cœur au sein du capillaire étiré. La phase continue de la solution de cœur est composée d'une solution de Tween 20 à 0,1% (V/V) et de Nycodenz à 10% (V/V). La solution de coque est une d'une solution d'alginate à 1,8%m. Débit total d'injection = 180 mL/h. Rapport des débits = 2. Diamètre de l'injecteur = 200 µm. Les barres d'échelle représentent 1 mm.

Dans cette partie du manuscrit, nous allons nous intéresser à comprendre l'origine de chaque phénomène d'instabilité observé à l'origine de la polydispersité des capsules puis proposer une stratégie visant à les atténuer.

III.2.1 Battement du jet libre

Pour évaluer l'effet des particules à ϕ_v = 5% sur l'amplitude du battement du jet, nous avons quantifié les fluctuations maximales de la position centrale du jet pour trois compositions de la solution de cœur : eau ultra pure (MilliQ), phase continue et la suspension de PS à ϕ_v = 5% qui sont de 25, 60 et 138 µm respectivement. Ainsi la présence des particules à cette fraction volumique induit un battement du jet au moins deux fois plus important.

Comme nous l'avions énoncé au chapitre II, le co-écoulement de deux fluides de différentes viscosités peut être instable. Par des mesures de viscosité reportés à la Figure III. 4, nous notons que la fraction volumique des suspensions jusqu'à 10 % varie de 1,25 à 1,67 mPa.s. Ce résultat confirme que pour des suspensions diluées, la fraction volumique n'affecte pas grandement la viscosité. Les viscosités des suspensions sont données par l'équation de Batchelor et Green qui relie la viscosité d'une suspension de particules sphériques dures à la viscosité de la phase continue par la relation suivante :

$$\eta = \eta_s \left(1 + \frac{5}{2}\phi_v + 5{,}2\,\phi_v^2\right) \qquad \text{(III. 1)}$$

avec η, la viscosité d'une suspension de particules sphériques dures ; η_s la viscosité de la phase continue et ϕ_v la fraction volumique de la suspension de particules.

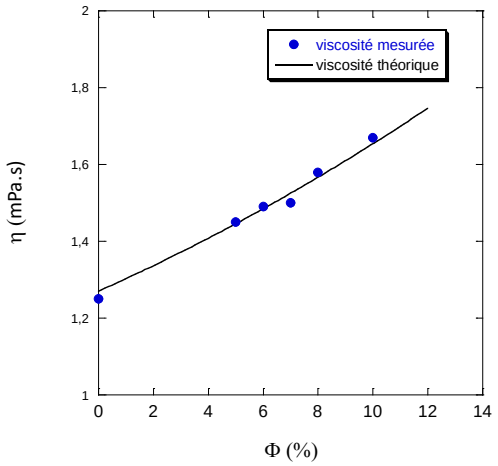

Figure III. 4 : Mesures de viscosité en fonction de la fraction volumique de différentes suspensions de particules. La solution à ϕ_v = 0% correspond à la phase continue.

Ainsi cette légère différence de viscosité ne semble pas expliquer le phénomène de battement observé. En revanche, il est possible que cette instabilité provienne d'une inhomogénéité locale de viscosité au sein même de la suspension de particules qui ne serait pas sondée par des mesures à l'échelle macroscopique. Cette inhomogénéité locale serait alors due à un gradient de concentration des particules. En effet, du fait du caractère non brownien des particules, celles-ci ne diffusent pas et sont seulement soumises au phénomène de convection. Autrement dit, l'agitation thermique ne permet pas d'homogénéiser la suspension.

Une stratégie envisagée pour minimiser voire annuler le phénomène de battement est de viscosifier cette suspension avec une solution de HEC à pour atteindre une viscosité à faible cisaillement de 30 mPa.s

III.2.2 Fragmentation du jet composé

III.2.2.1 Extrusion simple

A présent, nous allons nous intéresser au comportement de la fragmentation du jet en présence des particules dont la taille est du même ordre de grandeur que le diamètre du capillaire de l'injecteur. Au préalable, nous allons rappeler brièvement le mécanisme de brisure d'un jet. Un jet s'établit par l'écoulement d'un fluide par effet inertiel. Celui-ci se fragmente pour minimiser la surface libre à l'interface air - liquide et ainsi abaisser son énergie de surface. Toute perturbation du rayon du jet va être amplifiée de façon exponentielle selon la relation de dispersion établie par Rayleigh.

L'analyse linéaire et temporelle de l'instabilité établie par Rayleigh permet d'aboutir à la relation de dispersion qui relie le taux de croissance (*β = -iω,* où *ω* est la fréquence complexe) de perturbations de l'interface et le nombre d'onde (*k= 2 π/λ, où λ est la longueur d'onde*) associé à ces perturbations (Figure III. 5).

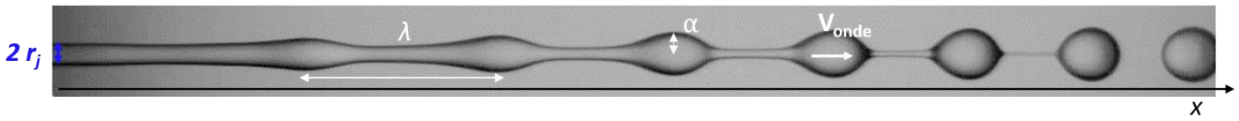

Figure III. 5 : Représentation schématique de la fragmentation d'un jet. La perturbation au sein d'un jet de diamètre r_j se propage à une longueur d'onde λ, avec une amplitude α le long de l'axe x.

L'amplitude des perturbations de la position radiale de l'interface est alors amplifiée de façon exponentielle selon la relation :

$$\alpha = \alpha_0 \, e^{\beta t} \qquad \text{(III. 2)}$$

Où α_0 est l'amplitude des perturbations de l'interface de nombre d'onde *k*

Lorsqu'on néglige la viscosité, le nombre d'onde optimal $kmax \approx \frac{0,7}{r_j}$ et le taux de croissance correspondant est $\beta_{max} = \frac{1}{3}\left(\frac{\gamma}{\rho r_j^3}\right)^{\left(\frac{1}{2}\right)}$

Les ondes étant convectées à la vitesse moyenne du jet u_j, l'équation (III. 2 devient :

$$\alpha = \alpha_0 \, e^{\beta x / u_j} \qquad \text{(III. 3)}$$

Lorsque le jet se brise à $x = L_f$, l'amplitude des perturbations se résume à $\alpha = \mathrm{r}_{j_0}$. En extrapolant l'analyse linéaire jusqu'à la brisure, on obtient une relation entre l'amplitude des perturbations initiales et la longueur de fragmentation du jet :

$$\alpha_0 \, e^{\beta L_f / u_j} = r_{j_0} \frac{\mathrm{d_j}}{2} \qquad \text{(III. 4)}$$

La mesure de viscosité des dispersions (Figure III. 4) suggère une faible variation en fonction de la fraction volumique et donc a priori un taux de croissance β indépendant de ϕ_V. Le spectre des fluctuations est quant à lui potentiellement altéré. Quoiqu'il en soit, sans être quantitatif, l'équation (III. 4) nous renseigne sur un lien entre longueur du jet et amplitudes des perturbations au sein du jet.

La taille du jet est estimée par analyse d'images obtenues à partir de vidéo dont la fréquence d'acquisition est plus petite que la fréquence caractéristique de la fragmentation. Les images sont donc indépendantes les unes des autres. L'analyse est réalisée à partir de 2000 images. Les résultats de la longueur de fragmentation du jet composé de suspensions de particules à différentes fractions volumiques sont reportés à la Figure III. 6.

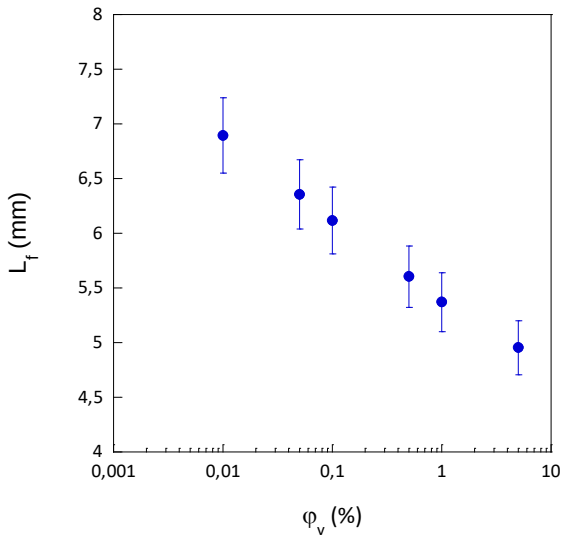

Figure III. 6 : Mesure de la moyenne et de l'écart type associé de la longueur de fragmentation pour une dispersion de particules en fonction de la fraction volumique. La phase continue contient du Tween 20 à 0.1% (V/V) et du Nycodenz à 10 % (V/V). Le débit du jet est de 200 mL/h.

Nous observons que la longueur de fragmenttaion diminue graduellement à mesure que l'on augmente la fraction volumique de la suspension. Les résultats de la distribution en taille des jets libres sont reportés à la Figure III. 7.

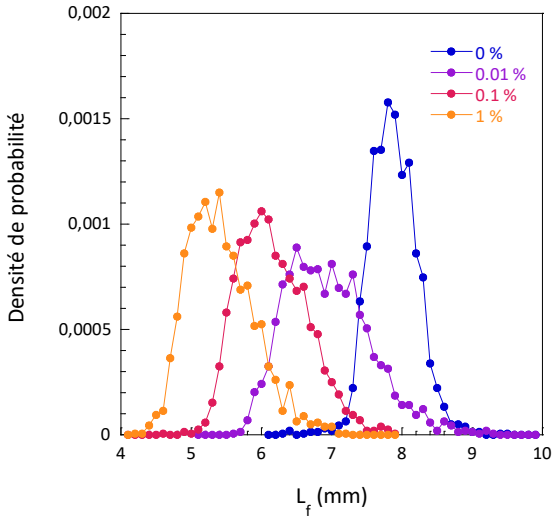

Figure III. 7 : Densité de probabilité de la longueur de fragmentation des jets en extrusion simple de dispersions de particules PS à différentes fractions volumiques. La dispersion à ϕv = 0% correspond à la phase continue.

Nous observons que la longueur de fragmentation du jet diminue rapidement avec la fraction volumique et semble saturer pour des fractions volumiques au-delà de quelques %. Aussi, la largeur de la distribution est minimale sans particules, passe par un maximum pour ϕ_v = 0,01% diminue légèrement et sature. Nous notons ici que la largeur de la distribution sans particules correspond à la longueur d'onde moyenne. En effet, la méthode de mesure ne permet pas de mettre en phase la rupture du pont capillaire liant la dernière goutte du jet au jet et la prise d'image. L'incertitude de mesure est donc d'une longueur d'onde. Pour la plus faible concentration en particules, si nous calculons le nombre moyen de particules présentes dans le jet, nous obtenons une valeur de 6. Etant donné cette faible valeur, le nombre est statistiquement distribué et suit une loi de Poisson. La probabilité qu'il n'y ait pas de particules dans le jet est donc de 0.25%. Le fait que la distribution de L_f à 0,01% empiète sur la distribution de L_f sans particules ne peut donc pas s'expliquer par un jet sans particules. Nous reviendrons sur cette observation plus loin. Pour l'autre cas extrême, lorsque la concentration augmente, il se peut que la formation du jet et sa fragmentation soient moins sensibles aux fluctuations de densité, c'est-à-dire que la dispersion se comporte comme une phase continue.

Nous nous sommes également intéressés à l'impact d'une suspension de particules de taille inférieure à la taille de particules utilisées jusqu'ici. Il s'agit de particules de polystyrène de 0,6 µm préparées par dispersion et polymerisation du styrène. La synthèse utilise le stabilisateur stérique, le polyvinylpyrrolidone (PVP K-30) et l'initiateur 2,2 -azo-bis-isobutyronitrile dans le milieu isopropanol / eau.[92] Le jet libre est illustré à laFigure III. 8 c. En comparant la taille des jets, nous observons que le jet est plus court en présence de particules de 0,6µm. La longueur de fragmentation moyenne est de 7,75 et 5,4 mm en présence de particules de 20 µm et de 0,6 µm respectivement. Ainsi, en présence de particules de 0,6µm, l'écoulement est moins perturbé. Ceci pourrait s'expliquer par le fait qu'en présence de particules sub-micrométriques, le fluide en écoulement soit plus homogène par ailleurs, ces particules sondent des gradients de vitesse plus faibles que les particules de plus grande taille.

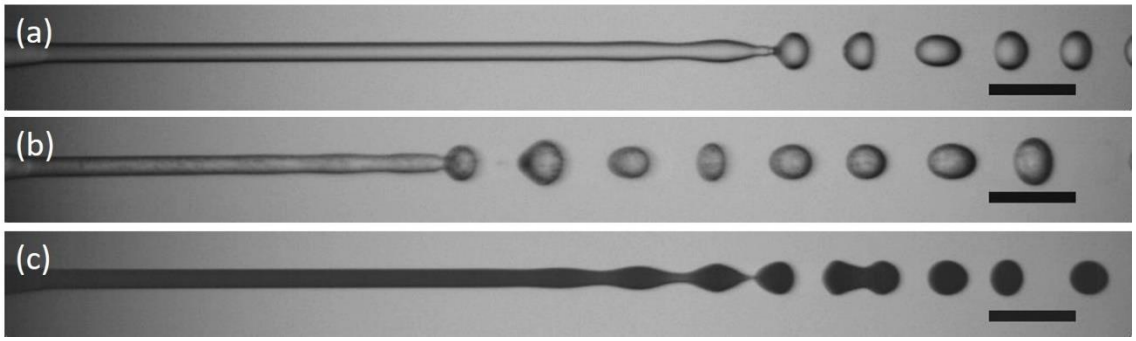

Figure III. 8 : Jets libres composés (a) de la phase continue, (b) d'une suspension de particules de 20 µm et (c) d'une suspension de particules de 0,6 µm. Les suspensions sont à une fraction volumique de 1%. Débit total d'injection = 200 mL/h. Les barres d'échelle représentent 1 mm.

Comme présenté précédemment, une faible quantité de particules dans le jet peut ne pas entraîner sa fragmentation précoce. Un aspect non abordé concerne l'impact de la position spatiale des particules sur la déstabilisation du jet. Nous avons donc étudié l'impact des particules d'une suspension diluée (ϕv = 0,00017%) lorsque celles-ci sont localisées au centre du jet puis au bord de celui-ci. Pour cela, nous avons utilisé un injecteur à deux entrées.

Pour focaliser les particules au centre du jet, la suspension de particules est injectée au cœur et le fluide de la phase continue au niveau de la coque de l'écoulement. Pour limiter la répartition des particules au sein du jet, nous déterminons un rapport de débits entre les fluides de cœur et de coque relativement faible :

$$r_q = \frac{Q_{coeur}}{Q_{coque}} = \frac{2}{198}$$

Ainsi étant donné que nous abaissons le débit d'injection de la suspension de particule d'un facteur 100 par rapport à l'expérience précédente, nous devons alors concentrer la suspension de particules pour maintenir une fraction volumique équivalente. Les résultats de la densité de probabilité de la longueur de fragmentation du jet sont reportés à la Figure III. 9. Nous remarquons que la distribution de la taille du jet contenant la suspension de particules se superpose à la distribution du jet de la phase continue. Ainsi en focalisant les particules au centre du jet, celles-ci ne perturbent pas l'écoulement.

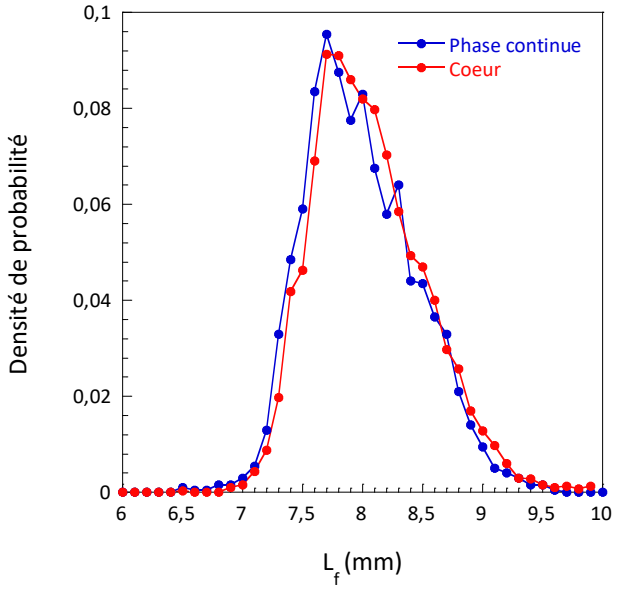

Figure III. 9 : Densité de probabilité de la longueur de fragmentation du jet en extrusion d'une dispersion de particules PS focalisées au centre du jet (ϕv = 0,017%) en comparaison au jet contenant le fluide de la phase continue (ϕv = 0%).

De la même façon, nous injectons cette fois-ci les particules au niveau de la coque du jet à la même fraction volumique. Nous retrouvons le même pic principal que précédemment mais également la présence d'un deuxième pic qui nous informe de la présence d'une deuxième population de jet dont la taille varie approximativement entre 5,5 et 7 mm. Cette deuxième population résulte des perturbations des particules réparties au niveau de la coque sur l'écoulement (Figure III. 10).

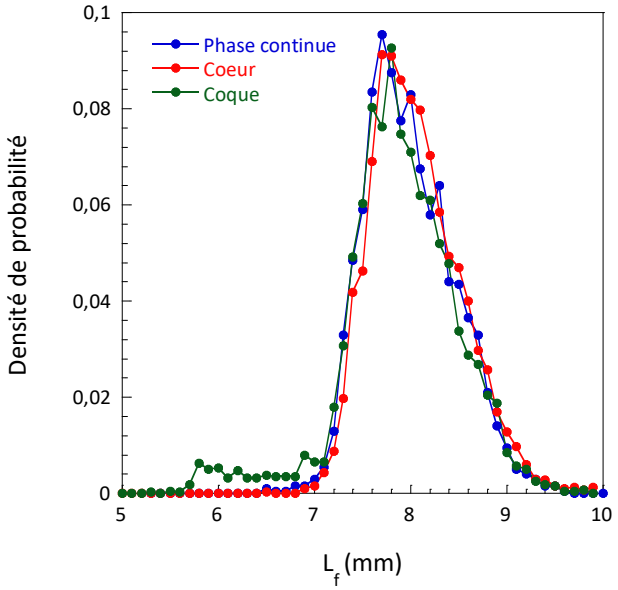

Figure III. 10 : Densité de probabilité de la longueur de fragmentation du jet en extrusion d'une dispersion de particules PS localisées au niveau de la coque du jet en comparaison au jet contenant les particules au centre du jet. (ϕv = 0,017%).

Ainsi, nous avons mis en évidence que la longueur de fragmentation du jet, qui nous informe sur la stabilité de l'écoulement dépend de la répartition spatiale des particules de la suspension au sein du jet. Lorsque les particules sont réparties au bord du jet, celles-ci perturbent l'écoulement.

L'écoulement de cette dispersion inhomogène modifie le profil de vitesse du jet et la distribution des contraintes visqueuses. Rappelons que la taille du jet, et donc de la position de la surface libre, à la sortie du capillaire dépend de la relaxation du profil de vitesse et des contraintes visqueuses (Middleman 1961). La présence des particules peut alors entraîner des perturbations de la surface libre qui sont amplifiées par l'instabilité capillaire.

III.2.2.2 Co-extrusion

Dans le l'objectif de former des capsules, nous allons maintenant nous intéresser à la co-extrusion d'un jet composé de la dispersion de particules et de la solution d'alginate. Dans cette partie du chapitre, nous contrôlons la fragmentation en appliquant une perturbation contrôlée en amplitude et en fréquence. Ici, nous nous intéressons à la taille des gouttes formées.

La probabilité de densité du rayon des gouttes formées pour différentes fractions volumiques est reportée sur la Figure III. 11. Sans particules, le coefficient de variation (CV), défini comme le rapport de l'écart type et la moyenne, est seulement de 0,4 %. La perturbation harmonique du jet est ici efficace. En présence de particules, un second pic dans la distribution apparaît pour des tailles plus élevées. L'intensité du second pic augmente lorsque la fraction volumique des particules augmente. Cette polydispersité des gouttes est due aux évènements de coalescence des ondes au sein du jet induit par une augmentation de l'amplitude des perturbations de la surface libre du jet précédemment reportées.

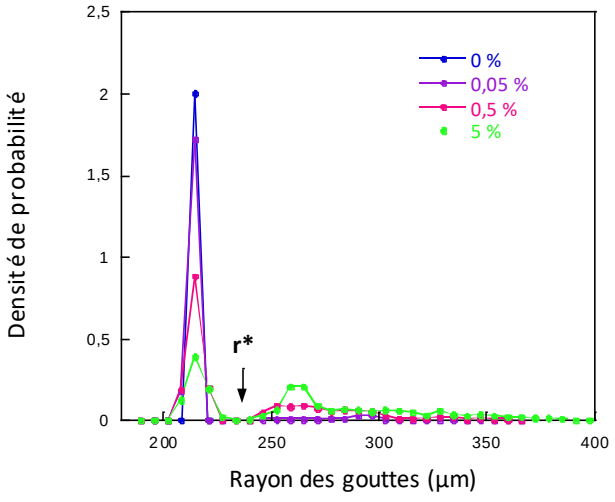

Figure III. 11 : Probabilité de densité en fonction du rayon des gouttes formés par un jet composé de dispersions de particules PS et d'une solution d'alginate à différentes fractions volumiques. La fragmentation est contrôlée par une perturbation harmonique d'amplitude 20 V et à une fréquence de 1900 Hz. La dispersion à ϕv = 0% correspond à la phase continue.

Nous pouvons définir un taux de coalescence Pc à partir de la densité de probabilité de la taille des gouttes :

$$P_c = \sum_{r=r^*}^{\infty} \rho dr / \sum_{r=0}^{\infty} \rho dr \qquad \text{(III. 5)}$$

où r^* est le rayon maximal lorsque qu'il n'y a pas de particule et ρ_0 la densité de probabilité correspondante. La probabilité de coalescence des gouttes à différentes fractions volumiques est reportée sur la Figure III. 12. Nous notons que les évènements de coalescence sont de plus en plus fréquents à mesure que l'on augmente la fraction volumique des dispersions. Comme pour l'évolution de la longueur du jet simple en fonction de ϕ_v (Figure III. 12), la probabilité de coalescence augmente rapidement pour de faibles valeurs de ϕ_v puis semble saturer pour des fractions volumiques supérieures à 5%.

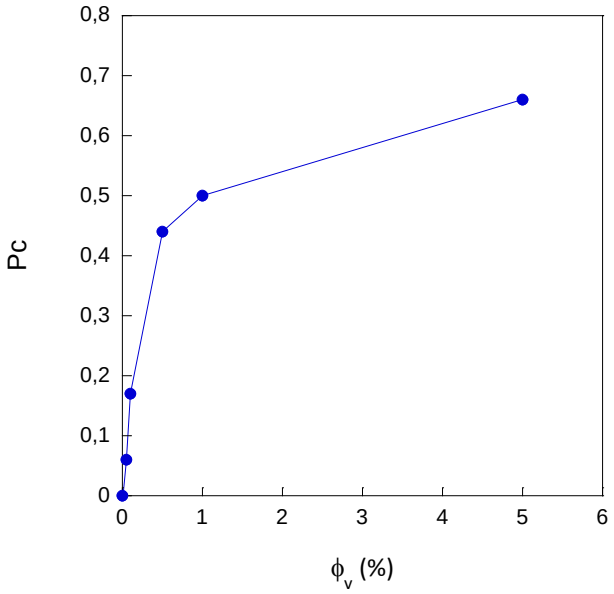

Figure III. 12 : Probabilité de coalescence des gouttes au sein de la fragmentation du jet composé en fonction de la fraction volumique des dispersions. Débit total Qtot=180mL.h-1. Rapport de débits des fluides Rq = 2. Tension appliquée = 20 V et fréquence = 1900 Hz.

A présent, nous allons proposer certaines stratégies visant à réduire ces évènements de coalescence.

Couche intermédiaire

La première consiste à ajouter un fluide intermédiaire nommé IML, entre la dispersion des particules et la solution d'alginate. Celle-ci devrait permettre de localiser les particules au centre du jet composé et ainsi d'éviter de perturber la solution d'alginate. Nous avons donc déterminé la probabilité de coalescence du jet composé à différents rapports de débits entre le fluide intermédiaire et la dispersion de particules

$r_q = Q_{IML}/Q_{Coeur}$. Les résultats sont présentés sur la Figure III. 13 a. La probabilité de coalescence semble diminuer linéairement avec r_q, passant de 0,68 à 0,25 pour un rapport de débits de 6.

En ajoutant ce fluide intermédiaire, nous allons assimiler le débit du fluide de cœur du jet composé à la somme des débits de la dispersion et du fluide intermédiaire. De cette façon, nous pouvons déterminer une fraction volumique équivalente ϕ_{eq} :

$$\phi_{eq} = \phi \times \frac{Q_{coeur}}{Q_{coeur} + Q_{IML}} \qquad \text{(III. 6)}$$

Avec

$$r_q = \frac{Q_{IML}}{Q_{coeur}} \qquad \text{(III. 7)}$$

On peut alors exprimer la fraction volumique équivalente en fonction du rapport des débits :

$$\phi_{eq} = \phi \times \frac{1}{1 + r_q} \qquad \text{(III. 8)}$$

Les résultats de la probabilité de coalescence des gouttes en fonction de cette fraction volumique équivalente calculée sont reportés à la Figure III. 13 b. Afin de mettre en évidence l'effet du fluide intermédiaire, les résultats présentés sur la Figure III. 12 sont aussi reportés. Nous observons que pour une fraction volumique égale, la présence de l'IML induit une diminution de la probabilité de coalescence au sein du jet par rapport à la condition sans IML. Par exemple, à 1% de fraction volumique et de fraction volumique équivalente, nous obtenons respectivement une probabilité de coalescence de 0,58 et 0,38. Ainsi, en centrant les particules au centre du jet composé, nous limitons le champ de vitesse exploré par celles-ci.

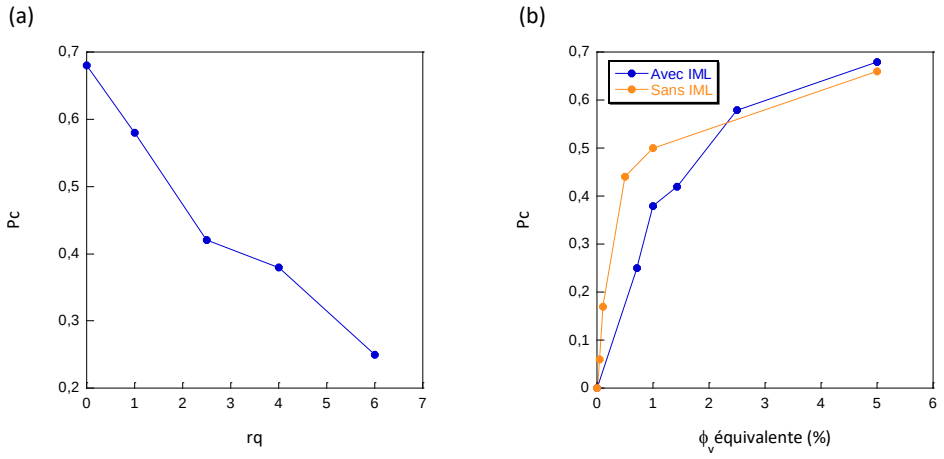

Figure III. 13 : (a) Probabilité de coalescence des gouttes au sein de la fragmentation du jet composé en fonction des rapports de débits entre le fluide intermédiaire et la dispersion de particules et (b) en fonction de la fraction volumique équivalente. Débit total Qtot = 210 mL.h-1. Le rapport de débits des fluides entre cœur + IML et coque est maintenu : Rq = 2. Tension appliquée = 20 V et fréquence = 1900 Hz.

Actuation

Il est également possible de réduire la probabilité de coalescence des gouttes en augmentant l'amplitude de la tension appliquée par l'actuateur piézoélectrique. Nous avons alors à nouveau évalué cette probabilité de coalescence en variant cette amplitude jusqu'à 80 V. Les résultats sont reportés à la Figure III. 14 a. Par cette méthode, nous parvenons à diminuer de trois fois le taux de coalescence.

Au cours de cette expérience, la fréquence de la perturbation harmonique a été déterminée de façon à obtenir aucun évènement de coalescence pour un jet composé d'un cœur de la phase continue ne contenant pas de particules et d'une coque d'alginate. Pour la condition étudiée, elle a été déterminée à 1900 Hz.

Une seconde méthode envisageable pour atténuer cette probabilité de coalescence est d'espacer les gouttes au sein de la fragmentation du jet composé. Ainsi nous avons mené une étude permettant d'évaluer la probabilité de coalescence en fonction de la variation de la fréquence appliquée. Les résultats sont présentés à la Figure III. 14b. Nous notons qu'à une fréquence de 1200 Hz la probabilité de coalescence est à sa plus basse valeur, de l'ordre de 0,05.

Finalement, en combinant l'effet de la tension et de la fréquence appliquées à l'aide de l'actuateur piézoélectrique, nous parvenons à une probabilité de coalescence de 0,02 (Figure III. 15).

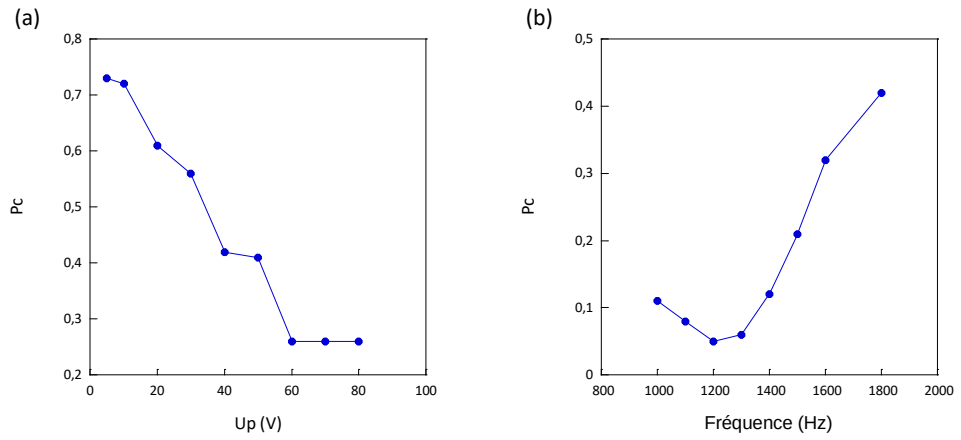

Figure III. 14 : Probabilité de coalescence des gouttes au sein de la fragmentation du jet composé en fonction de (a) l'amplitude de tension appliquée Up (la fréquence est constante et fixée à 1900 Hz) et (b) de la fréquence (la tension est fixée 40 V. Débit total Qtot=180mL.h-1. Rapport de débits des fluides Rq=2

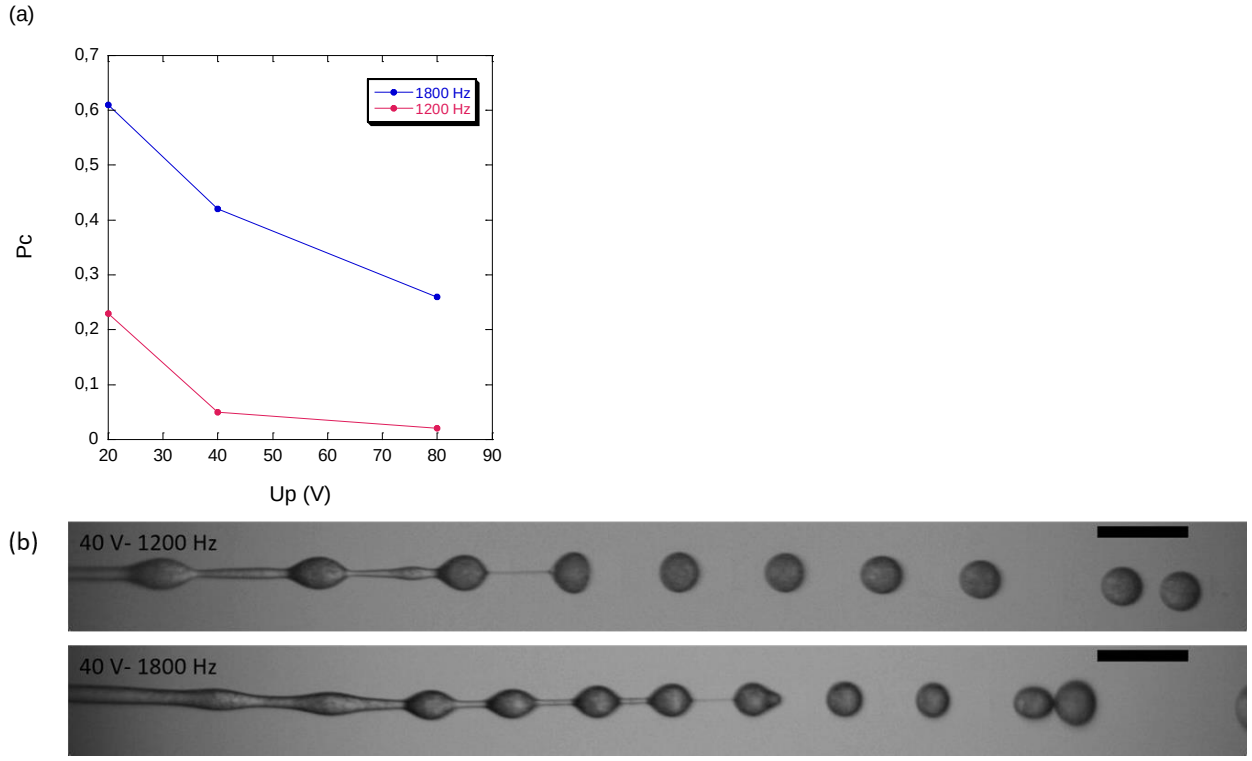

Figure III. 15 : (a) Probabilité de coalescence des gouttes au sein de la fragmentation du jet composé en fonction de la tension Up à deux fréquences,1200 et 1800 Hz. (b) Fragmentation des jets aux deux fréquences caractérisées par des longueurs d'ondes différentes. Débit total Qtot=180mL.h-1. Rapport de débits des fluides Rq=2. La barre d'échelle correspond à 1 mm.

IV. Formation de capsules possédant une matrice de collagène

Ce chapitre comporte quatre sections. A la première section, sont présentées de brèves généralités sur les suspensions colloïdales et les protéines. Les deux sections suivantes sont consacrées respectivement à la présentation de la protéine de collagène et à l'étude de la reconstruction de son hydrogel. Le mécanisme d'auto-assemblage des molécules est d'abord présenté puis l'influence des paramètres physico-chimiques sur la formation des fibres de collagène est étudiée. Une dernière section est dédiée à la présentation des phénomènes d'instabilité observés lors de la co-extrusion des solutions de collagène et d'alginate, à leur origine et enfin à l'approche envisagée pour former des capsules d'alginate possédant une matrice de collagène.

IV.1 Les suspensions colloïdales et les protéines

Les colloïdes sont des particules dont les dimensions sont de l'ordre de quelques nm jusqu'à quelques µm. Toutes les dispersions colloïdales sont dans un état physique susceptible d'évoluer en fonction des conditions physico-chimiques de leur milieu : on parle alors d'état métastable.

IV.1.1 Les forces qui régissent les suspensions colloïdales

La stabilité d'une suspension colloïdale est régie par le type d'interaction mises en jeu entre les particules. Les principales interactions impliquées dans une suspension de particules sont les interactions de van der Waals, les interactions électrostatiques et les interactions stériques. D'autres interactions de plus faibles énergies et/ ou de plus courte portée existent telles que les forces de solvatation (interactions entre les particules et le solvant) et les interactions hydrophobes.

Les forces attractives inter-particulaires de Van der Waals

Les forces d'attraction entre particules nommées interactions de Van der Waals sont similaires à celles présentes entre les molécules décrites par London. Ces interactions reposent sur la présence d'un dipôle électrique au sein de la molécule. Les électrons autour des noyaux des molécules sont en mouvement constant. A chaque instant la répartition des charges électriques varie ce qui crée le champ électrique. Ce champ électrique peut influencer la répartition des charges de la molécule voisine, induisant à son tour un dipôle. On parle alors de dipôles induits. L'interaction entre ces deux dipôles induits crée une attraction. La force de cette attraction dépend des facteurs suivants : la distance entre les molécules,

leur polarisabilité, et le potentiel d'ionisation. D'autres forces existent entre dipôles : les forces de Keesom entre dipôles permanents et les forces de Debye entre un dipôle permanent et un dipôle induit.
Contrairement à l'échelle moléculaire, cette force entre les particules provenant des fluctuations de mouvements des électrons est de plus longue portée. En effet, la force d'attraction résulte de la somme des interactions de pair entres les molécules qui composent les deux particules. La constante Hamaker notée *A*, tient compte de cette propriété additive et dépend de la nature du matériau. L'énergie potentielle d'attraction entre deux particules sphériques de même rayon est donnée par l'équation suivante :

$$V_{vdW} = -\frac{A}{6}\left[\frac{2\,r^2}{D^2 - 4r^2} + \frac{2\,r^2}{D^2} + \left(ln\,1 - \frac{4\,r^2}{D^2}\right)\right] \qquad \text{(IV. 1)}$$

avec r étant le rayon des sphères et D la distance entre les surfaces.
Si la distance entre les deux sphères diminue considérablement, autrement dit D devient faible par rapport à r alors l'équation se simplifie :

$$V_{vdW} = -\frac{Ar}{12\,D} \qquad \text{(IV. 2)}$$

Les forces électrostatiques

Les protéines sont des polyélectrolytes et sont considérées comme des systèmes colloïdaux très complexes du fait de leur diversité en termes de densité de charges électriques, de propriétés chimiques de surface et de leur taille. Ici, nous assimilons les protéines à des particules chargées.

Pour maintenir un système de charge globale neutre, des ions de charge opposée à celles des charges en surface, appelés contre-ions sont présents dans le solvant autour des particules chargées. Ces contre-ions sont maintenus à la surface de la particule chargée par attraction électrostatique et constituent une couche de charges électriques appelée double couche électrique. Cette configuration des contre-ions autour des charges présentes à la surface des particules est maintenue grâce à l'hydratation *via* la présence de molécules d'eau. Les particules en suspension qui présentent à leur surface les mêmes groupements ionisés se repoussent du fait de leur charge électrique de même signe. Cette répulsion électrostatique contre balance toute force attractive entre les particules.

La double couche électrique est constituée de deux régions : une région interne composée de contre-ions fortement liés à la surface des particules appelée couche de Stern et une région diffuse, au-delà de la couche de Stern contenant l'excès de contre-ions appelée couche d'hydratation ou diffuse (Figure IV. 1). Dans cette couche diffuse (couche de Gouy-Chapman), la distribution des contre-ions est balancée par l'entropie et les forces d'attraction. Dans cette couche, le potentiel électrique décroît de façon exponentielle avec pour grandeur caractéristique la longueur de Debye, notée κ^{-1} et qui donne l'ordre de grandeur de l'épaisseur de la couche diffuse.

$$\kappa^{-1} = \sqrt{\frac{\varepsilon \kappa_B T}{2 N_A \, e^2 I}} \qquad \text{(IV. 3)}$$

Avec ε la permittivité diélectrique du solvant, κ_B la constante de Boltzmann, T la température (en Kelvin), N_A la constante d'Avogadro, e la charge élémentaire et I la force ionique (en mol.m^{-3}).
La force ionique est donnée par l'équation suivante :

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{n} c_i \, z_i^2 \qquad \text{(IV. 4)}$$

avec
c_i la concentration ionique
z_i la charge ionique

Dans la couche de Stern, le potentiel évolue linéairement entre ϕ_0 (potentiel à la surface) et ϕ_s (potentiel sur le plan de Stern) puis exponentiellement dans la couche diffuse.

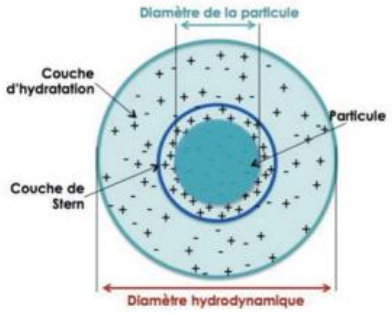

Figure IV. 1 : Représentation schématique d'une particule chargée avec ses couches d'hydratation et de Stern. Image issue de Mainard et al.,[93]

L'énergie électrostatique entre deux particules sphériques avec une faible distance D les séparant est donnée par l'équation suivante :

$$V_{el} = 2\pi\, \varepsilon\, r\, {\phi_0}^2\, e^{-\kappa D} \qquad \text{(IV. 5)}$$

avec ϕ_0 le potentiel électrique de surface de la particule et *D* la distance entre les particules.

Théorie de DLVO

Le principe de cette théorie repose sur le fait que la stabilité d'une dispersion est déterminée par la somme des forces attractives et répulsives entre les particules. L'attraction mutuelle des particules est une conséquence des forces de dispersion appelées forces de London-van der Waals et la répulsion mutuelle, celle des interactions entre les doubles couches électriques. La Figure IV. 2 illustre le potentiel total d'interactions qui résulte des deux composantes. L'énergie totale s'écrit alors :

$$V_T = V_{el} + V_{vdW} = 2\pi\, \varepsilon\, r \phi_0^2 e^{-\kappa D} - \frac{Ar}{12\mathrm{D}} \qquad \text{(IV. 6)}$$

La contribution des interactions attractives et répulsives dépend à la fois de la charge surfacique des particules et de la force ionique du milieu. Plusieurs cas de figures sont possibles et sont présentés à la Figure IV. 2.

- lorsque la force ionique est faible et/ou que le potentiel électrique de surface est élevé, les particules sont soumises à des interactions répulsives suffisamment importantes ;

- lorsque la force ionique augmente, le potentiel électrostatique total diminue et présente un minimum de faible profondeur appelé minimum secondaire. Ce dernier peut être contrebalancé par l'énergie thermique ;
- enfin au-delà d'une certaine force ionique, le potentiel diminue davantage jusqu'à atteindre le minimum primaire. L'attraction des particules est alors favorisée par l'agitation thermique qui dépasse la barrière énergétique. Dans ce cas, l'agrégation est irréversible.

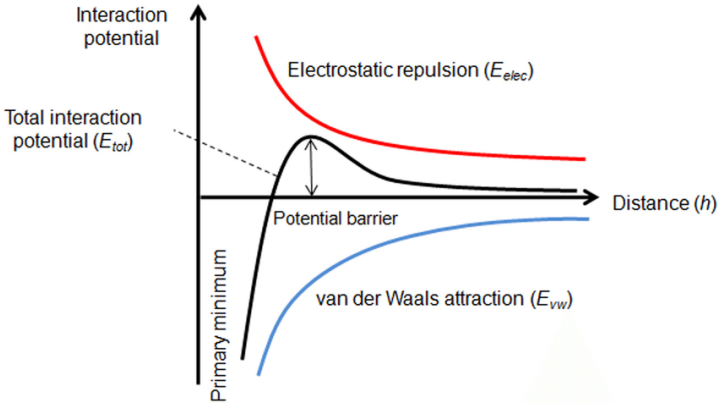

Figure IV. 2 : Représentation schématique du potentiel d'interaction entre particules tel défini par la théorie DLVO.

Répulsion stérique

Pour maintenir la stabilité colloïdale, une autre alternative à l'interaction répulsive est la répulsion stérique. Celle-ci est établie soit par adsorption de chaînes de polymères soit par greffage à la surface de la particule (Figure IV. 3). L'estimation de cette énergie répulsive est multifactorielle. Elle dépend du type de polymère, du degré de polymérisation et de la densité du polymère à la surface de la particule.

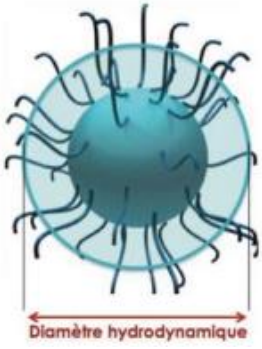

Figure IV. 3 : Représentation schématique de la répulsion stérique d'une particule. Image issue de Mainard *et al.*,[93]

IV.1.2 Les protéines

Les protéines constituent une des quatre grandes catégories de macromolécules retrouvées dans l'organisme vivant et composent leur structure.

En termes de structure chimique, une protéine est composée d'une séquence d'acides aminés reliés par une liaison peptidique. Les protéines sont constituées d'un panel de 20 acides aminés. Ces acides aminés ont tous la même structure de base : ils sont orientés autour d'un atome de carbone central, le carbone α sur lequel s'articulent le groupe carboxylique et le groupe amine, un atome d'hydrogène et un groupement latéral noté R (Figure IV. 4). C'est la nature de ce groupement latéral qui distingue les acides aminés entre eux et qui est également impliqué dans la liaison peptidique.

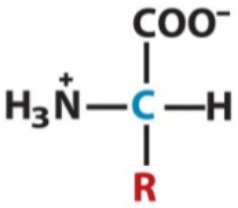

Figure IV. 4 : Structure générale d'un acide aminé. Le groupement R lié au carbone est spécifique pour chaque acide aminé. Image issue de Nelson et al.,[94]

La structure des protéines est définie sous quatre niveaux d'organisation :

- la structure ***primaire*** correspond à la séquence d'acides aminés liés de façon covalente et formant une chaîne polypeptidique ;
- la structure ***secondaire*** réfère à la structure spatiale adoptée par des acides aminés adjacents sur une portion seulement de la protéine. Les liaisons hydrogènes jouent un rôle important pour stabiliser les conformations de structures secondaires. Les deux types principaux sont l'hélice α et le feuillet β.
- la structure ***tertiaire*** implique le repliement dans l'espace de toute la chaîne polypeptidique. Elle implique plusieurs éléments de structure secondaire qui vont interagir entre eux *via* différents types d'interactions : liaisons hydrogène, interactions électrostatiques, interactions de type Van der Waals, interactions hydrophobes et ponts disulfures. Ce repliement est absolument requis pour que la protéine soit fonctionnelle. Deux types de structures tertiaires existent : la protéine fibreuse en bâtonnet (exemple du collagène) et la protéine globulaire (exemple de la myoglobine) ;

- la structure ***quaternaire*** implique plusieurs sous-unités qui interagissent les unes avec les autres *via* des forces d'interactions faibles (liaisons hydrogènes, Van der Waals, ioniques, hydrophobes) et/ou des ponts disulfures.

IV.2 Le collagène

Diversité et composition

Les protéines de collagène appartiennent à la famille des protéines fibreuses et sont retrouvées chez tous les organismes multicellulaires. Elles constituent le composé majoritaire de l'armature des os, des ligaments et de la peau (derme). Le collagène représente 25 % (en masse sèche) de la masse protéique totale chez l'animal.[95,96] Il existe plus d'une vingtaine de types qui se différencient principalement par leur localisation et leur fonction physiologique.[97]

Dans ce manuscrit, nous nous sommes focalisés sur la protéine de collagène de type I, qui représente 90% de l'ensemble des protéines de collagène. Le collagène de type I est le composant majoritaire de la matrice extracellulaire des tissus conjonctifs. Il est constitué d'une séquence répétitive des acides aminées [Gly-X-Y_n] où les acides aminés en position Xaa et Yaa sont souvent une proline (Pro, 28%) et une 4-hydroxyproline (Hyp, 38%) respectivement. Ainsi ProHypGly est le triplet le plus abondant (10,5%) au sein de la molécule de collagène.[98] Les structures chimiques de ces acides aminés sont illustrées à la Figure IV. 5. Dérivée de la proline, l'hydroxyproline est un acide aminé qui a subi une hydroxylation sur le cycle pyrrolidine en position 4.[99]

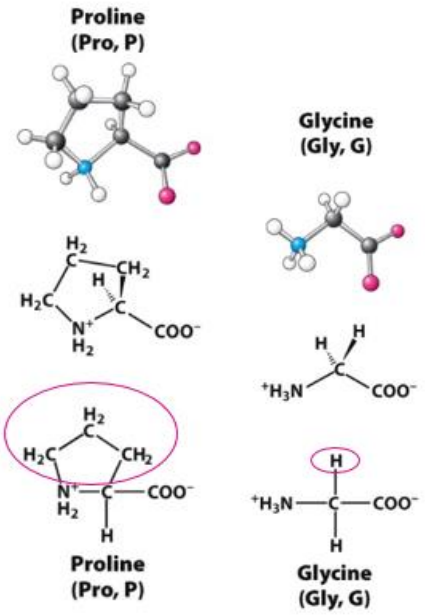

Figure IV. 5 : Structure chimique de la proline et de la glycine. Les groupements chimiques encerclés représentent les groupements latéraux. Image issue de Biochemistry, Seventh Edition© 2012 W.H. Freeman and Company.

Le radical de la proline et de l'hydroxyproline comprend trois carbones saturés dont le dernier est lié à la fonction α-aminée incluse dans la liaison peptidique. Le tout forme un noyau pyrrole (soit quatre atomes de carbone et un atome d'azote). Ce sont les seuls acides aminés qui possèdent une fonction amine secondaire, d'où leur nom plus approprié d'imino-acides (Figure IV. 6). L'hydroxyproline est un constituant spécifique du collagène. Une méthode de dosage de la protéine de collagène est d'ailleurs basée sur cette caractéristique.[100] La présence de ces acides aminés dans la structure primaire de la protéine empêche la constitution des liaisons hydrogènes de la structure secondaire.

Ces acides aminés confèrent également à la rigidité de la structure secondaire de la protéine de collagène et permet d'améliorer la stabilité thermique de celle-ci. Les résidus de glycine, positionnés face à face à l'intérieur de la triple hélice favorisent sa compaction. Les résidus de proline et d'hydroxyproline, quant à eux, sont exposés au solvant et stabilisent la conformation de la triple hélice[101].

La composition en acides aminés du collagène de type I provenant de l'os et du tendon est donnée au Tableau IV. 1[102].

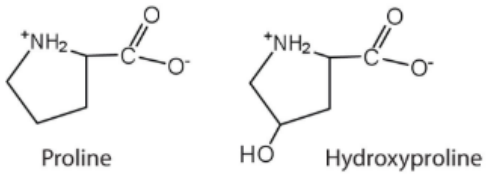

Figure IV. 6 : Structures chimiques de l'hydroxyproline et de son précurseur

Tableau IV. 1 : Composition en acides aminés du collagène dans l'os et le tendon. Les chiffres sont exprimés en grammes d'azotes pour 100 g d'azote total.

	Bone collagen	Tendon collagen, acid extract
Duration of hydrolysis (hr.) ...	24	24
Alanine	9·3	9·0
Glycine	26·2	26·4
Valine	1·93	2·07
Leucine	2·09	2·12
Isoleucine	1·09	0·91
Proline	10·1	10·3
Phenylalanine	1·15	1·15
Tyrosine	0·36	0·30
Serine*	2·94	3·00
Threonine*	1·50	1·51
Cystine	†	†
Methionine‡	0·43	0·47
Arginine	15·4	16·0
Histidine	1·41	1·31
Lysine	4·59	3·51
Ornithine	0·0	0·0
Aspartic acid	3·84	3·94
Glutamic acid	5·9	5·9
Amide§	3·06	3·59
Hydroxyproline	8·2	7·5
Hydroxylysine	0·58	1·45
Total	100·1	100·4

Structure du collagène de type I

La protéine de collagène est composée de deux séquences α1 et d'une séquence α2. Ces séquences peptidiques ont une composition en aminoacides similaire et sont constituées de 1024 résidus. Elles sont enroulées en une triple hélice contenant trois domaines : le domaine contenant le groupement amine terminal de l'hélice (-NH2), la triple hélice et le domaine contenant le groupement carboxylique (-COOH). Le principal domaine de l'hélice représente 95% de la molécule. La molécule de collagène présente une longueur d'environ 300 nm et un diamètre autour de 1,5 nm.[103]

En 1951, Pauling *et al.* ont montré que la molécule est constituée de trois chaînes polypeptidiques enroulées en une hélice et maintenues grâce à des liaisons hydrogène. En 1954, en s'appuyant sur des

travaux de diffraction, Ramachandran *et al.* ont avancé que la triple hélice de collagène est constituée de trois chaines polypeptidiques enroulées gauche, indiquant que les liaisons peptidiques sont en conformation *trans* et que deux liaisons hydrogène sont impliquées dans chaque triplet. Une liaison hydrogène est formée entre le groupement -NH du résidu glycérine et le groupement -CO du résidu de la seconde position du triplet de la séquence peptidique voisine. Une autre liaison est formée entre molécule d'eau et le groupent hydroxyl de l'hydroxyproline située sur la troisième position du triplet [Gly-X-Y].

En 1955, la structure de la triple hélice de collagène a été finalement définie, par Rich *et al.* et par Cowan et ses collaborateurs.[104,105,106] Ils précisent que les chaînes polypeptidiques sont liées par une seule liaison hydrogène à chaque triplet et présentent une symétrie hélicoïdale avec un pas de 28,6 Å. Cette triple hélice de collagène est également caractérisée par un nombre de 3,33 résidus par tour d'hélice et une translation des unités successives de 0,29 nm parallèlement à l'axe de l'hélice (Figure IV. 7). [107]

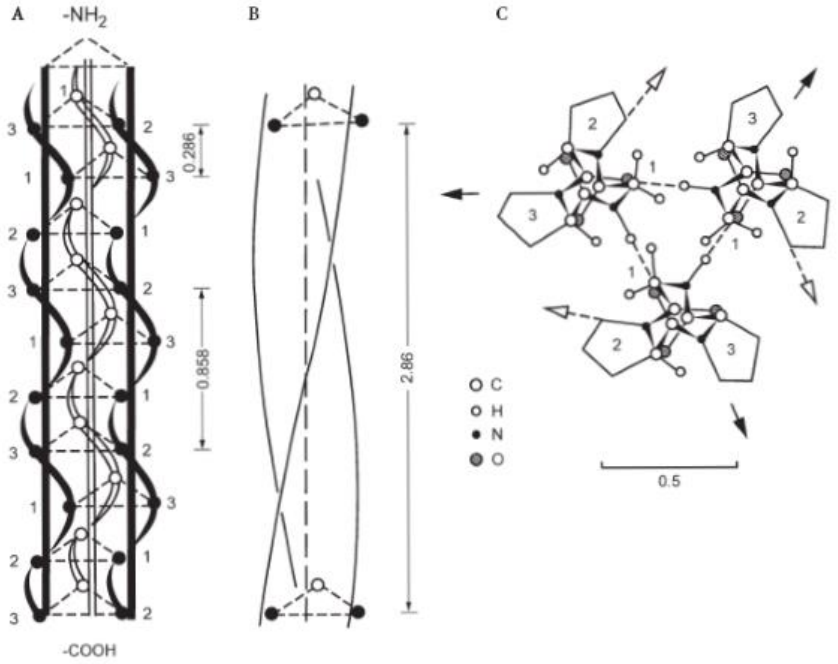

Figure IV. 7 : Modèle de la triple hélice de collagène. Structure de la séquence (Gly-Pro-Pro)n où la glycine est désignée par le numéro 1, la proline en position X-position par le 2 et la proline en Y-position par le chiffre 3. A) et B) correspondent aux vues de côté et C) à la vue de dessus en direction de l'axe de l'hélice. Les trois chaînes sont connectées par des liaisons hydrogène entre le groupement amine de la glycine et le groupement carboxylique de la proline en position Y. Les flèches indiquent les directions dans lesquelles les noyaux pyrroles émergent de l'hélice. Les distances résidu-résidu sont indiquées en nm. Image issue de la référence[107].

Une matière première naturelle

Le collagène de type I est très abondant dans de nombreux tissus et peut être isolé et purifié. Plusieurs chercheurs ont montré que la source de la protéine de collagène influence grandement les propriétés de l'hydrogel.[108,109] Par ailleurs, il a été montré que la méthode par laquelle le collagène est extrait des tissus peut altérer ou modifier la structure moléculaire des fibrilles ainsi que la cinétique d'agrégation.[110] L'extraction acide est la méthode la plus utilisée pour les matrices de collagène peu réticulées, telles que les tendons de queue de rat. Alors que pour les matrices présentant de nombreux points de réticulation, une méthode combinant une extraction acide et une précipitation saline est souvent utilisée pour solubiliser la matrice provenant du derme d'origine porcine ou bovine. Les sources de collagène, les méthodes de solubilisation et la nature des solvants utilisés sont autant de combinaisons possibles pour la préparation de la solution stock de collagène.

Les tendons de queue de rat représentent la première source de collagène.[97,111] La majorité des travaux utilisant du collagène de type I ont été réalisés à une concentration de 2 mg/mL. Cependant, certains gels sont préparés à des concentrations relativement élevées au-dessus de 20 mg/mL. Il a été montré que ces gels présentent une structure trop dense pour permettre la migration des cellules et assurer la viabilité cellulaire.[112]

Comme toute source naturelle, la composition des solutions stock de collagène présente une variabilité inter-lot. Par conséquent, au cours de ces travaux, nous avons utilisé le même lot de collagène au cours d'une même étude.

IV.3 Reconstruction d'un hydrogel de collagène

La biosynthèse du collagène de type I est restreinte essentiellement à deux types cellulaires : les ostéoblastes et les fibroblastes. Les deux chaînes polypeptidiques α1 et α2 sont produites dans un rapport stœchiométrique 2 : 1. Les chaînes polypeptidiques de tropocollagène sont d'abord synthétisées au niveau du réticulum endoplasmique (RE). Ces chaines sont associées les unes aux autres après la formation des ponts disulfures au domaine C-terminal. Le trimère de tropocollagène est clivé aux domaines N- et C-terminaux par l'action de protéases. Enfin, les triples hélices de collagène s'auto-assemblent en fibrilles (Figure IV. 8).

In vitro, la formation d'un hydrogel de collagène repose sur l'auto-assemblage des molécules de collagène formant des clusters par percolation. Elle se produit aux conditions physiologiques de température entre 25 et 37°C, de pH entre 7 et 7.4, et de force ionique approximative de 0.2 mM.[113] Cependant, lors des essais de reconstruction de l'hydrogel, à l'instant où les conditions physico-chimiques le permettent, les molécules peuvent former différents types d'agrégats. Ces différentes structures qui se distinguent des fibres natives par une absence de périodicité au niveau des fibrilles ont été observées par microscopie électronique[114].

Il est bien connu que les propriétés mécaniques de l'hydrogel de collagène sont directement liées à la structure de ses fibres, et que le comportement cellulaire est influencée par les propriétés mécaniques du réseau de collagène[95]. Ainsi, il est important de travailler aux conditions physico-chimiques physiologiques pour former des fibres de collagène natives. Pour cela, il est judicieux de comprendre l'influence des paramètres physico-chimiques sur la formation de ces fibres pour pouvoir contrôler leur structure.

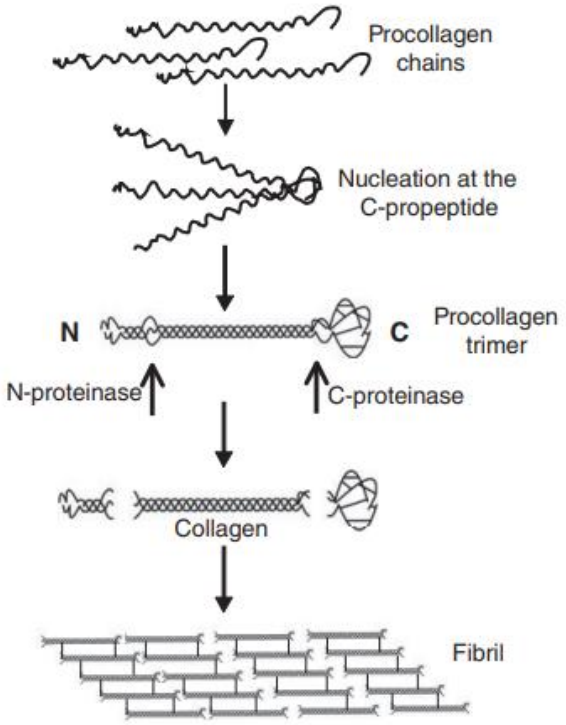

Figure IV. 8 : Représentation schématique des étapes impliquées dans la formation de fibrilles par les fibroblastes. Les chaînes de procollagène sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique (RE), assemblées par des interactions au domaine C-terminal pour former une triple hélice. Dans l'appareil de Golgi, le clivage de la triple hélice de collagène est réalisé par des protéases pour former des molécules de collagène. Celles-ci peuvent alors s'auto-assembler en fibrilles. Des réticulations chimiques sont formées entre les triples hélices de collagène au sein des fibrilles. Image issue de Canty et al.,[115]

IV.3.1 Le mécanisme de fibrillogenèse *in vitro*

Le mécanisme par lequel les molécules de collagène s'assemblent en fibres a fait l'objet d'intenses recherches depuis les années 1950. Il s'agit d'un mécanisme multi-étape qui se produit spontanément à pH neutre et à température physiologique. Les études *in vitro* sur la fibrillogenèse du collagène montrent que la croissance des fibres repose sur l'addition linéaire et latérale des molécules et agrégats de collagène. La formation des fibres se décompose en deux principales phases : une phase de latence et une phase de croissance. Des études datant des années 1960 montrent que la croissance des fibres se produit à la suite d'une phase de latence où sont formés les précurseurs fibrillaires.

Le mécanisme de formation des fibrilles au cours de la phase de latence reste toujours méconnu. Deux principales théories se confrontent, celle d'un mécanisme multi-étapes[110,116] où des sous unités fibrillaires s'ajouteraient linéairement et celle d'un mécanisme où des monomères de collagène viendraient s'ajouter à un site de nucléation. [117,118] A la fin de la phase de latence, les unités de collagène formées pendant cette phase subissent une agrégation latérale pour former des sous-unités micro fibrillaires. Ces sous unités fibrillaires composées de cinq trimères s'associent linéairement et latéralement pour former des fibrilles Figure IV. 9 [119] alors que Comper et ses collaborateurs montrent qu'il n'y a pas de formation d'agrégats au cours de cette phase de latence d'après des mesures de viscosité.[117] Silver et ses collaborateurs déclarent que les monomères de collagène forment des dimères ou trimères linéaires de longueur 4D avant l'étape d'agrégation latérale. D'autres études montrent que de longs et fin agrégats se forment au cours de la phase de latence qui par la suite s'agrègent latéralement au cours de la seconde phase de croissance.[110]

La microscopie électronique et les mesures de rayons X sont les principales techniques utilisées pour sonder la structure des fibrilles de collagène. La cristallographie rayons X est une technique utilisée pour déterminer la structure tridimensionnelle des molécules dont les macromolécules biologiques complexes telles que les protéines ou les acides nucléiques. Il s'agit d'une technique performante pour élucider la structure à l'échelle atomique. Les données de diffraction sont réalisées sur la molécule à l'état de cristal où les atomes sont ordonnés de façon répétée. Basée sur ces patterns de diffraction, la densité électronique peut être reconstruite.

Les patterns de diffraction rayons X ont révélé une même structure axiale pour tous les tissus mais des patterns différents pour la structure latérale selon l'origine du tissu. [120] Le pattern axial a été caractérisé par Hodge-Petruska[121] et met en évidence une périodicité de 67 nm nommée D le long de l'axe de l'hélice.

La longueur de la molécule de collagène est de 300 nm soit approximativement équivalent à 4.4 D. Les groupements terminaux des monomères de collagène sont espacés de 0.53 nm.

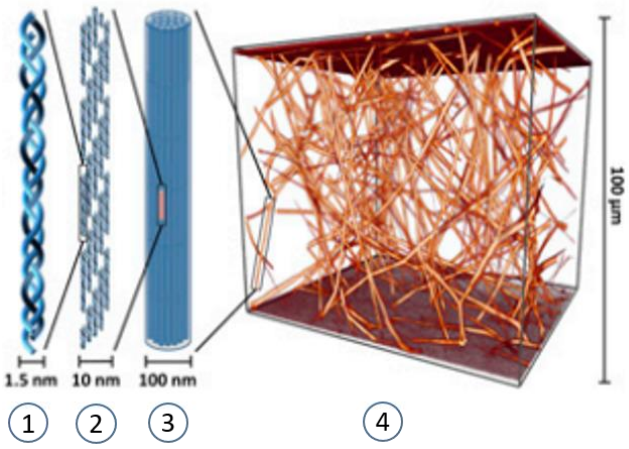

Figure IV. 9 : Représentation schématique de l'auto-assemblage des molécules en réseau fibrillaires de collagène. Les différents niveaux d'assemblages sont représentés par les numéros. 1 : triple hélice de collagène. 2 : fibrille. 3 : fibre. 4 : réseau de fibres. Image adaptée de Licup *et al.*[122]

IV.3.2 L'influence des paramètres physico-chimiques sur l'agrégation du collagène

La formation des fibres de collagène est un processus complexe qui fait intervenir un grand nombre d'éléments physico-chimiques et biologiques. Plusieurs études montrent que le pH, la température, la force ionique, la présence de surfactants, de sucres et l'absence des domaines non hélicoïdaux de la molécule de collagène par digestion enzymatique sont autant de paramètres qui influencent la formation des fibrilles de collagène.

Dans cette partie, nous étudierons l'effet des principaux facteurs physico-chimiques sur la cinétique d'agrégation du collagène et les propriétés mécaniques de l'hydrogel dans le cas d'une reconstruction d'une matrice de collagène de type I. La compréhension de l'effet de chaque paramètre physico-chimique sur la gélification du collagène nous permettra d'envisager une stratégie pour inhiber voire limiter la gélification au cours du procédé d'encapsulation.

La température

Il est bien connu que la température est un des facteurs importants dans la formation fibrillaire du collagène. La variation de turbidité des solutions de collagène à trois températures : 4°C, 20°C et 37°C au bout d'une heure à l'état macroscopique est représentée à la Figure IV. 10. Les solutions de collagène ont été préparées à 2mg/mL à pH 7,35. Initialement les trois solutions sont transparentes (Figure IV. 10 a). Au bout d'une heure, nous observons que les solutions incubées à température ambiante et à 37°C deviennent nettement turbides, alors qu'à 4°C la solution reste transparente au bout d'une heure. Nous notons cependant une différence d'opacité entre les solutions turbides, la solution à 20°C est la plus opaque (Figure IV. 10 b). A basse température, le collagène ne semble pas gélifier. De plus, par un simple test de renversement, nous déduisons que ces solutions turbides forment un gel (Figure IV. 10 c).

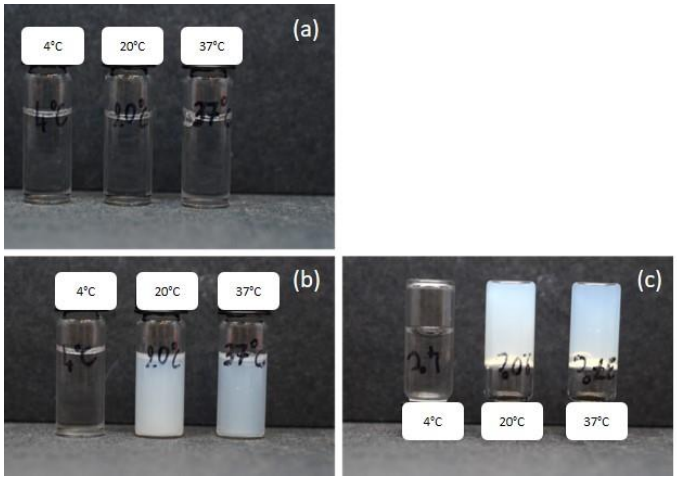

Figure IV. 10 : (a) A t=0, les solutions incubées préalablement à 4°C, 20°C et 37°C sont transparentes. (b) A 20°C et 37°C, les solutions deviennent turbides. Une différente d'opacité entre ces solutions est observée. (c) Formation de gel à 20°C et 37°C montré par un test de renversement.

Des cinétiques de gélification ont été réalisées par mesure d'absorbance au cours du temps aux mêmes températures que l'expérience précédente. Les résultats sont reportés à la Figure IV. 11. Ces cinétiques présentent des allures différentes. La variation en température du milieu influence grandement le taux de gélification du collagène. On remarque que le taux de gélification augmente aux températures croissantes. Nous déterminons des taux de gélification de 0,045 min^{-1} et 0,104 min^{-1} pour les températures de 20°C et 37°C respectivement. En effet, l'élévation de la température de 20°C à 37°C induit une gélification du collagène approximativement deux fois plus rapide. La durée de la phase de latence varie

dans le sens inverse du taux de gélification. Nous déterminons des temps de latence de 8 minutes et nul à 20°C et 37°C respectivement. Plusieurs travaux confirment ces résultats.[110] Nous remarquons également qu'à 20 °C, l'absorbance maximale atteinte au bout d'une heure est plus élevée que celle atteinte à 37°C. A 4°C, nous notons que l'absorbance reste nulle au bout d'une heure. Il a clairement été montré que l'absorbance maximale est liée à la taille des fibres. En effet, plus les fibres sont épaisses et plus l'intensité de lumière absorbée est élevée.

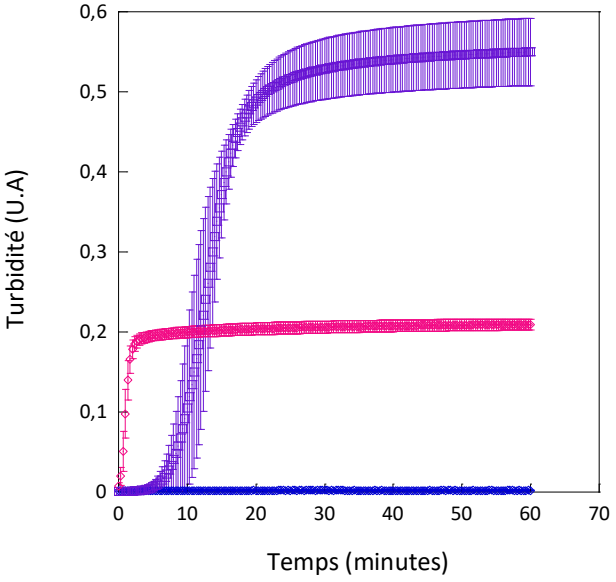

Figure IV. 11: Cinétique d'agrégation du collagène à différentes températures. Mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 340 nm au cours du temps à 4°C, 20°C et 37°C.

La microscopie électronique est très utilisée pour étudier la structure fibrillaire du collagène ainsi qu'à analyser son état d'agrégation. Elle permet de s'affranchir de la limite de résolution optique mais reste limitée en terme de champ de vision (de l'ordre de quelques dizaines de µm) comparée à d'autres techniques comme la microscopie optique de second harmonique.[123]

D'après la Figure IV. 12, il apparait clairement que la température affecte la morphologie des fibres. Nous remarquons qu'en élevant la température de 28°C à 37°C, les fibrilles apparaissent plus fines et la périodicité caractéristique D devient moins visible à 37°C. Ces résultats sont donc cohérents avec les mesures d'absorbance présentées à la Figure IV. 11.

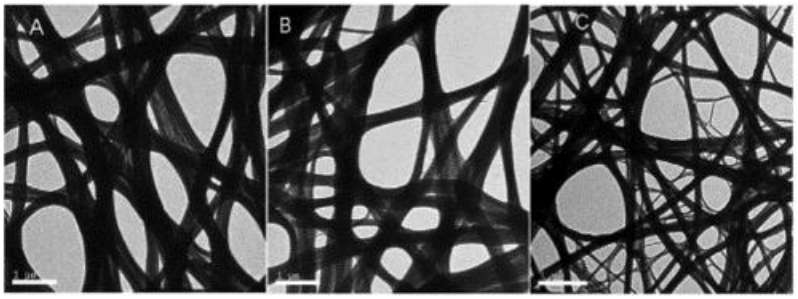

Figure IV. 12 : Images prises par TEM des fibrilles de collagène à différentes températures. Les fibrilles sont repectivement formées à 28°C (a), 30°C (b) et 37°C. La concentration en collagène est de 2.5mg.mL^{-1}. La barre d'échelle correspond à 1 µm. Image issue de Y. Li

La cinétique de gélification du collagène a également été étudiée par mesures rhéologiques. Un test dynamique en oscillation a été réalisé aux trois températures (4°C, 20°C et 37°C). Au préalable, la gamme de linéarité viscoélastique a été définie pour chaque température. Pour cela, le protocole suivant a été utilisé :

- L'échantillon est déposé sur le plan peltier à l'aide d'une seringue ;
- Il est ensuite soumis à un temps de repos d'une heure pour atteindre l'équilibre dans le cas de la formation d'un gel pour les températures de 20°C et 37°C.
- Un test de déformation en stress est appliqué aux amplitudes comprises entre 0,01 et 10 Pa. Le test prend fin lorsque les modules complexes varient significativement. Ainsi une amplitude de déformation de 0,1 Pa a été déterminée. Puis le même échantillon est soumis successivement à un test d'oscillation de balayage en fréquence de 0,01 à 100 Hz.

  Les spectres viscoélastiques de trois gels de collagène formés au bout d'une heure aux trois températures sont présentés à la Figure IV. 13. Les modules complexes nous indiquent qu'à 20°C et 37°C, le collagène est à l'état de gel mou alors qu'à 4°C le collagène est maintenu à l'état liquide. Nous notons également que le module élastique à 20°C du gel est plus important qu'à 37°C, soit deux fois plus élevé. Ceci s'explique par le fait qu'à 37°C, l'agrégation longitudinale est favorisée et résulte en des fibres plus fines et longues. Ainsi l'élasticité du gel est moindre.

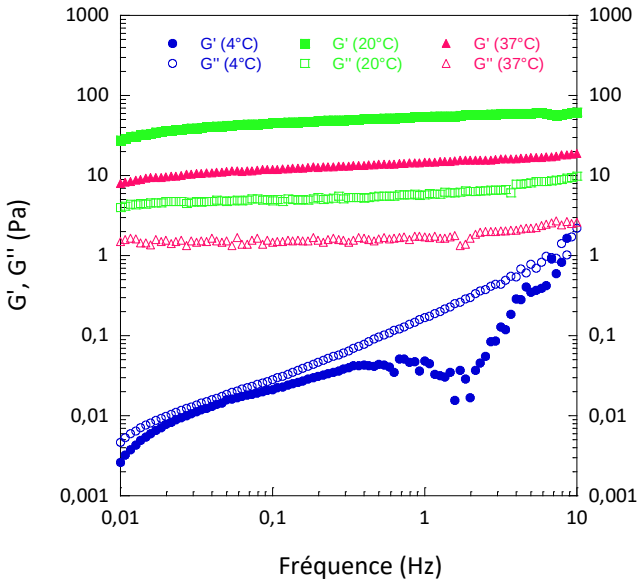

Figure IV. 13 : Spectres viscoélastiques en fréquence d'une solution de collagène diluée à 2 mg.mL^{-1} dans du tampon PBS à différentes températures au bout d'une heure.

Au vu de l'ensemble des résultats obtenus sur l'effet de la température sur la gélification du collagène à pH neutre, il apparait qu'à 4°C la gélification du collagène est inhibée à pH neutre. De ce fait, nous envisageons de préparer la solution de collagène à cette température.

La concentration en collagène

L'agrégation du collagène à différentes concentrations de 0,5 à 2 mg/mL a été étudiée à 20°C. Les courbes de cinétiques sont reportées à la Figure IV. 14. Le taux de gélification ainsi que la valeur d'absorbance maximale, sont tous deux grandement affectés par la concentration. En effet, en augmentant la concentration, l'absorbance maximale augmente. La Figure IV. 15 b indique que l'absorbance maximale est liée linéairement à la concentration en collagène. Ceci est confirmé par d'autres auteurs.[110,124,125] Cette mesure d'absorbance reflète le diamètre des fibres : plus les fibres formées sont larges et plus l'absorbance finale est élevée.[126]

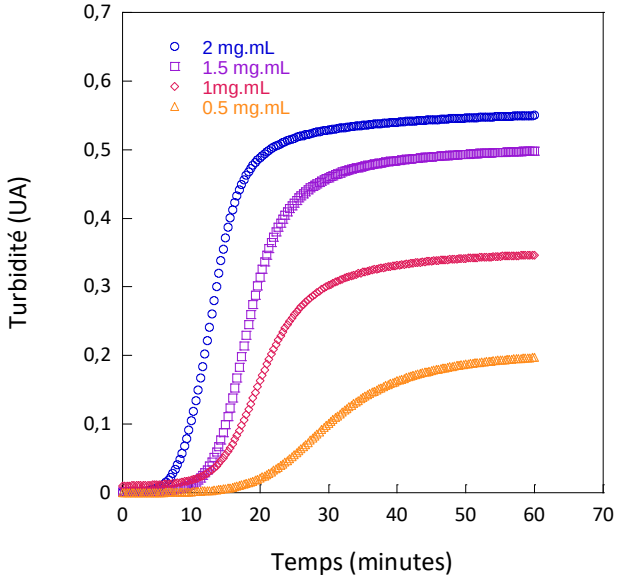

Figure IV. 14 : Effet de la concentration sur la cinétique de formation des fibrilles de collagène. Conditions : 20°C, tampon phosphate salin et pH 7.4. λ= 340 nm.

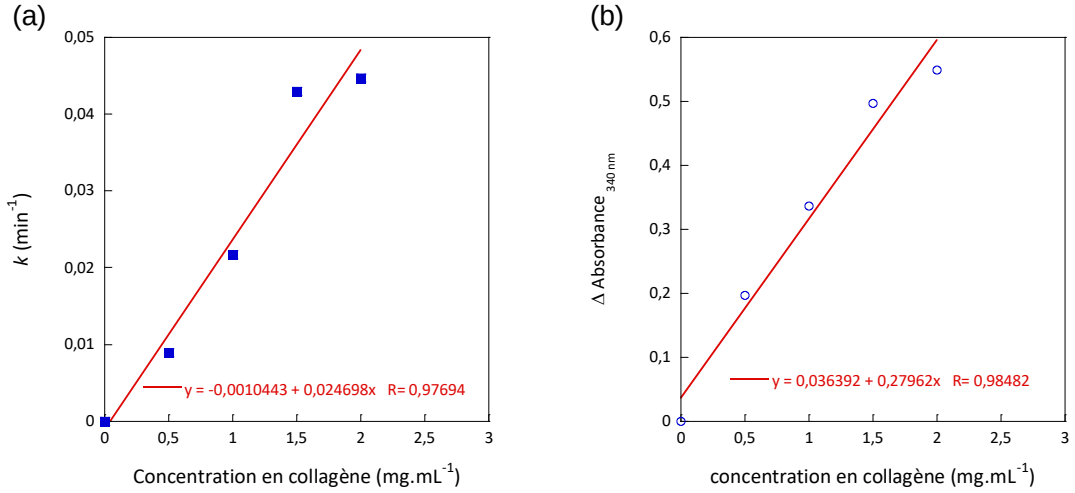

Figure IV. 15 : (a) Relation linéaire entre la constante k (taux de gélification) et la concentration en collagène. (b) relation linéaire entre la variation d'absorbance à 340 nm et la concentration en collagène.

Le pH

Yuping *et al*.[127] ont étudié l'effet du pH sur la fibrillogenèse par mesure de turbidité et microscopie électronique. Il montre que la morphologie des fibrilles de collagène varie grandement en fonction des conditions de pH. A pH faible des fibrilles de différentes tailles sont formées où les plus fines ne présentent pas de périodicité caractéristique. Cependant aux conditions de pH plus élevé les fibrilles apparaissent plus uniformes. En termes de cinétique, la fibrillogenèse est relativement inhibée aux conditions de pH légèrement acides aux alentours de 6,5 alors qu'à pH au-dessus de 8 c'est l'effet inverse.

Les charges des groupements ionisables des molécules de collagène sont pH-dépendant et sont impliqués dans les interactions électrostatiques. En fonction des conditions de pH, la protéine caractérisée par son point isoélectrique pI, est soit chargée positivement (pH<pI) soit négativement (pH>pI). Lorsque le pH se rapproche du pI de la protéine, la charge globale de surface des monomères de collagène est réduite, ce qui minimise les répulsions électrostatiques et favorisent l'agrégation des molécules de collagène.
Des mesures du potentiel zeta ont été réalisées sur l'échantillon de collagène à 25°C. La variation du pH de la solution est obtenue par ajout d'hydroxyde de sodium pour les valeurs faibles et de pH acides et alcalins et par ajout de tampon HEPES autour du pH neutre. Les mesures du potentiel zeta sont reportées à la Figure IV. 16. Nous déterminons un pI de 8,2.

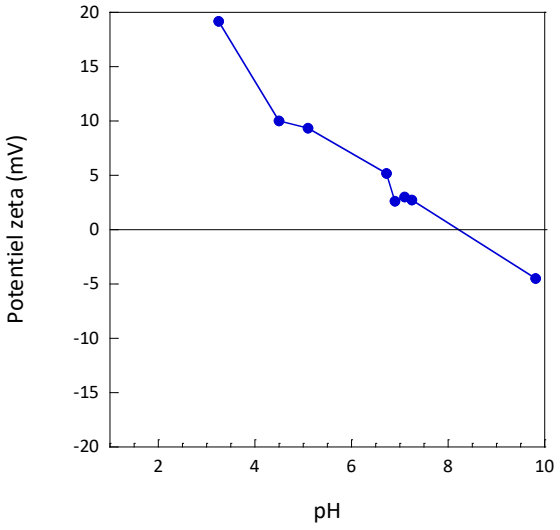

Figure IV. 16 : Mesure du potentiel zeta d'une solution de collagène diluée en fonction du pH.

La force ionique

Li *et al.* ont étudié les effets de divers sels sur la structure des fibrilles de collagène. La Figure IV. 17 présente des résultats de la turbidité finale des solutions de collagène à pH 7,4 au bout de 20 heures d'incubation. Nous observons qu'une turbidité maximale est atteinte en présence d'anions divalents ($NaSO_4$, Na_2HPO_4 et K_2HPO_4) à des concentrations entre 75 et 150 mM, alors qu'une nette diminution est observée jusqu'à 250 mM. En présence de cations divalents ($MgCl_2$ et $CaCl_2$) et monovalents dont le NaCl nous remarquons que l'agrégation du collagène est relativement inhibée à partir de 150 mM.

Comme nous l'avions énoncé au chapitre II, nous savons que la présence de sel à 150 mM perturbe le procédé de formation des capsules. De plus, la Figure IV. 17 semble indiquer que la présence de sel inhibe la gélification du collagène.

Ainsi, nous nous sommes intéressés à l'influence de la concentration en NaCl sur l'agrégation de notre échantillon de collagène à pH 7,2. Les cinétiques d'agrégation du collagène à 20°C, à pH neutre en présence de 2 mM de phosphate de sodium dibasique sont reportées à la Figure IV. 18 a. Nous remarquons qu'aux concentrations de NaCl en dessous de 150 mM le collagène s'agrège instantanément, aucune phase de latence n'est détectée. Par ailleurs, ces solutions de collagène ont été visualisées par microscopie optique. Nous observons la formation de différents réseaux fibrillaires de collagène en fonction des concentrations en sel. En absence de sel, le réseau est peu dense et les fibres sont plus longues. En revanche, dans tous les cas le collagène s'agrège.

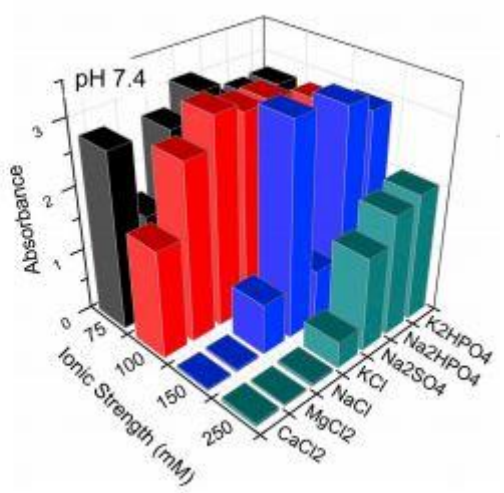

Figure IV. 17 : Turbidité de solutions de collagène après 20 heures d'incubation en présence de différents types de sels à pH 7.4. L'agrégation du collagène est inhibée en présence de $CaCl_2$, $MgCl_2$, KCl et NaCl au-delà de 150 mM.[113]

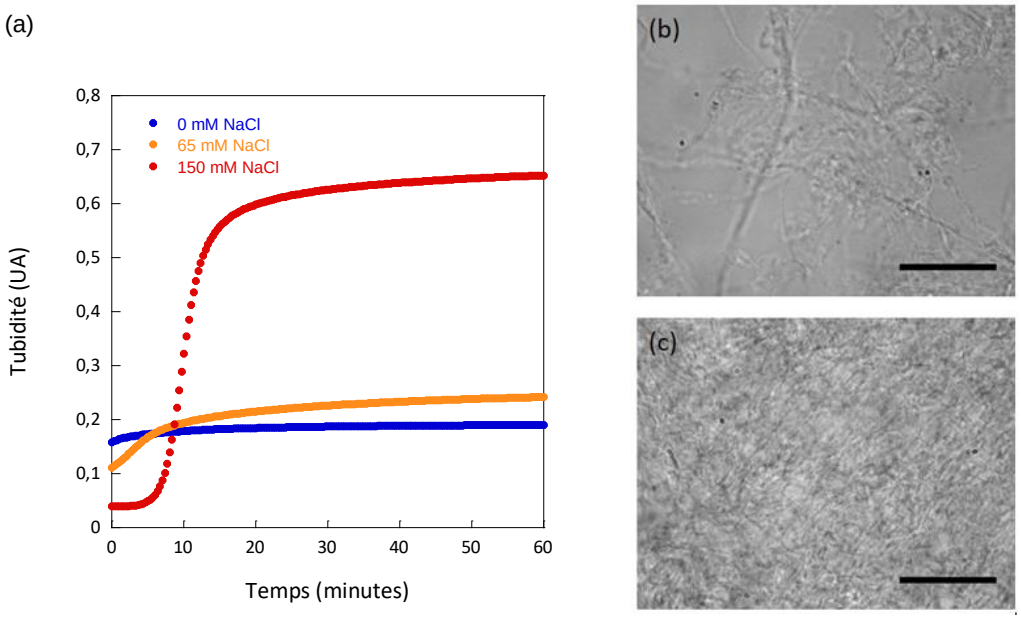

Figure IV. 18 : (a) Cinétique d'agrégation du collagène à pH 7,2 et 20°C en présence de 2 Mm de phosphate de sodium dibasique et 2mg/mL de collagène. Imagerie au microscope optique des fibres de collagènes formées en (b) absence et (c) en présence de NaCl à150 mM. La barre d'échelle est de 1 mm.

Au vu des résultats obtenus sur notre échantillon de collagène, il apparait que l'agrégation de celui-ci peut être seulement limitée par la température à 4°C. Ainsi, nous choisissons d'adopter la stratégie suivante : limiter la gélification du collagène au cours du procédé en travaillant à froid. Et nous pouvons envisager de procéder à la formation des capsules de collagène.

IV. 4 De la co-extrusion des fluides à la formation de capsules à cœur solide

L'objectif de ces travaux est de former des capsules à cœur solide de collagène en présence de cellules avec une fine membrane d'alginate. Basée sur la méthode de co-extrusion, l'encapsulation implique l'extrusion simultanée de la suspension de collagène et de la suspension cellulaire. Il est donc primordial d'assurer la biocompatibilité de la méthode d'encapsulation à la culture cellulaire. Cette biocompatibilité repose en premier lieu sur l'extrusion du fluide de cœur en conditions physico-chimiques favorables à la viabilité des cellules. Par ailleurs, il est également important d'assurer la reconstruction d'un hydrogel de collagène dans les conditions physico-chimiques optimales pour la formation de fibre natives.

La solution neutre de collagène est préparée à une concentration de 2 $mg.mL^{-1}$ par dilution de la solution stock de collagène avec soit du milieu de culture Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma) soit du tampon phosphate salin (PBS, Sigma), de l'eau MilliQ et par l'ajout de l'hydroxyde de sodium pour ajuster le pH du milieu à un pH physiologique entre 7,3 et 7,4. Nous avons choisi d'une part d'utiliser un milieu de culture couramment utilisé pour la culture de cellules de mammifères (milieu DMEM) pour assurer un milieu physiologique et nutritif idéal aux cellules à encapsuler et d'autre part pour permettre la gélification du collagène une fois les capsules formées.

Afin de retarder la transition sol-gel du collagène trop précoce, les solutions sont préparées extemporanément dans la glace et la boucle d'injection est également incubée dans la glace avant d'accueillir la solution finale de collagène. Une fois la boucle d'injection reliée au système d'encapsulation, les fluides de cœur et de coque sont alors rapidement mis en écoulement.

IV.4.1 Un co-écoulement perturbé : description des phénomènes observés

Lorsque nous établissons un jet composé d'un cœur d'une solution de collagène dilué dans le milieu de culture et d'une coque constituée d'une solution d'alginate en concentration massique de 1.8 %, nous observons un comportement instable du jet. Les deux principaux phénomènes observés sont illustrés à la Figure IV. 19 et Figure IV. 20.

Les composés qui constituent le milieu de culture à savoir les acides aminés, les vitamines, les protéines ou encore les électrolytes pourraient être à l'origine de cette instabilité. Nous décidons alors de nous affranchir de la complexité du milieu de culture en diluant la suspension de collagène dans du tampon phosphate salin. En présence du tampon phosphate, nous observons le même phénomène d'instabilité que précédemment : le jet bat.

Un deuxième phénomène est observé au cours de la co-extrusion de la solution de collagène à pH neutre et de l'alginate : le jet composé est perturbé par la présence de bouffées.

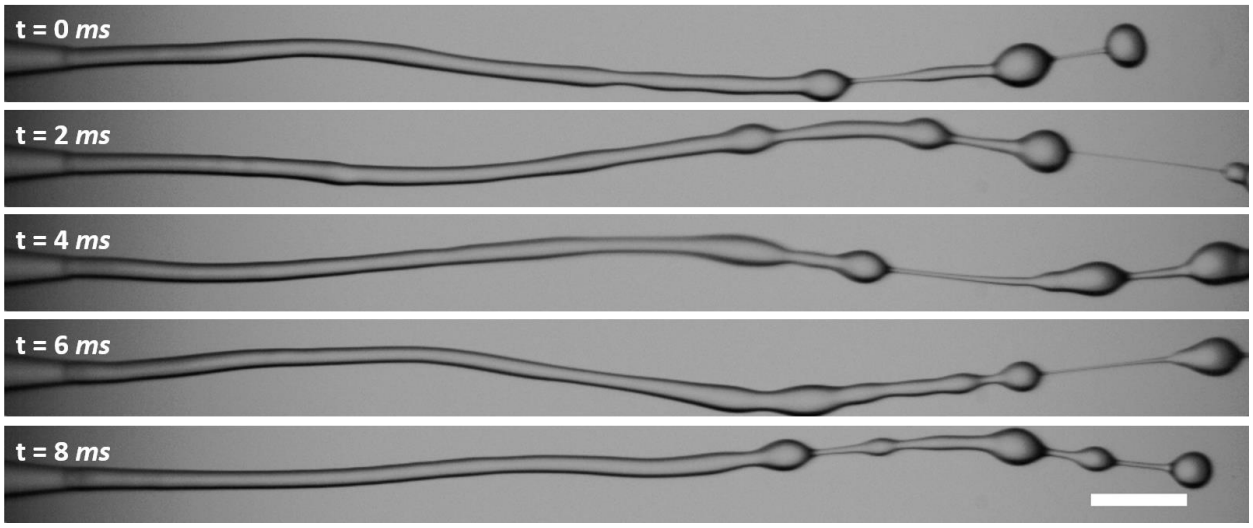

Figure IV. 19 : Instabilité d'un jet composé d'un cœur d'une solution de collagène diluée dans du milieu de culture à 2 mg.mL^{-1} et d'une coque constituée d'une solution d'alginate. Débit total =220 mL.h^{-1}. Rapport des débits= 1. Diamètre injecteur=200 µm. La barre d'échelle représente 1 mm.

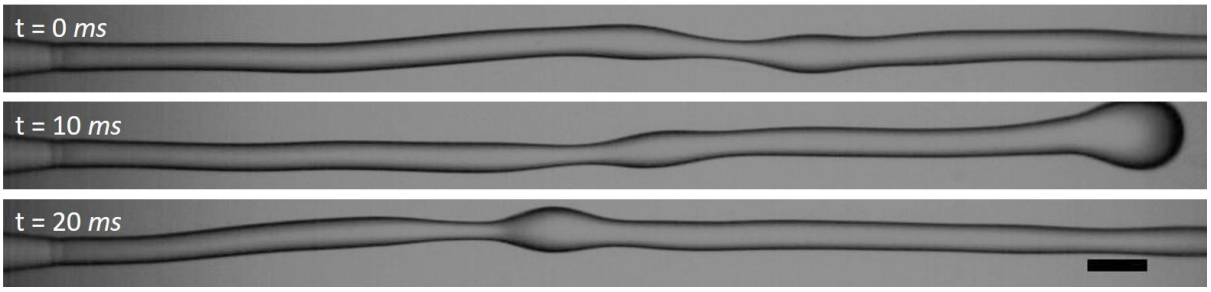

Figure IV. 20 : Présence de bouffées qui déstabilisent le jet composé. Le jet est composé d'un cœur d'une solution de collagène dilué dans du tampon phosphate salin à 2 mg/mL et d'une coque constituée d'une solution d'alginate. Débit total =260 mL.h^{-1}. Rapport des débits = 1. Diamètre injecteur=200 µm. La barre d'échelle représente 500 µm.

IV.4.2 Origine de ces instabilités

Pour comprendre l'origine du comportement du jet composé illustré aux Figure IV. 19 et Figure IV. 20, il est important d'identifier les éléments susceptibles de perturber le co-écoulement. Parmi ces éléments, on compte les électrolytes et les protéines présents initialement dans le fluide de cœur.

IV.4.2.1 Une origine viscoélastique ?

Pour déterminer l'origine du battement, nous décidons de co-extruder séparément le jet composé avec comme fluide de cœur, d'une part une solution de tampon phosphate (contenant le sel) et d'autre part la suspension de collagène en conditions acides. Au sein des deux jets composés, le fluide de coque est une solution d'alginate. Ces jets libres seront comparés à celui constitué de la suspension de collagène dans du tampon phosphate. Nous respectons les mêmes débits d'injection que pour l'expérience précédente.

En comparant les amplitudes des fluctuations de la position centrale des jets libres de la Figure IV. 21, nous remarquons que les jets libres qui contiennent du sel et du collagène que ce soient en milieu acide ou neutre sont soumis à un battement au moins six fois plus important que celui du jet libre de référence contenant de l'eau milliQ.

Comme le montre ces mesures, le battement des jets libres contenant une solution de collagène est bien dû à la présence de la protéine puisqu'en comparant le jet de la solution de collagène acide à celui contenant simplement de l'acide acétique, nous remarquons que l'amplitude maximale de battement est au moins 4 fois plus importante. Maintenant, si l'on compare les deux jets contenant une solution de collagène, on remarque que le battement est plus important lorsque le collagène est en milieu acide. Ceci pourrait s'expliquer du fait que dès lors qu'on neutralise la solution de collagène, on initie l'agrégation des molécules de collagène qui se manifestent par une augmentation de viscosité de la solution et donc une atténuation de l'instabilité de mélange qui est à l'origine du battement.

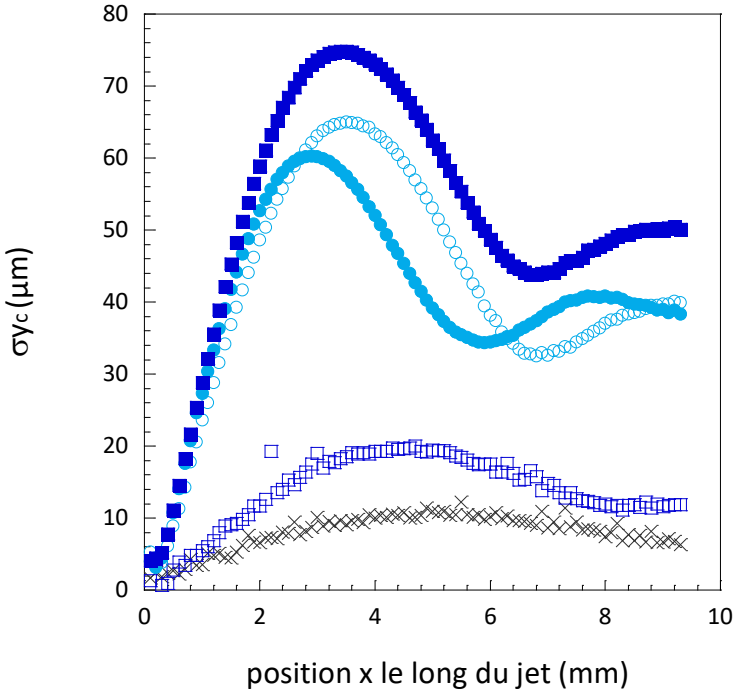

Figure IV. 21 : Quantification du battement du jet composé. Mesure des fluctuations transversales de la position centrale du jet σy_c en fonction de la position x le long du jet pour différents fluides de cœur. Core : eau MilliQ (×), 20 mM acide acétique (□), PBS (○), collagène dans du PBS pH= 7,3 (●), collagène dans 20 mM d'acide acétique pH= 3,5 (■). Coque : solution d'alginate.

La protéine de collagène est également un polyélectrolyte. Sa charge nette est liée au pH du milieu. A pH acide, les groupements des acides aminés de la protéine sont chargés positivement. De la même façon que le sel, des interactions électrostatiques entre les deux biopolymères pourraient modifier les propriétés de l'alginate. Pour tester cette hypothèse, nous nous proposons de réaliser des mesures des modules complexes par un test rhéologique en oscillation. Le rapport des modules visqueux et élastiques, tan δ, nous informe sur le caractère viscoélastique du matériau. En présence d'acide acétique à 20 mM et de 130 mM de chlorure de sodium, tan δ des solutions d'alginate diminue de 11,78 à 7,12 et 6,6 respectivement à une fréquence d'oscillation de 1 rad.s^{-1}. Par ailleurs la présence de collagène en conditions acides à 0,2 % en concentration massique induit une diminution de tan δ d'autant plus importante, elle varie de 7,12 à 3,4.

En mesurant les viscosités complexes de ces solutions d'alginate, nous remarquons qu'en présence de collagène la viscosité complexe varie de 1,25 Pa.s à 4,85 Pa.s à 1 rad.s^{-1} soit approximativement 4 fois la

viscosité initiale. Ainsi, il semblerait que l'instabilité viscoélastique du co-écoulement se manifeste à l'interface entre les solutions de collagène et d'alginate. Nous avons également dispersé du collagène dans une solution d'alginate, l'aspect de la solution de mélange est présenté à la Figure IV. 22. Nous observons clairement la formation de fibres de collagène de plusieurs mm de longueur.

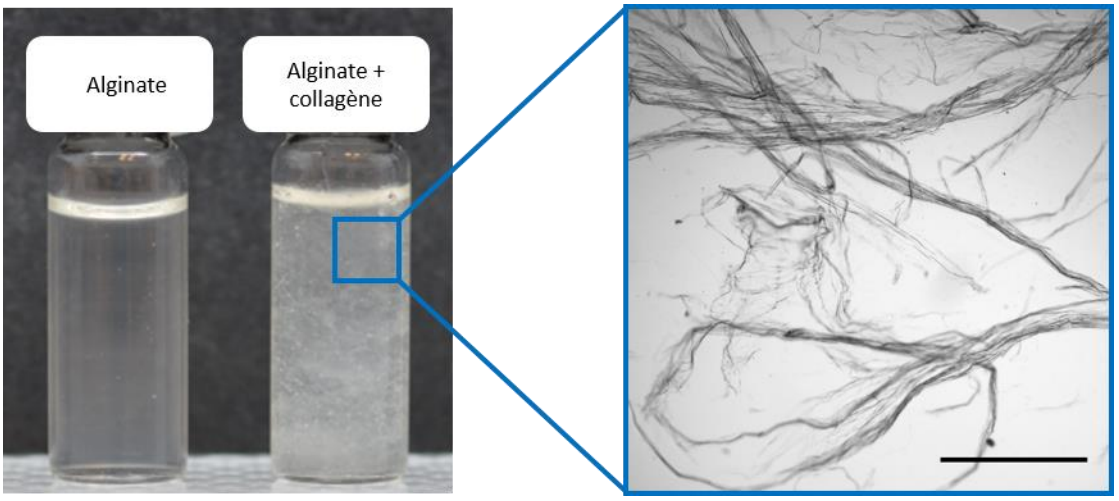

Figure IV. 22 : Observation par microscopie optique d'une solution de mélange alginate et collagène. La barre d'échelle représente 1 mm.

IV.4.2.2 Réduire l'instabilité viscoélastique ?

Pour réduire ce contraste de viscoélasticité qui est à l'origine de l'instabilité à l'interface du co-écoulement, nous avons choisi de viscosifier le fluide de cœur par l'ajout de l'hydroxyethylcellulose à une concentration finale massique de 0,25 % présentant une viscosité à faible cisaillement de 30 mPa.s. Les mesures des fluctuations de la position centrale du jet sont reportées à la Figure IV. 23. L'amplitude de ces fluctuations est au moins 6 fois moins importante.

Une alternative pour réduire l'instabilité viscoélastique est d'ajouter un fluide intermédiaire entre les fluides de cœur et de coque constitués respectivement des solutions de collagène et d'alginate. Cette phase intermédiaire pourra écranter les interactions entre le collagène et l'alginate comme discuté au chapitre II. Cependant, cela introduit une dilution de collagène. Ainsi, nous avons choisi de viscosifier la solution de cœur de collagène.

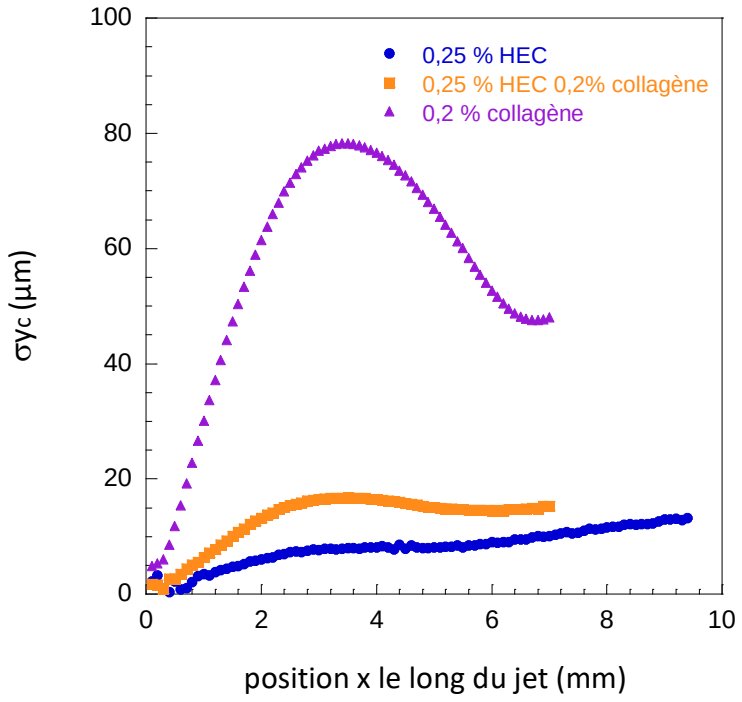

Figure IV. 23 : Quantification du battement du jet composé. Mesure des fluctuations transversales de la position centrale du jet σy_c en fonction de la position x le long du jet pour différents fluides de cœur

IV.4.2.3 Formation d'agrégats lors de la neutralisation de la solution de collagène ?

Comme nous l'avions décrit précédemment, l'agrégation du collagène est sensible aux conditions de température, de pH et de force ionique. Jusqu'ici les solutions sont préparées dans la glace pour ralentir la cinétique d'agrégation du collagène. D'après nos courbes de cinétique, l'agrégation du collagène est inhibée à 4°C. Or les évènements de bouffées observées sur le jet semblent indiquer la formation d'agrégats. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les éventuels agrégats de collagène formés soient de tailles insuffisantes pour être détectés par la spectroscopie ou encore que ces derniers se soient formés au cours du procédé d'encapsulation. En effet malgré toutes les précautions prises pour maintenir l'échantillon à froid (incubation à 4°C des solutions, des cônes de micropipette et du tube d'injection), l'échantillon subit des variations de température notamment lors de son passage à travers l'injecteur. Compte tenu d'une importante surface, les échanges thermiques entre le fluide de cœur et le système d'injection sont inévitables.

Dans cette section, nous souhaitons vérifier si les perturbations observées au sein du jet sont liées à l'agrégation in situ du collagène. Pour cela, nous nous intéressons à l'extrusion de la suspension de collagène préparée dans du tampon phosphate à 4°C sous deux conditions de pH : acide et neutre. Ici, le pH du milieu étant un point de contrôle de l'agrégation du collagène. Dans les deux cas la suspension de collagène est diluée dans du tampon salin phosphate. Nous savons pertinemment qu'à pH acide, le collagène est maintenu en solution. L'écoulement des dispersions de collagène dans du tampon phosphate sera également comparé à celui d'une solution de collagène contenant 20 mM d'acide acétique et à une solution de polyéthylène glycol qui présente une viscosité à cisaillement nul de 10 mPa.s, soit similaire à celle des suspensions de collagène à 20 mM d'acide acétique. Nous nous proposons d'étudier l'effet de l'agrégation du collagène modulée par le pH du milieu sur la dynamique de brisure du jet libre. Ici, la mesure de la longueur de fragmentation nous permet d'évaluer l'amplitude des perturbations qui sont amplifiées *via* l'instabilité capillaire.

A la Figure IV. 24, en comparant les jets libres des dispersions de collagène à celui du PEG (Figure IV. 24 a), on remarque que la présence de collagène change la dynamique de rupture du jet. En effet, les longueurs de rupture des solutions de collagène sont nettement inférieures à celle du PEG. Et, la longueur de brisure de la suspension de collagène à pH neutre est d'autant plus courte. Par ailleurs, nous observons à l'extrémité du capillaire, des corrugations uniquement au sein du jet de la solution de collagène dans du tampon salin à pH neutre (Figure IV. 24 d).

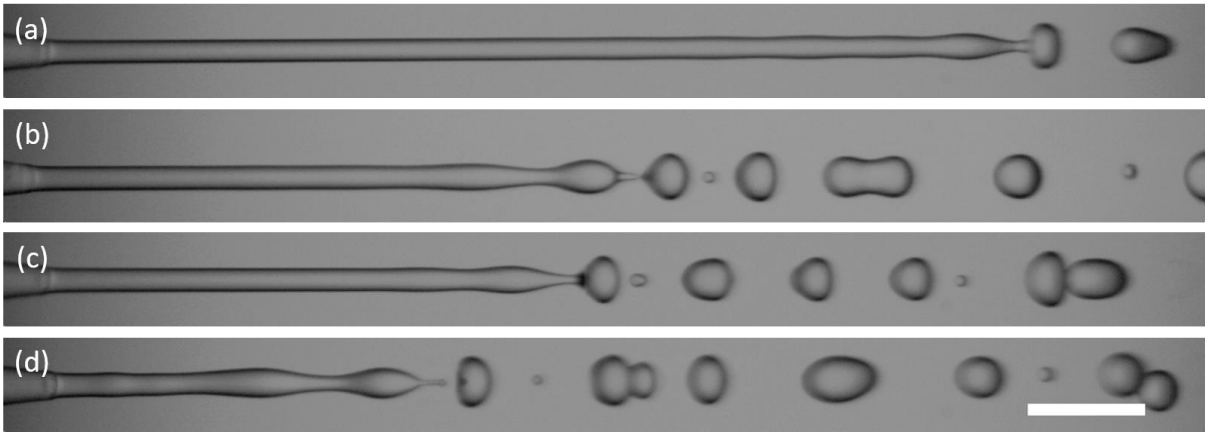

Figure IV. 24 : Fluides en extrusion simple : (a) PEG_{20000} à 0.5%m (b) Solution de collagène dans 20 mM acide acétique àpH = 3,5 (c) Solution de collagène dans tampon salin phosphate à pH = 4,5. (d) Solution de collagène dans tampon salin phosphate pH = 7,3. Débit =220 $mL.h^{-1}$. Diamètre injecteur=200 µm. La barre d'échelle représente 1 mm.

Nous avons mesuré la longueur de fragmentation de ces jets de fluides en extrusion simple. Les résultats sont reportés à la Figure IV. 25. Nous observons que la taille moyenne du jet de collagène à pH acide est plus faible que celle de la solution de PEG. Elle varie de 9 à 7 mm approximativement. Ainsi, ce résultat confirme que la simple présence de collagène perturbe l'écoulement. Maintenant, si l'on compare les jets des trois solutions contenant du collagène, nous remarquons que la taille du jet contenant une solution de collagène dilué dans du PBS à pH acide est plus faible que celle contenant du collagène dilué dans de l'eau. Enfin, le jet de la solution de collagène dilué dans du PBS à pH neutre est davantage plus court. De ces résultats nous déduisons que, la présence du collagène à l'état d'oligomères perturbe l'écoulement et cette perturbation est d'autant plus amplifiée lorsque le collagène est sous forme d'agrégats. Nous savons que la taille des agrégats de collagène formés à pH neutre dans du PBS peuvent atteindre au moins quelques dizaines de µm. La taille de ces agrégats est alors du même ordre de grandeur que le capillaire de l'injecteur.

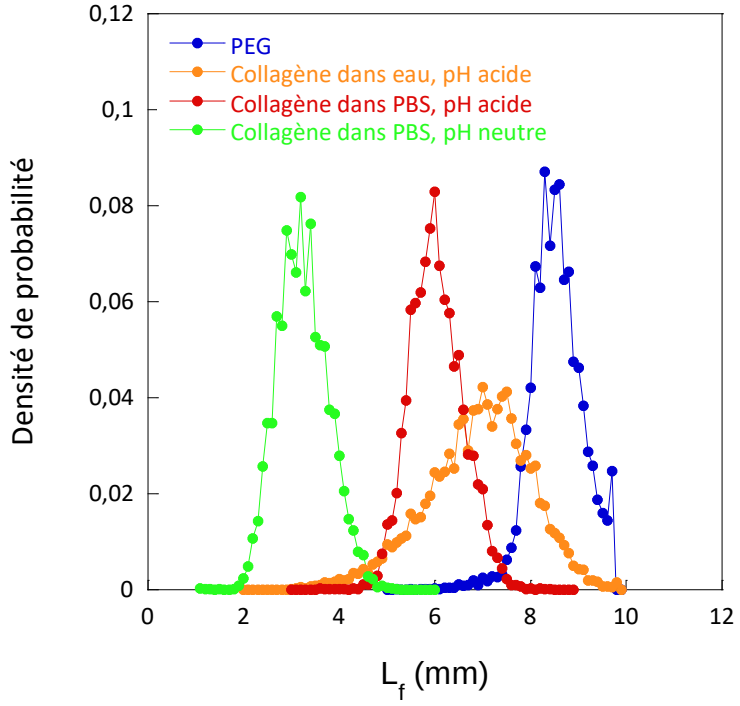

Figure IV. 25 : Instabilité capillaire des jets libres. Mesure de la longueur de fragmentation des jets libres de différents fluides. Fluides : PEG, Collagène dans PBS pH acide, Collagène dans PBS pH neutre

Cette expérience nous a permis de mettre en évidence la formation d'agrégats de collagène suite à la neutralisation de la suspension de collagène à 4°C, bien que les mesures de spectrophotométrie présentées à la Figure IV. 11 ne montrent aucune variation d'absorbance significatives. Il semblerait alors que la méthode de spectrophotométrie ne soit pas aussi sensible que l'étude de l'écoulement. Ainsi, abaisser la température de travail ne semble pas retarder suffisamment l'agrégation du collagène au cours du procédé. La formation de ces agrégats de collagène déclenchée lors de la neutralisation de la suspension est critique pour l'étape d'extrusion. Par ailleurs pour des raisons de reproductibilité, il n'est pas envisageable d'utiliser une suspension qui évolue continument. L'abaissement de la température de travail ne constitue pas un levier pour stabiliser la suspension. Comme nous l'avions décrit précédemment, l'agrégation est influencée par le pH et la force ionique du milieu. Or maintenir le pH du milieu à un pH physiologique est primordial pour la viabilité des cellules. Etant donné qu'il n'est pas possible de travailler en conditions acides du fait de l'extrusion simultanée de la suspension cellulaire, il nous faut envisager d'autres alternatives compatibles avec la culture des cellules et qui limitent l'agrégation du collagène avant l'encapsulation.

IV.4.3 Maintenir la solubilité du collagène en suspension

Dans cette partie, nous allons proposer des méthodes envisageables pour maintenir la solubilité du collagène. Celles-ci sont reposent sur les interactions entre les molécules de collagène que sont les liaisons hydrogène et les ponts salins.

Liaison hydrogène

Dans l'objectif de mieux comprendre le mécanisme de fibrillogenèse, Kuznetsova et ses collaborateurs ont montré que l'ajout de polyols peut grandement affecter les forces d'attraction et ainsi la solubilité du collagène. Ces travaux ont permis de mettre en évidence les types d'interactions impliqués dans le mécanisme d'auto-assemblage des molécules. Les polyols sont des molécules riches en groupements hydroxyls et les sucres au sens large en font partie. Ces molécules seraient en compétition avec les molécules d'eau et perturberaient ainsi les liaisons hydrogène impliquées entre les molécules de collagène. Ces polyols ont des effets différents sur la cinétique d'agrégation en fonction de leur stéréochimie. Parmi ces molécules, certaines comme le 1,3-propane diol inhibe fortement la cinétique alors que le 1,2-propane diol l'inhibe faiblement. Parmi les molécules à la fois biocompatibles et

inhibitrices de la fibrillogenèse en favorisant la solubilité du collagène, nous comptons par ordre décroissant : le fructose, le glucose, le sorbitol et le glycérol (Figure IV. 26).[128]

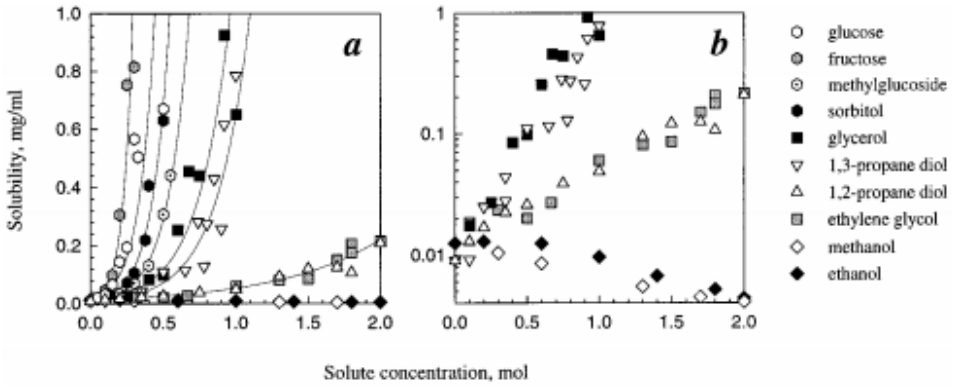

Figure IV. 26 : Solubilité du collagène à 32 °C, pH 7.4, 10 mM de phosphate de sodium, 0.13 mM NaCl en présence de solutés. Les échelles sont linéaires (a) et logarithmiques (b). Figure issue de Kuznetsova *et al.,*[128]

Ponts salins

Les anions de sulfate et de phosphate sont présents au niveau de l'espace extracellulaire à des concentrations de quelques mM (1 à 3 mM). Ces ions jouent un rôle important dans la formation et les propriétés de la matrice extracellulaire. Ils ont un effet sur la fibrillogenèse du collagène[1], sont impliqués dans les interactions avec d'autres composants de la matrice extracellulaire notamment entre les glycosaminoglycanes et le collagène[2] et sur les propriétés mécaniques de la matrice[3].

Ces ions peuvent s'accumuler au sein des fibrilles de façon liée aux molécules de collagène mais sont également retrouvés dans l'espace interstitiel sous formes d'ions libres.

Il a été mis en évidence que seuls les anions divalents forment des ponts salins avec les groupements chargés positivement des acides aminés du collagène. Ces ions perturbent également l'agencement des fibrilles en modifiant les distances entre les micro-fibrilles et non entre les molécules de collagène au sein de la microfibrille. Les sites les plus probables seraient les résidus chargés positivement des lysines et arginines[4].

Il a été montré que l'ajout de phosphate et de sulfate augmente le temps de latence de la fibrillogenèse et la solubilité du collagène. D'après la Figure IV. 27, la solubilité du collagène augmente exponentiellement avec la concentration en anions divalents pour les trois valeurs de pH et l'effet stabilisant du sulfate est d'autant plus important. Au vue de ces données, nous nous proposons d'étudier l'instabilité capillaire des jets libres de collagène en présence des ions phosphate et sulfate à 30 mM.

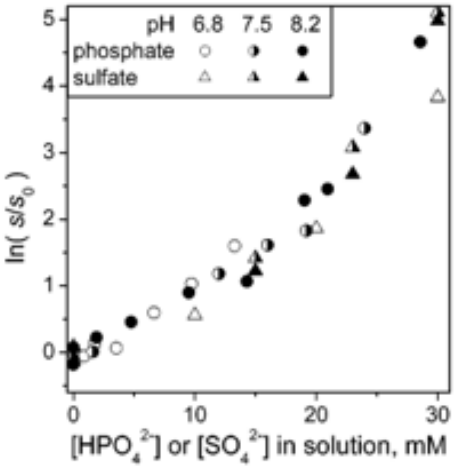

Figure IV. 27 : Solubilité du collagène en fonction de la concentration en phosphate et sulfate dans 130 mM NaCl, 10 mM HEPES à 32 °C. Les courbes de solubilité normalisées ln s/s0 coincident pour le phosphate et le sulfate à tous les pH lorsqu'elles sont tracées en fonction de la concentration en anions divalents, suggérant que le phosphate monobasique n'a pas d'effet sur la solubilité. Figure issue de Kuznetsova *et al.,*[128]

D'après la littérature, nous disposons de deux méthodes pour maintenir la solubilité du collagène à pH neutre soit favoriser les liaisons hydrogènes soit les ponts salins. Nous avons alors testé celles-ci en réalisant des cinétiques d'agrégation du collagène en présence de fructose à 200 mM et en présence d'un excès de sulfate de sodium dibasique à 30 mM. Ces concentrations ont été déterminées tout en respectant l'osmolarité physiologique de la solution. Les cinétiques sont représentées à la Figure IV. 28.

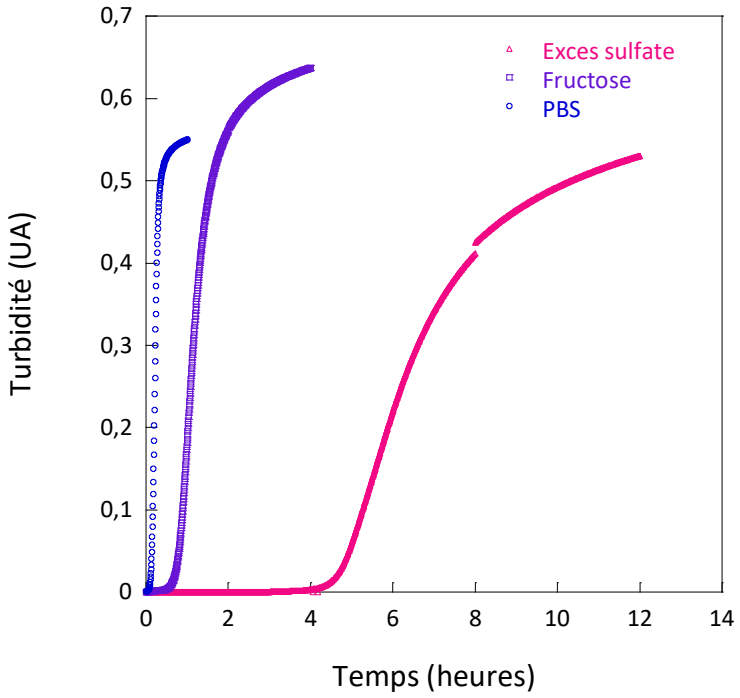

Figure IV. 28 : Cinétique d'agrégation du collagène. Variation de l'absorbance mesurée à 340 nm au cours du temps d'une solution de collagène à pH 6.8 en présence de tampon phosphate salin (○), de 200 mM de fructose (□) et de 30 mM de sulfate de sodium dibasique (△).

En comparant les cinétiques d'agrégation du collagène dans du PBS (qui constitue la condition de référence) et en présence de fructose, nous remarquons que le temps de latence est retardé approximativement d'une heure (Figure IV. 28). Cependant ce temps de latence reste plus court que celui observé en présence d'excès d'ions sulfate de sodium dibasique qui est approximativement de 4 heures. Nous avons vu également que le phosphate de sodium peut également maintenir le collagène soluble, tout comme le sulfate de sodium. Nous avons alors choisi de comparer l'effet de ces deux ions. A la Figure IV. 29, nous avons reporté les résultats de la densité de probabilité de la longueur de fragmentation des jets contenant du collagène en présence de ces sels. Nous remarquons que la taille du jet contenant le sel de sulfate est plus grande que celui qui contient du phosphate. Par ailleurs, nous notons que les tailles moyennes des jets contenant le collagène en présence de sulfate et du collagène dilué dans de l'eau sont très proches.

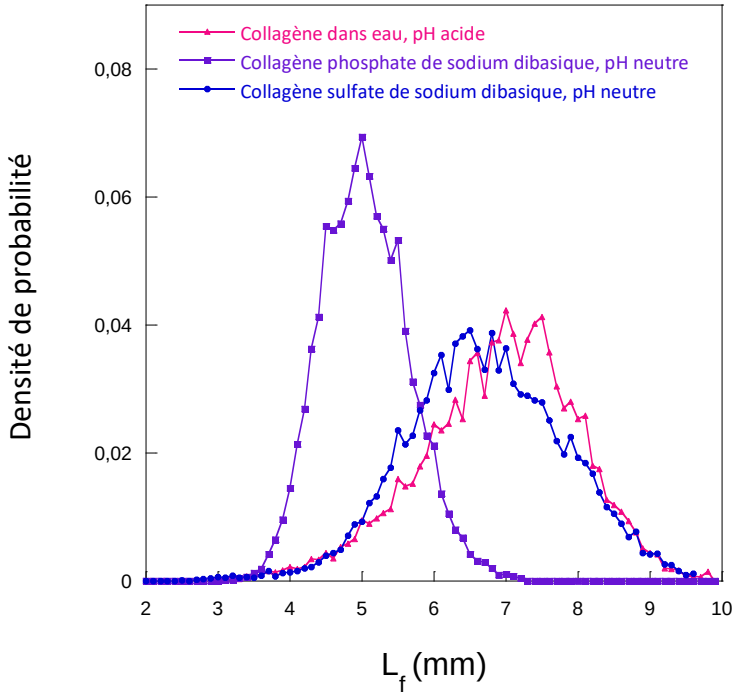

Figure IV. 29 : Mesure de la longueur de fragmentation des jets libres de différents fluides. Fluides : Collagène dilué dans de l'eau à pH acide, en présence d'ion sulfate de sodium et de phosphate de sodium à pH neutre.

Finalement, nous avons décidé de retarder l'agrégation du collagène en favorisant la formation de ponts salins par l'ajout d'ions sulfate de sodium dibasique à 30 mM.

IV.4.4. Fragmentation d'un jet composé des fluides de collagène et d'alginate

Jusqu'ici, nous avons déterminé l'origine des phénomènes d'instabilités hydrodynamiques observées lors d'un co-écoulement d'une solution de collagène à pH neutre et d'une solution d'alginate. A présent, nous allons nous focaliser sur la fragmentation du jet composé.

En viscosifiant la solution de cœur de collagène et en favorisant sa solubilité par l'ajout d'un excès d'ions sulfate, nous parvenons à contrôler la fragmentation du jet composé (Figure IV. 30).
Cependant des évènements de coalescence du jet composé relativement rares se produisent au cours de la fragmentation du jet. Ces évènements de coalescences résultent des fluctuations de vitesse et sont

probablement dus aux agrégats initialement présents dans la solution stock de collagène. Au sein de la fragmentation du jet composé, nous avons déterminé une probabilité de coalescence dont l'équation est :

$$P_c = \frac{\text{Nombre d'évènements de coalescence}}{\text{Nombre de gouttes formées}} \qquad \text{(IV. 7)}$$

Nous obtenons 16 % de coalescence.

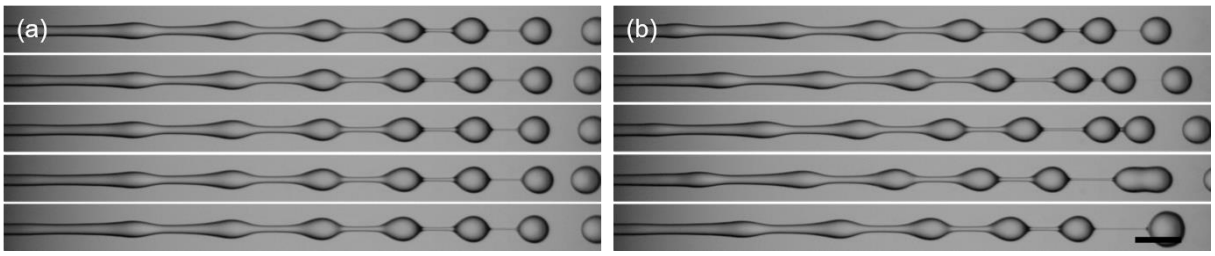

Figure IV. 30 : Séquences temporelles présentant la fragmentation contrôlée du jet composé d'un cœur d'une solution de 0,2% m de collagène et 0,25%m de HEC. La solution de coque est constituée d'alginate à 1,8%m. Débit total =220 mL.h^{-1}. Rq=1. (a) fragmentation régulière du jet. (b) coalescence des gouttes dans le jet dues aux fluctuations de vitesse. L'intervalle de temps des séquences est respectivement de 2 ms et 0,2 ms. La barre d'échelle représente 1 mm.

Les gouttes ainsi formées sont immergées dans un bain de calcium pour permettre la gélification de la solution d'alginate. Par la suite, elles sont préalablement lavées dans du milieu de culture pour permettre l'élimination de l'excès de sulfate de sodium dibasique par diffusion à travers la membrane d'hydrogel d'alginate. Elles sont ensuite dispersées dans ce milieu de culture et incubées à 37°C pour permettre la gélification du collagène.

Pour visualiser le réseau fibrillaire de collagène au sein des capsules, celui-ci peut être marqué par fluorescence. Pour cela, nous avons utilisé la carboxytétraméthylrhodamine (TAMRA). La réaction de marquage est produite entre les groupements fonctionnels ester de la rhodamine et amine de la protéine de collagène, à pH 7,4. Le fluorophore est ajouté au milieu contenant les capsules de collagène à cœur solide à une concentration finale de 3 µM. Cette réaction est réalisée après gélification du collagène pour ne pas perturber celle-ci. La quantité de rhodamine libre en excès diffuse à travers la membrane d'alginate qui constitue une membrane de dialyse.

Des capsules à cœur solide de collagène sont illustrées à la Figure IV. 31 et Figure IV. 32. Finalement, en maintenant le collagène soluble à pH neutre, par ajout de sulfate de sodium dibasique à

30 mM, nous parvenons à stabilise le co-écoulement, à contrôler la fragmentation du jet composé et ainsi à former des capsules à cœur solide de collagène. Nous pourrons par la suite y incorporer les cellules.

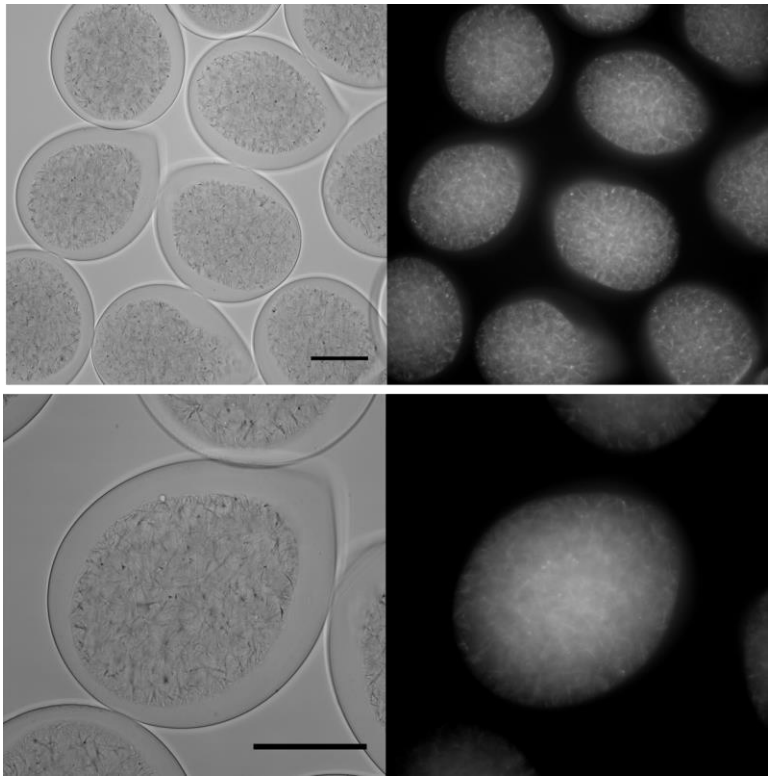

Figure IV. 31 : Formation de capsules d'alginate à cœur solide de collagène. Le collagène est marqué par fluorescence au TAMRA. La barre d'échelle représente 200 µm.

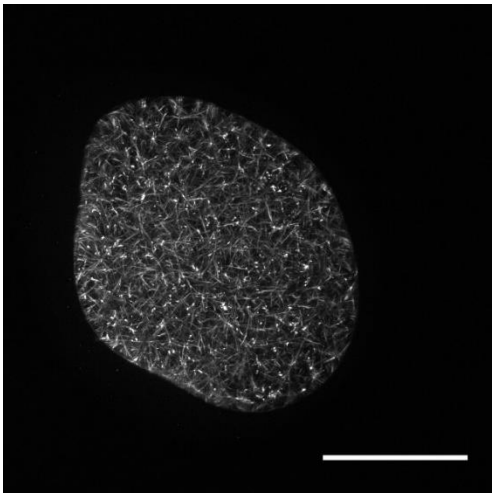

Figure IV. 32 : Réseau fibrillaire de collagène composant le cœur d'une capsule d'alginate. Le collagène est marqué au TAMRA. La barre d'échelle représente 200 µm.

Au cours de cette thèse, des capsules à cœur liquide constituées d'un hydrogel hybride de collagène et d'alginate ont également été formées. Ces capsules ont été conçues pour y faire développer des épithéliums en monocouches. Ainsi, les cellules pourront s'organiser autour du cœur de la capsule qui représenterait le lumen. Cette approche a déjà été suivie par Doméjean et ses collaborateurs lors de l'encapsulation de cellules cancéreuses CT26.[79] Ils ont montré que ces cellules adhèrent à l'hydrogel hybride et sont capables de former une monocouche de cellules.

Au cours de son stage de recherche au sein du laboratoire, Jessica Kui a mis en évidence que la concentration en alginate PROTANAL LF200 FTS composant l'hydrogel hybride avait une influence sur la structure de celui-ci. Ces hydrogels hybrides sont composés en concentration massique à 0,18 % de collagène et d'alginate à des concentrations de 0,5 et 1%. Etant donné que la concentration critique de la transition sol - gel de l'alginate est de 0,5%m, aux concentrations inférieures l'alginate est maintenu en solution. La Figure IV. 33 illustre la localisation des fibres de collagène au sein de l'hydrogel hybride. Nous observons à la concentration de 1%, un déphasage des deux biopolymères. Le collagène se concentre vers l'intérieur de la capsule alors qu'à une concentration plus faible, le collagène est réparti de façon plus homogène au sein de l'hydrogel hybride.

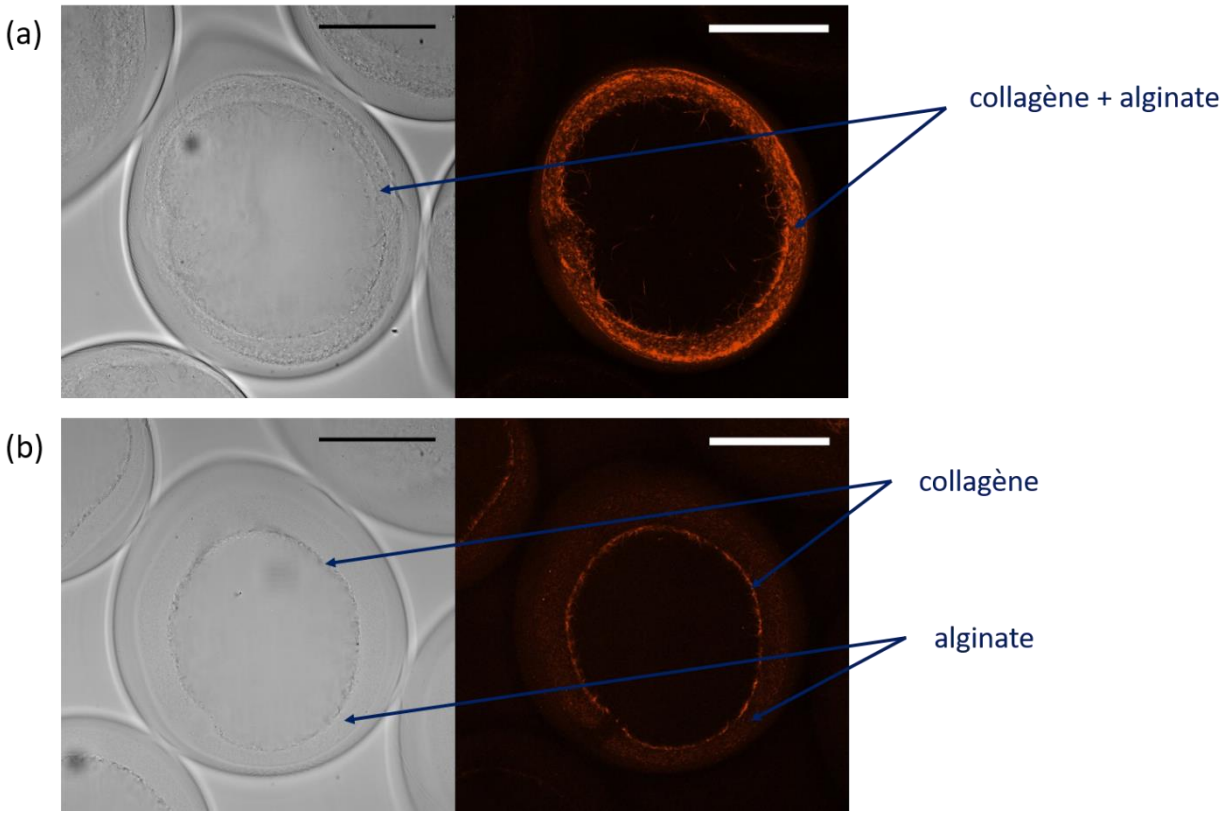

Figure IV. 33 : Marquage par fluorescence du collagène composant l'hydrogel hybride. (a) 0,5% m LF200FTS (b) 1% m LF200FTS. La barre d'échelle correspond à 200 µm.

V. Développement de micros tissus de cellules épithéliales au sein des capsules à cœur de collagène

Ce chapitre comprend trois principales sections. La première section dresse un tableau des caractéristiques générales du tissu épithélial puis spécifiques à l'épithélium intestinal. Les modèles *in vitro* utilisés pour reproduire cet épithélium sont brièvement décrits. Aux deux sections suivantes, sont présentés les résultats obtenus suite au suivi et à la caractérisation de deux types cellulaires, les cellules intestinales et les cholangiocytes, au sein des capsules de collagène jusqu'à la formation de structures épithéliales. Certains mécanismes déduits des phénomènes observés sont décrits.

V.1 De l'épithélium *in vivo* aux modèles *in vitro*

La complexité des organismes métazoaires (organismes pluricellulaires) s'édifient par la combinaison de deux types tissulaires : l'épithélium et le mésenchyme. La présence d'un épithélium est une caractéristique fondamentale commune à tous les métazoaires.[129] Il constitue un des quatre principaux tissus dont le tissu de soutien (qui inclut le tissu conjonctif, le tissu cartilagineux et le tissu osseux), le tissu musculaire et le tissu nerveux. Le tissu épithélial est formé d'un ensemble de cellules juxtaposées, solidarisées par des systèmes de jonction et séparées du tissu conjonctif par une membrane basale. Les épithéliums qui composent l'organisme présentent des structures variées en fonction de leur rôle au sein de l'organisme (Figure V. 1). En effet, plusieurs fonctions leur sont attribuées telles que la protection (peau), l'absorption de nutriments (intestin), la diffusion de gaz (poumon et vaisseaux sanguins) ou encore la sécrétion de molécules hormonales (thyroïde).

Pour accomplir ces différentes fonctions, diverses structures épithéliales existent et sont référencées au Tableau V. 1. Les épithéliums sont classés selon deux critères : la structure des couches cellulaires et la morphologie des cellules qui les composent. Les cellules peuvent être organisées en monocouche appelées épithélium simple ou en plusieurs couches qu'on appelle épithélium stratifié ou pseudo-stratifiées selon l'organisation des cellules par rapport à la lame basale.

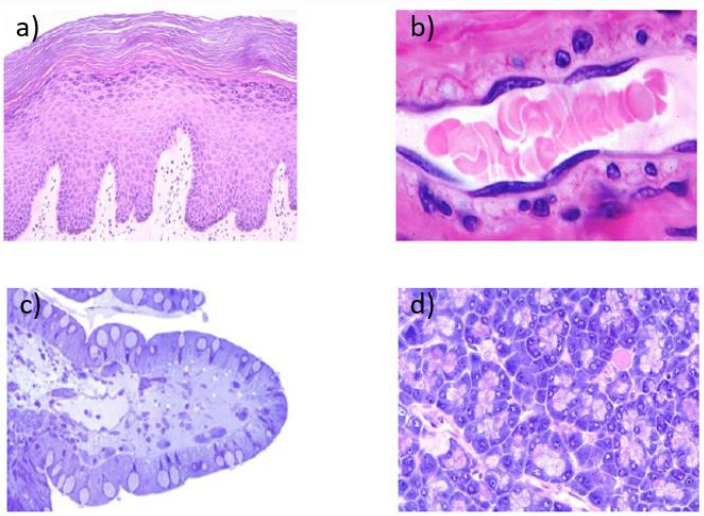

Figure V. 1 Coupes histologiques de divers tissus épithéliaux. (a) peau, (b) poumon (c) intestin (d) thyroïde

Ils existent plusieurs morphologies caractéristiques des cellules épithéliales : pavimenteuses, cubiques ou encore cylindriques.

Par ailleurs, certains épithéliums appelés épithélium de revêtement tapissent l'intérieur des cavités ou recouvrent l'extérieur de nos organes. D'autres épithéliums appelés glandulaires constituent les éléments glandulaires. Ces épithéliums peuvent être soit regroupés en organes soit associés à un épithélium de revêtement (glande de la muqueuse digestive ou respiratoire). Ces organes glandulaires sont composés de deux types d'unités élémentaires : des cystes sphériques (couramment appelés acini, alvéole, ou follicule au niveau de la glande mammaire, du poumon et de la thyroïde respectivement) et des tubes qui constituent l'intestin ou encore les bronches du poumon.

Tableau V. 1 : Classification des tissus épithéliaux en fonction de leur structure et de leur localisation. Tableau issu de[130].

Type	*Structure*	*Location*
Stratified squamous epithelium	Several layers of epithelial cells, protective cells	Skin (Keratinized) Cornea, Esophagus
Columnar epithelium	Single-layer cells, mainly secretory functions	Intestine, Stomach
Pseudostratified	A thick layer with a stratified appearance, but all cells contact the basement membrane	Trachea
Simple squamous	Single- and well-spread cell layer	Lung, Endothelium
Cuboidal	Cell aspects are equal, main function is to retain liquids	Ducts, Glands
Transitional	Specific to the urinary system, the variation depends on the distension (from 5—layers to 2–3 under distension)	Urothelium

Une caractéristique est commune à tous les épithéliums, il s'agit de la polarité apico-basale. Les cellules épithéliales polarisées possèdent deux domaines membranaires, un domaine apical qui constitue l'interface d'échange entre l'air ou le milieu liquide et les cytoplasmes et un domaine basolatéral adjacent à la membrane basale.

Au sein d'un tissu épithélial, les interactions cellule-cellule sont établies par des complexes macromoléculaires constitués de jonctions serrées (JS), de jonctions adhérentes (AD), de desmosomes et de jonctions gap Figure V. 2. Chacune de ces jonctions possèdent des caractéristiques structurelles et fonctionnelles spécifiques au tissu.[131]

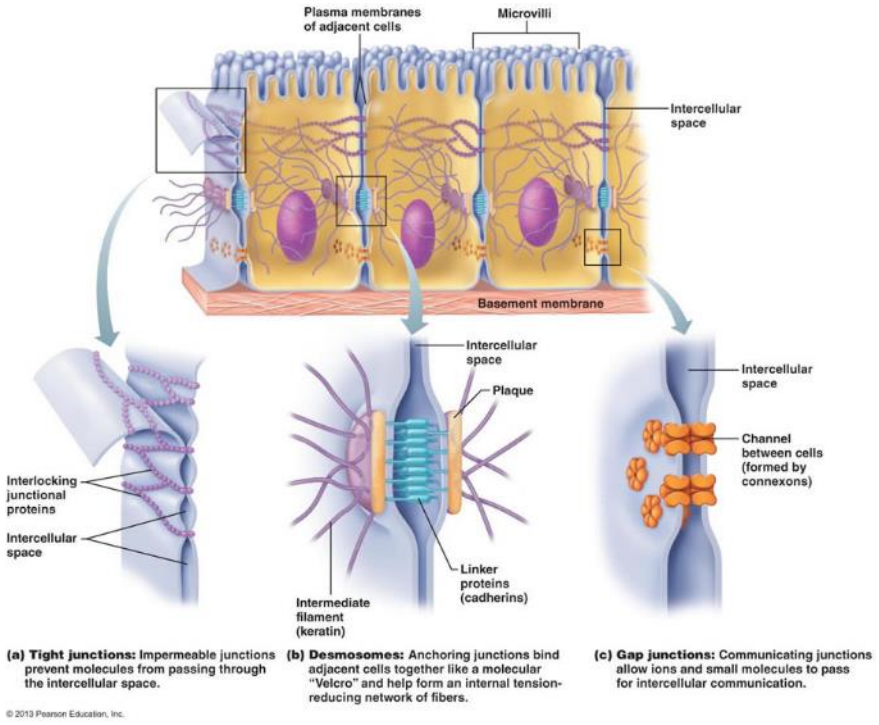

Figure V. 2 : Représentation schématique des jonctions entre les cellules épithéliales. Image issue de 2013 Pearson Education, Inc.

V.1.1 L'épithélium intestinal

L'intestin grêle est un organe complexe localisé au niveau de la partie supérieure du tractus digestif. L'épithélium intestinal constitue la couche cellulaire la plus interne de l'organe. Il est composé de deux régions distinctes : un domaine de crypte (invaginations luminales) et un domaine de villosités (protrusions luminales). Le domaine de crypte est localisé au niveau basal de l'épithélium et, est en contact direct avec la membrane basale. Ces cryptes logent les cellules souches intestinales qui s'auto renouvellent

pour maintenir la population de cellules souches. Ces cellules expriment spécifiquement le gène Lgr5. Inversement, les villosités sont localisées au niveau du pôle apical de l'épithélium et sont composées de différents types cellulaires différenciées. L'épithélium intestinal est composé de quatre types de cellules qui dérivent tous de cellules souches adulte et sont localisées à la partie basale de la crypte. On distingue :

(1) les entérocytes, impliqués dans l'absorption ; (2) les cellules de Goblet et (3) les entéroendocrines, responsables respectivement de la sécrétion de mucus et d'hormones ; (4) les cellules de Paneth, cellules sécrétrices de peptides antimicrobiens.
Face au lumen intestinal, les villosités maximisent l'absorption des nutriments. Chaque crypte contient approximativement 250 cellules, et le même nombre de cellules est généré chaque jour.

L'épithélium intestinal assure deux fonctions physiologiques majeures. La monocouche de cellules qui tapissent l'intestin joue à la fois le rôle de barrière mécanique et biochimique entre le compartiment luminal et le reste de l'organisme et permet l'absorption de nutriments essentiels du lumen intestinal, la production de mucus aux propriétés protectrices et des peptides antimicrobiens qui affectent la composition du microbiote intestinal. Par ailleurs ce mucus minimise le contact direct entre le microbiote intestinal et la couche de cellules épithéliales. Ce mucus est constitué de protéoglycanes appelées mucines.
L'intestin se différencie du colon par son organisation cellulaire et ses fonctions mais également de la double couche de mucus retrouvée dans le colon.
L'épithélium intestinal forme une barrière sélective aux métabolites bactériens et de nutriments alimentaires régulant le passage de molécules solubles à travers l'espace paracellulaire entre les cellules épithéliales. Le transport paracellulaire est contrôlé par la présence des jonctions serrées. En limitant les protéines et les lipides de la membrane apicale de diffuser à travers la membrane basolatérale, les jonctions serrées sont impliquées dans le maintien de la polarité cellulaire. [132]

V.1.2 Les modèles in vitro

Les modèles *in vitro* de l'épithélium intestinal sont utilisés dans diverses domaines de recherche allant du relargage de molécules thérapeutiques[133,134] et le transport de nutriments aux études de mécanismes d'entrée d'agents infectieux[135,136,137] et des maladies intestinales.

Les monocouches de cellules à confluence établies sur des supports perméables, couramment appelés les inserts ont été largement utilisés comme modèle cellulaire 2D. Ils permettent d'accéder aux deux pôles de

la monocouche de cellules et sont couramment utilisés dans les essais de perméabilité et de toxicité jusqu'à maintenant pour des applications pharmaceutiques. Pour améliorer l'adhésion des cellules au support, ces derniers peuvent être recouverts de polymères naturels (le plus souvent de collagène de type I). Cependant l'utilisation de ces modèles est relativement limitée du fait qu'ils ne reproduisent pas le microenvironnement extracellulaire. En revanche les organoïdes intestinaux présentent les caractéristiques physiologiques de l'intestin *in vivo*. Ces caractéristiques incluent une couche de cellules épithéliales polarisées qui entoure un lumen fonctionnel et la présence de tous les types cellulaires de l'épithélium intestinal selon un arrangement spatial tel retrouvé chez l'animal. Les modèles *in vitro* sont constitués à partir de deux sources principales : les cellules souches et les lignées de cellules cancéreuses.

A partir de cellules souches

La formation du premier organoïde intestinal à partir de cellules intestinales primaires a été décrit par Sato *et., al*.[18] Des crypts intestinaux de souris sont incorporés dans une matrice de Matrigel®, submergés de milieu de culture qui contient les facteurs de croissance nécessaires à la signalisation cellulaire du crypt intestinal. Ces travaux démontrent la capacité des crypts contenant les cellules souches Lgr5+ prélevés d'un intestin à former un organoïde.[18] Il est également possible de mettre en culture ces organoïdes par dissociation de la structure du Matrigel®, fragmentation de l'organoïde en segments puis ensemencement de ces derniers.

A partir de lignées cellulaires cancéreuses

Dans les années 1970, une liste de lignées cellulaires a été établie à partir des tumeurs gastro-intestinales pour permettre l'étude des mécanismes du cancer et des thérapies cytostatiques.[138] Suite aux difficultés rencontrées pour obtenir des lignées cellulaires différenciées normales, les biologistes ont porté leur intérêt sur les propriétés des lignées cellulaires tumorales. Pour la plupart des cas, une différenciation partielle des cellules est induite par l'ajout de facteurs biologiques ou synthétiques. Cependant, une lignée cellulaire tumorale, Caco-2 a montré sa capacité à se différencier spontanément sur une culture à long terme. Des premières études ont montré qu'après différenciation, ces cellules présentaient des caractéristiques morphologiques et biochimiques similaires aux entérocytes de l'intestin. Sur des supports de filtres perméables, ces cellules forment une monocouche, présentent une polarité apico-basolatérale et des jonctions serrées entre les cellules adjacentes. D'autres chercheurs ont par la suite montré la

pertinence de l'utilisation des Caco-2 comme entérocytes en termes de caractéristiques de morphologie et fonctionnelles par rapport à d'autres lignées cellulaires du colon.[139, 140.]

V.2 Une matrice solide de collagène pour la culture des Caco-2

Les cellules cancéreuses Caco-2 constituent le modèle cellulaire standard pour la formation et l'étude physiologique de l'épithélium intestinal. Au vue de son intensive utilisation par les chercheurs, nous avons fait le choix d'utiliser cette lignée. Dans cette partie du manuscrit, nous nous sommes intéressés au développement des cellules intestinales au sein d'une matrice solide de collagène. Nous faisons d'abord une comparaison des structures cellulaires formées dans un cœur liquide et solide au sein des capsules d'alginate. Par la suite, nous tentons de caractériser les structures formées au sein de la matrice de collagène. L'objectif principal de cette étude est de mettre en évidence l'intérêt des capsules à cœur solide et donc d'établir une preuve de concept.

V.2.1 Matériels et méthodes

V.2.1.1 Culture cellulaire

Les cellules humaines du carcinome de colon, les Caco-2 ont été fournies par la compagnie American Type Culture Collection ((ATCC), HTB-37, Germany)). Elles ont été utilisées dans ces expériences aux passages 20 et 21 et ont été mises en culture dans du milieu Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM, ATCC) supplémenté à 10 %(v/v) au sérum fœtal bovin (FBS, ATCC) et à 1%(v/v) en pénicilline-streptomycine (P/S, Gibco). Les cellules sont ensemencées dans des *flasks* à une densité de 4.10^4 cellules vivantes/cm² puis incubées à 37°C à une atmosphère modifiée à 5% de CO_2. Le temps de dédoublement des Caco-2 est de 32 heures. Lorsque le niveau de confluence des cellules atteint 90 % (Figure V. 3), elles sont trypsinées à 0,05% (V/V) (Trypsine-EDTA, Gibco), centrifugées à 120 g pendant 8 minutes puis resuspendues dans la solution de cœur à la concentration souhaitée après comptage à l'aide de la cellule de Malassez en vue de l'encapsulation. Nous avons fait le choix d'encapsuler des cellules mises en culture quelques jours auparavant principalement pour éviter l'effet délétère de l'étape de décongélation. Au cours de ces expériences les cellules sont encapsulées à une concentration de 1.10^6 cellules. mL^{-1}. A l'issue de l'encapsulation, les Caco-2 contenus dans les capsules sont placées dans des erlenmeyers adaptés à la culture cellulaire à l'incubateur.

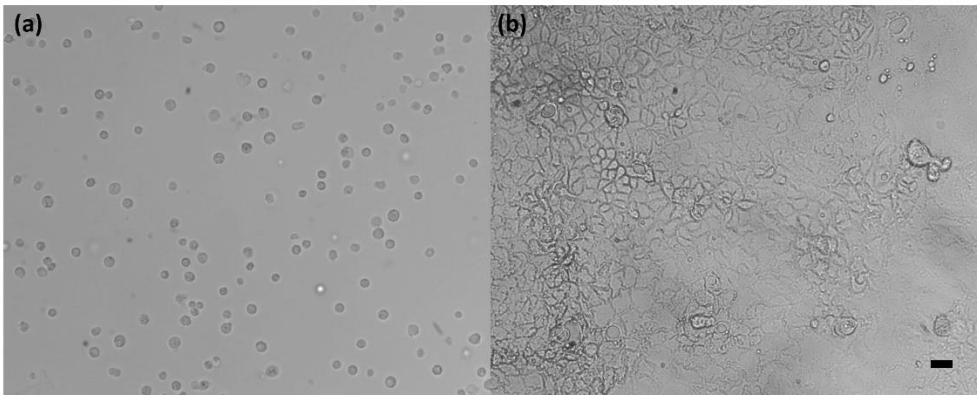

Figure V. 3 : Culture des Caco-2 en 2D sur flask. (a) Au lendemain de l'ensemencement, les cellules sont sphériques et n'ont pas encore adhérer au support. (b) Au 6e jour, les cellules sont à 90 % de confluence. La barre d'échelle représente 100 µm.

Les cholangiocytes normaux de rat (NRC) ont été fournies par Pascale Dupuis-Williams du laboratoire ICPH. Ils ont été mis en culture dans du milieu DMEM /F12 dont la composition a été optimisée et référencée par Salter et ses collaborateurs[141]. Les cellules sont ensemencées dans des flasks à une densité de 2.10^4 cellules vivantes/cm² puis incubées à 37°C à une atmosphère modifiée à 5% de CO_2. Lorsque le niveau de confluence des cellules atteint 70 % (Figure V. 4), elles sont trypsinées à 0,05% (w/v) (Trypsine-EDTA, Gibco), centrifugées à 120 g pendant 8 minutes puis resuspendues dans la solution de cœur à la concentration souhaitée après comptage à l'aide de la cellule de Malassez en vue de l'encapsulation. Au cours de ces expériences les cellules sont encapsulées à une concentration de 1.10^6 cellules. mL^{-1} et 5.10^5 cellules/mL. Similairement aux Caco-2, les NRC contenus dans les capsules sont placées dans des erlenmeyers à l'incubateur.

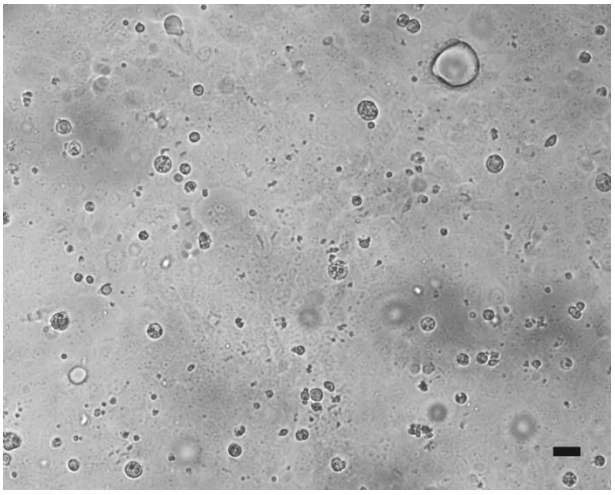

Figure V. 4 : Culture en 2D sur flask des NRC au bout de 5 jours.

V.2.1.2 Méthodes de caractérisation des structures cellulaires

Les cellules sont suivies régulièrement par microscopie optique ou de fluorescence. Un microscope confocal Nikon Eclipse Ti équipé d'une caméra (Hamamatsu Digital C1340 ORCA-Flash 4.0) a été utilisé. Un nouvel échantillon de capsules est prélevé des erlenmeyers placés à l'incubateur pour chaque essai réalisé pour éviter tout risque de contamination.

Viabilité cellulaire

La viabilité des cellules encapsulées a été déterminée par l'utilisation de deux marqueurs permettant de distinguer les cellules vivantes des cellules mortes. L'iodure de propidium (ThermoFisher, référence P1304MP), qui est un colorant rouge fluorescent et un intercalant de l'ADN, non perméable aux cellules vivantes (excitation/ émission 535 nm/ 617 nm) a été utilisé à une dilution de 1/250.
La calcéine AM qui est un colorant cellulaire perméant et permet d'imager les cellules vivantes (excitation/ émission 495/ 515) (ThermoFisher, référence C1430) a été utilisé à une à dilution de 1/200.
Le noyau des cellules a été imagé par le réactif Hoechst (excitation/ émission 405 / 460) (ThermoFisher, référence 3342 Ready flow reagent) en ajoutant 2 gouttes /mL de milieu.
Brièvement, les cellules contenues dans les capsules sont transférées dans des chambres à puits. Les réactifs calcéine AM et Hoechst sont d'abord ajoutés et incubés à 37°C pendant 30 minutes. Ensuite, est rajouté l'iodure de propidium pour 5 minutes d'incubation. Une vingtaine de capsules pour chaque condition sont analysées.

Polarisation cellulaire

La polarisation des cellules a été visualisée par marquage fluorescent et immunomarquage des filaments d'actine et des jonctions serrées des cellules épithéliales, respectivement. Pour permettre l'accès des marqueurs de poids moléculaires relativement importants aux composants cellulaires, les cellules ont été préalablement fixées. Un protocole commun aux deux types cellulaires a été suivi.
La coque d'alginate des capsules a été dissoute. Pour cela, les capsules sont placées dans du tampon PBS 1X/EDTA 0,25% pendant 1 minute. L'EDTA (l'acide éthylènediaminetétraacétique) étant un chélatant des cations divalents. Les structures cellulaires sont ensuite fixées avec 4% (v/v) de paraformaldéhyde (Sigma) dans du tampon PBS (Sigma) pendant 30 minutes. Par la suite, les cellules sont perméabilisées avec 0,1% Triton X-100 pour permettre la pénétration des marqueurs à travers la membrane cellulaire. Entre chaque étape, les cellules sont rincées 3 fois au PBS. Différents marquages sont alors réalisés sur ces cellules fixées.

Les Caco-2 et les NRC cellules sont incubées en présence de phalloïdine couplée à l'Alexa Fluor 568 à une dilution de 1/300 et du réactif DAPI (excitation/ émission : 358/461) pendant 1 heure.
Pour visualiser les jonctions serrées établies par les cellules, l'immunofluorescence de la protéine zonula occludens-1 (ZO-1) et de la protéine kinase C (PKC) a été réalisé respectivement sur les Caco-2 et les NRC. Un anticorps polyclonal lapin anti-ZO-1 (Abcam, ab96587) et un anticorps polyclonal lapin anti-PKC gracieusement offert par le laboratoire ICPH, respectivement sont utilisés. Tous deux sont dilués dans un tampon bloquant (dilution 1 :100) puis ajoutés aux cellules fixées et incubés toute la nuit à 4°C sans agitation. Les cellules à l'état d'organoïdes sont ensuite rincées dans du PBS et les anticorps secondaires anti-lapin couplés tous deux à l'Alexa Fluor 488 (Abcam, ab150081) sont préparés dans du tampon bloquant (dilution 1 : 200) et incubés pendant 2 heures. Afin d'imager les structures, celles-ci sont rincées au tampon PBS.

Différenciation des cellules épithéliales

Les propriétés sécrétrices des cellules ont été sondées, par l'immunomarquage de la mucoprotéine mucine-2 (MUC-2) et l'utilisation du traceur fluorescent le 6-carboxyfluorescéine diacétate sur les Caco-2 et les NRC respectivement. Un anticorps de souris monoclonal MC2 (Abcam, 11197) et un anticorps secondaire anti-souris couplé à l'Alexa Fluor 555 (ThermoFisher, A-21424) ont été utilisés. Le protocole de fixation des cellules et d'immunomarquage des Caco-2 est identique à celui utilisé pour la protéine ZO-1.

La CFDA est une molécule membranaire qui devient fluorescente et excitable par fluorescence lorsqu'elle est hydrolysée en 6-carboxyfluoresceine (CF) par des estérases intracellulaires.[142] La CFDA (ThermoFisher, C400) est ajoutée à une dilution finale de 1/500 aux capsules contenant les NRC, et incubée pendant 45 minutes à 37°C.

V.2.2 Une couche d'hydrogel hybride pour la formation d'une monocouche cellulaire

Comme nous l'avions mentionné au chapitre précédent, lors de précédents travaux au sein du laboratoire, Doméjean et ses collaborateurs ont montré que les cellules du colon de souris, les CT26 étaient capables de former un épithélium reposant sur cet hydrogel hybride. En utilisant la même stratégie, nous avons tenté de reproduire cette structure avec les Caco-2.

A l'issue de l'encapsulation, le développement des cellules a été suivi pendant 20 jours. Des séquences temporelles montrant le développement des cellules dans les capsules contenant un cœur de HEC et un cœur de HEC avec une couche d'hydrogel hybride sont respectivement reportées aux Figure V. 5 et Figure V. 6 . Nous observons la formation d'amas cellulaires au bout de quelques jours dans les deux cas. Cependant, en présence d'un cœur liquide, les agrégats formés sont globalement de plus petite taille que ceux en présence d'un hydrogel hybride. En absence de collagène, les cellules prolifèrent donc moins. Par ailleurs, au sein de ces agrégats nous notons des différences de morphologie. En effet, en présence de collagène les Caco-2 forment deux types d'agrégats : des agrégats où les cellules restent assez sphériques et n'adhèrent pas entre elles et des agrégats compacts où les cellules semblent s'auto-organiser. En absence de collagène, tous les agrégats présentent la première configuration énoncée. Par ailleurs, le test de viabilité réalisé au bout de 20 jours nous indique que les cellules dans les deux cas restent vivantes.

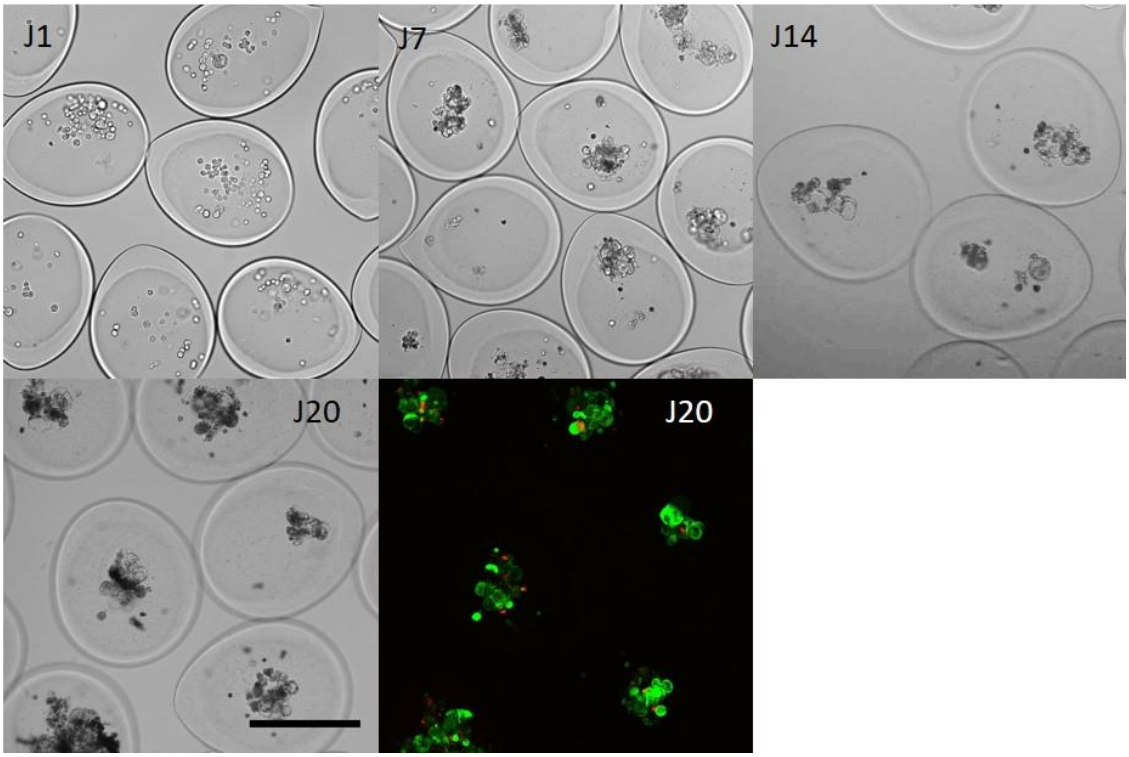

Figure V. 5 : Suivi temporelle des cellules Caco-2 en culture dans des capsules constituées d'un cœur de HEC. La barre d'échelle représente 200 µm.

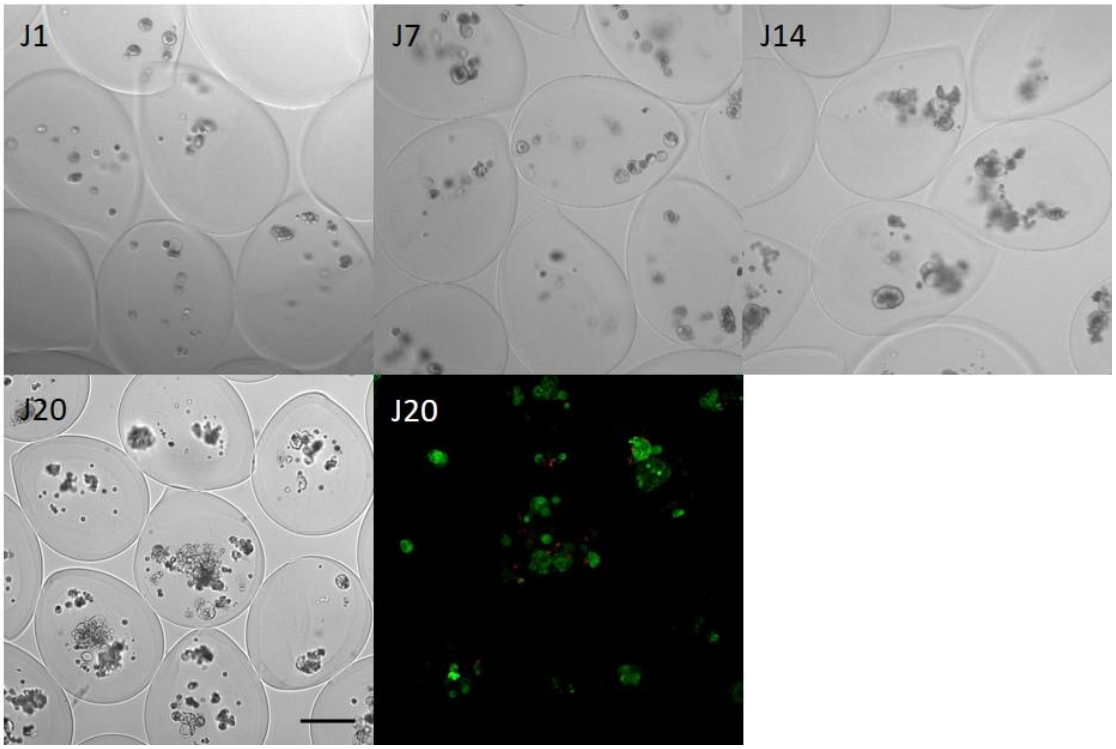

Figure V. 6 : Suivi temporelle des cellules Caco-2 en culture dans des capsules constituées d'un cœur de HEC et d'une couche intermédiaire d'hydrogel hybride. La barre d'échelle représente 200 µm.

Par ailleurs, nous notons la présence d'importantes vacuoles de taille pouvant atteindre jusqu'à quatre fois la taille de la cellule lorsque les cellules sont dans un cœur liquide (Figure V. 7). Lin *et al.,*[143] ont observé ces vacuoles lorsque les cellules sont en présences de nanoparticules d'oxydes. La formation de ces vacuoles résulterait de la perturbation de la fonction lysosomale et de l'homéostasie cellulaire. Ainsi les cellules seraient en conditions de stress.

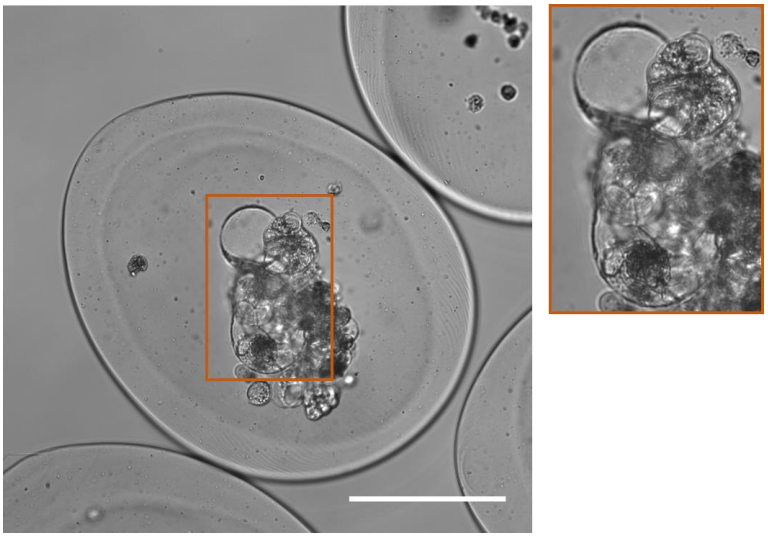

Figure V. 7 : Amas cellulaire des Caco-2 dans un cœur de HEC. Présence de vacuoles reflétant les conditions de stress dans lesquelles sont les cellules observées au 5e jour après encapsulation. La barre d'échelle représente 200 µm.

Au vue de ces résultats, nous pouvons affirmer que le cœur de HEC ne favorise pas le développement des Caco-2. En effet, les cellules prolifèrent très peu et présentent un aspect reflétant les conditions de stress dans lequel elles sont. Par ailleurs, contrairement aux CT26, les cellules n'adhèrent pas à la couche d'hydrogel hybride pour former une monocouche cellulaire. Cependant la présence du collagène dans l'hydrogel hybride semble orienter les cellules vers la formation de quelques agrégats où les cellules sont cohésives. Ainsi, nous nous proposons d'encapsuler les Caco-2 dans une matrice de collagène formant le cœur des capsules.

V.2.3 Une matrice de collagène au cœur des capsules

Au sein d'une matrice de collagène, les Caco-2 forment des agrégats d'aspect compacts et relativement denses. Cependant, nous observons à partir du cinquième jour de culture des zones au cœur de la capsule dépourvue de collagène. Cette déstabilisation de la matrice de collagène est illustrée à la (Figure V. 8). Il semblerait que l'adhésion entre le collagène du cœur et l'alginate de la coque soit faible. Ce phénomène observé est produit à partir de la formation d'un agrégat suffisamment dense. En effet, au sein des capsules où des amas cellulaires sont toujours peu denses et individualisés, la matrice de collagène ne semble pas avoir été modifiée.

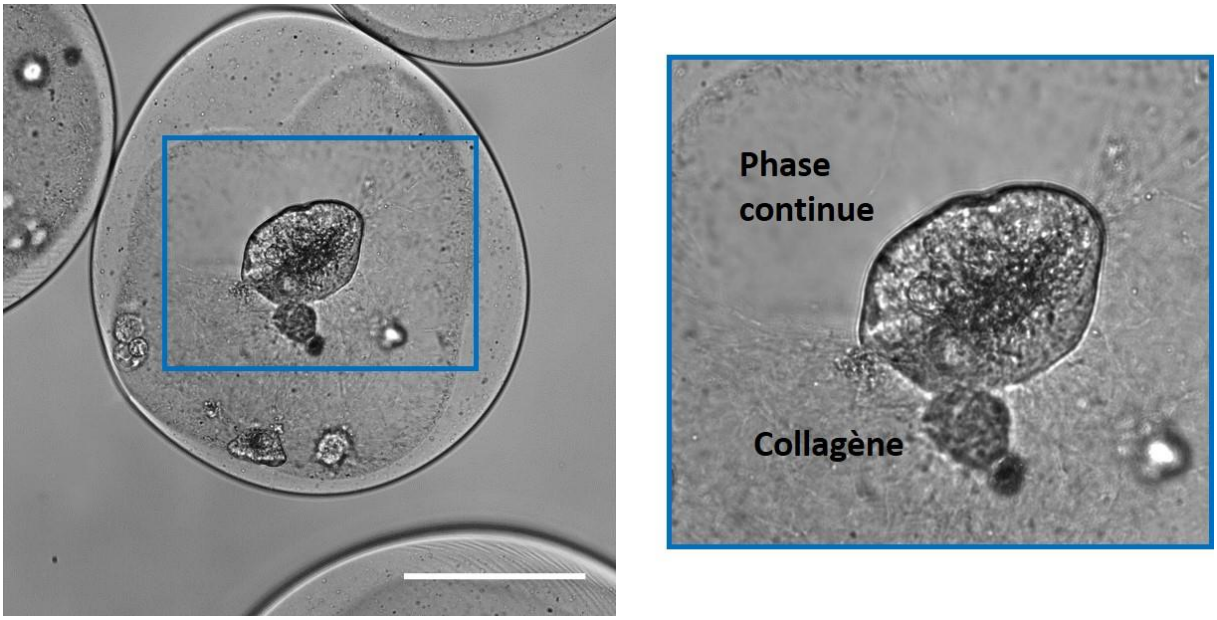

Figure V. 8 : Déstabilisation de la matrice de collagène au cœur de la capsule par un amas de cellules Caco-2 observée au 5e jour après encapsulation. La barre d'échelle représente 200 µm.

V.2.4 Implémentation d'une monocouche d'hydrogel hybride pour stabiliser la matrice de cœur

À la suite des premières observations d'effondrement de la matrice, nous avons décidé de stabiliser celle-ci en implémentant une couche intermédiaire d'hydrogel hybride composé de collagène et d'alginate entre le cœur et la coque. En effet, notre hypothèse est que lors de la transition sol-gel, l'alginate et le collagène contenus dans la couche intermédiaire établissent des interactions avec les biopolymères des solutions de coque et de cœur respectivement afin de renforcer l'adhésion entre la matrice de collagène et la membrane de la capsule. L'hydrogel hybride permettrait ainsi l'ancrage des fibres de collagène dans celui-ci. Le développement des Caco-2 au sein d'une matrice de collagène consolidée par l'ajout de l'hydrogel hybride est illustré à la Figure V. 9. Au bout de 12 jours, nous n'observons pas d'importantes zones dépourvues en fibres de collagène comme auparavant en absence d'hydrogel hybride. La matrice de collagène semble avoir été conservée. Nous remarquons cependant la présence de fibres étirées qui sont à la fois soumises aux forces de traction des cellules et retenues par l'hydrogel hybride *via* des points d'attache. Compte tenu de ce résultat, l'hydrogel hybride semble jouer son rôle de stabilisant. Nous faisons alors le choix de le conserver dans la suite des travaux.

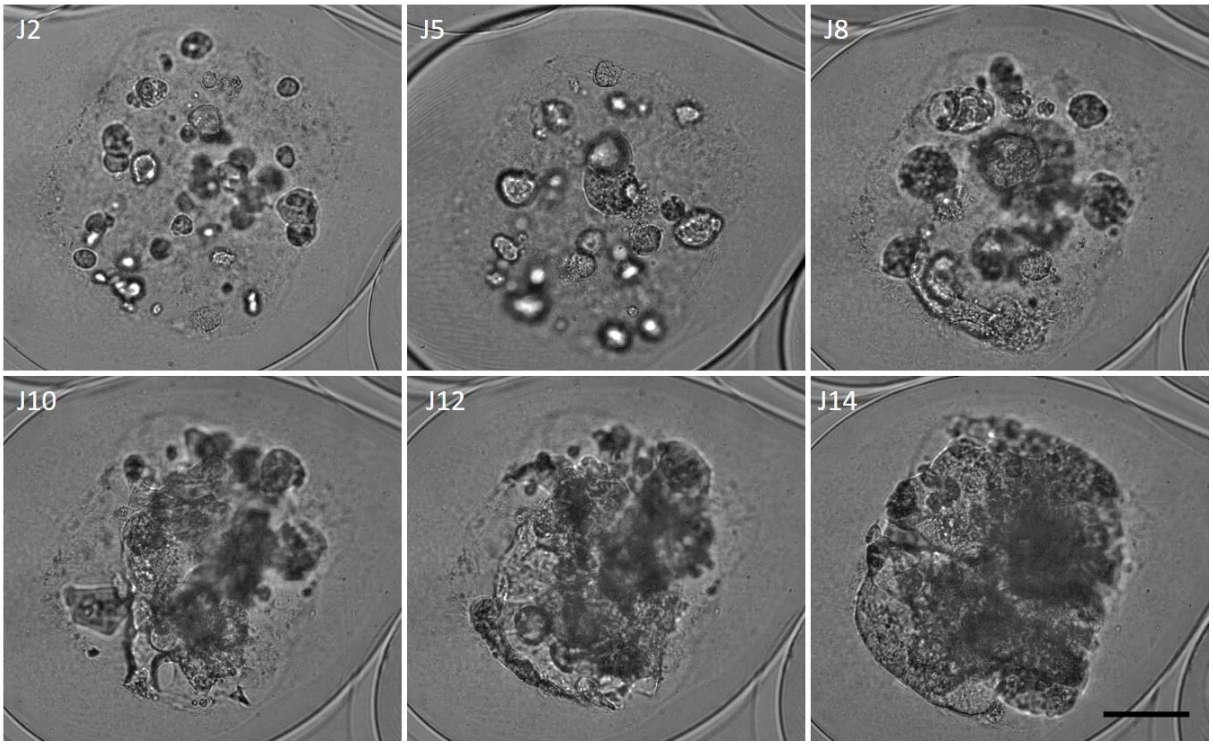

Figure V. 9 : Stabilisation de la matrice de collagène par la couche intermédiaire d'hydrogel hybride. La barre d'échelle représente 100 µm.

A présent, nous allons nous intéresser aux structures cellulaires tridimensionnelles formées au sein de cette matrice de collagène consolidée par la couche d'hydrogel hybride. Nous souhaitons identifier les processus biologiques impliqués dans l'établissement de ces structures.

Généralement, les amas cellulaires sont formés par deux principaux processus : la migration cellulaire et la prolifération. La migration cellulaire est fondamentale pour l'établissement d'une structure propre des organismes multicellulaires.[144] A titre d'exemples, elle est impliquée dans de nombreux processus physiologiques tels que la morphogenèse, la réponse immunitaire, l'homéostasie tissulaire, la cicatrisation de la peau et le renouvellement de l'épithélium intestinal. A grande échelle, elle est impliquée dans la migration des feuillets épithéliaux au cours de la gastrulation et à petite échelle dans le mouvement des cellules individualisées. Ce processus est commun à un grand nombre de cellules composant les organismes unicellulaires et pluricellulaires, rares sont les cellules non motiles.

Divers mécanismes assurent le mouvement des cellules *via* des extensions cytoplasmiques ou membranaires telles que les cils, les flagelles ou encore des protrusions. Dans ce manuscrit, nous nous limiterons à la présentation du mécanisme de migration par protrusion. Il s'agit d'un mécanisme qui se

déroule en plusieurs étapes. Globalement, la cellule émet d'abord une extension cytoplasmique sous l'effet de la polymérisation de l'actine qui induit une déformation du cytosquelette. La protéine d'actine est une protéine des plus abondantes du cytosquelette des cellules de mammifères. Cette déformation du cytosquelette donne naissance à des protrusions. Il en existe de deux types : les lamellipodes, relativement aplaties et de large diamètre et les filopodes, de forme cylindrique et plus fines. Ces protrusions se différencient également par l'organisation interne des filaments d'actine. Les filopodes sont caractérisés par un agencement unidirectionnel des filaments sous forme de faisceaux alors que les lamellipodes par l'enchevêtrement des filaments. Une fois formée, cette extension s'ancre à la matrice *via* des molécules d'adhérence telles que les intégrines. Par la suite la contraction du cytosquelette d'actinomyosine assure le déplacement cellulaire par traction sur les adhérences focales et rétractation de l'arrière de la cellule. Ainsi ces sites d'adhésion représentent l'interface mécanique entre la cellule et la matrice extracellulaire. Historiquement, la migration cellulaire a longtemps été étudié sur des surfaces de culture cellulaire en 2D.[145] Ces études ont permis d'identifier les complexes protéiques impliqués dans l'activation de la polymérisation d'actine au cours de la formation des protrusions.[146] Cependant la morphologie des cellules, la localisation du noyau à l'arrière de la cellule et le mode de migration de celles-ci dans un environnement 2D est différent de chez l'animal. Plusieurs chercheurs se sont tournés vers la culture tridimensionnelle qui reproduit plus fidèlement les propriétés biochimiques et biomécanique du microenvironnement.[147,148]

La migration cellulaire peut être orientée par des facteurs chimiques et/ou physiques. Les cellules sécrètent des molécules dites chimio attractantes dont elles expriment également le récepteur. Lorsque la concentration est suffisamment détectable par les cellules, le processus de migration est déclenché. Par ailleurs, la migration cellulaire est également guidée par plusieurs paramètres biophysiques, à savoir[148] :

- les propriétés mécaniques[149] ;
- la porosité de l'hydrogel ;[150]
- la densité des ligands RGD, présents au niveau des fibres de collagène ;[151]
- et la direction de ces fibres au sein de la matrice.[152]

De récents travaux ont montré la corrélation entre la vitesse de migration des cellules et la taille des pores de l'hydrogel. Plus les pores sont de petite taille et plus grand sera l'encombrement stérique et ainsi il sera d'autant plus difficile aux cellules de se déplacer.[148] La microstructure de l'hydrogel influence grandement le mode de migration cellulaire au sein de la matrice. Lorsque la taille des pores de la matrice est largement plus grande que la taille des noyaux des cellules, celles-ci se déplacent par déformation de son cytosquelette : on parle de mode amoeboïde.[150] Dans certains cas, il a été observé que le noyau peut se

fragmenter. Piel et ses collaborateurs ont étudié le rôle du complexe protéique cytosolique ESCRT III sur la réparation de l'enveloppe nucléaire.[153] Si par contre, elles se déplacent en digérant les fibres de collagène, il s'agit alors d'une migration protéolytique où sont impliquées les métalloprotéinases.

Afin de déterminer par quels mécanismes les Caco-2 forment les organoïdes, nous avons suivi le développement des cellules au sein des capsules à cœur de collagène par imagerie en temps réel pendant 3 semaines à des intervalles de temps courts. Deux cas de figures ont été observés et sont illustrés aux Figure V. 10 et Figure V. 11.

Lorsque deux amas cellulaires sont suffisamment proches l'un de l'autre, les cellules migrent par émission de protrusions puis fusionnent (Figure V. 10). Cependant, si l'amas de cellules est assez éloigné des cellules voisines, alors les amas vont avoir tendance à proliférer jusqu'à ce que la distance entre les agrégats de cellules soit suffisamment faible pour permettre le contact entre eux puis fusionner (Figure V. 11).

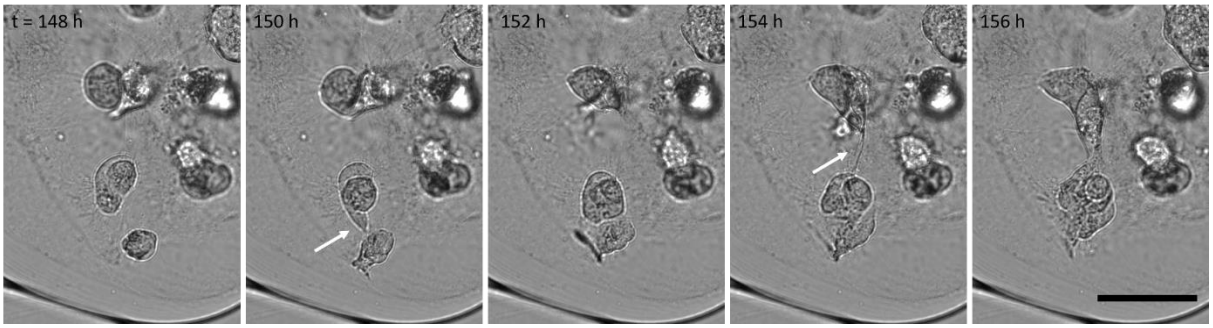

Figure V. 10 : Migration de cellules par émission de protrusions représentées par les flèches blanches puis fusion des amas cellulaires. La barre d'échelle représente 10 µm et l'intervalle de temps entre chaque image est de 2 heures.

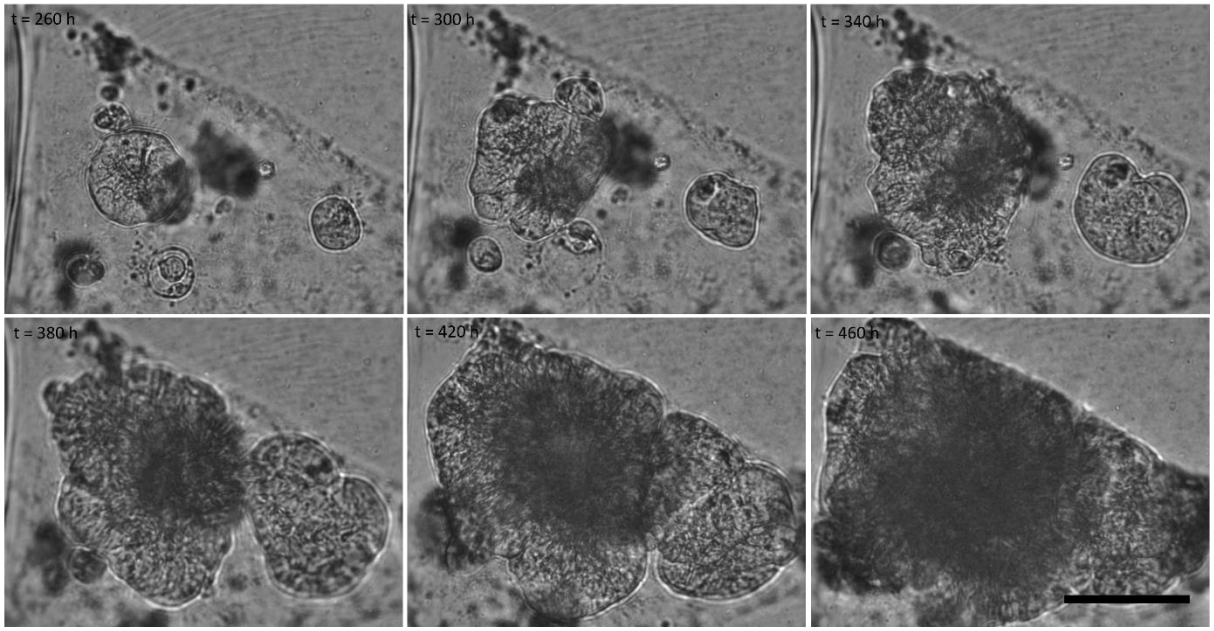

Figure V. 11 : Prolifération des amas cellulaires jusqu'à atteindre une taille critique minimisant la distance entre les amas suivie de leur fusion. La barre d'échelle représente 100 µm et l'intervalle de temps en chaque image est de 40 heures.

V.2.5 Formation d'organoïdes

Il est intéressant d'évaluer l'effet du procédé d'encapsulation sur la viabilité des cellules. Avant l'encapsulation de la suspension de cellules, nous avons estimé le taux de mortalité cellulaire par coloration au bleu trypan et comptage des cellules à l'aide d'une cellule de Malassez. Nous avons déterminé un taux de mortalité moyen (comptage réalisé sur deux échantillons) relativement faible de l'ordre de 1%. Ce taux de mortalité est comparé à celui obtenu au lendemain de l'encapsulation des cellules. Pour déterminer ce taux, nous avons marqué les cellules aux colorants couramment utilisés pour évaluer la viabilité cellulaire, à savoir l'iodure de propidium, la calcéine AM et le Hoescht. Le comptage a été réalisé sur un échantillon de 12 capsules au lendemain de l'encapsulation. Nous avons déterminé un taux de mortalité approximatif de 15% induite par le procédé d'encapsulation. En effet au cours de l'encapsulation, une fois les cellules comptées, elles sont placées dans la glace pendant la préparation des solutions de collagène et la mise en place du système d'injection qui globalement dure 20 à 30 minutes. Cette différence de viabilité peut s'expliquer par le fait que les cellules épithéliales aient été maintenues en suspension dans la glace avant d'être encapsulées. Cependant, ce taux de mortalité reste relativement faible et ne semble ni augmenter au cours du développement des cellules au sein des capsules ni perturber la formation d'une structure tridimensionnelle. En effet, nous retrouvons au bout de 20 jours, le même nombre de cellules mortes qu'au lendemain de l'encapsulation (Figure V. 12).

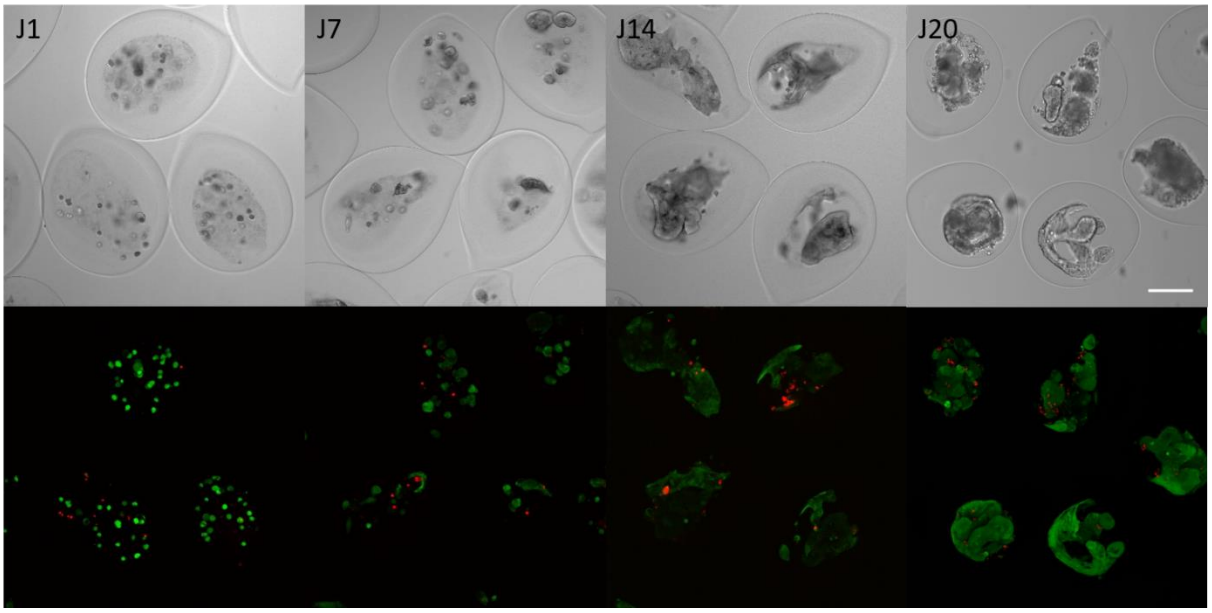

Figure V. 12 : Evolution temporelle d'un ensemble de cellules Caco-2 contenues dans des capsules constituées d'un cœur de collagène et d'une couche intermédiaire d'hydrogel hybride contenant les cellules Caco-2 en culture pendant 20 jours. Essai de viabilité des cellules : les cellules vivantes (vert) et les cellules mortes (rouge). La barre d'échelle représente 200 µm.

Au sein de cette matrice de collagène, à partir d'une vingtaine de cellules individualisées en moyenne par capsule, les Caco-2 ont formé des organoïdes de taille de l'ordre de 200 µm au bout de 21 jours. Nous observons diverses morphologies de ces structures. Nous distinguons des organoïdes compacts denses ou en feuillets (Figure V. 13).

Au vue des structures établies par les Caco-2 suite à leur prolifération, il est clair que celles-ci sont vivantes au sein de cette matrice. Comme nous l'avions montré à la section précédente, pour former ces structures, les cellules s'auto-assemblent et prolifèrent jusqu'à 3 à 4 semaines approximativement. Au-delà, les cellules deviennent sphériques et commencent peu à peu à se détacher les unes des autres.

A la Figure V. 13, une différence de densité cellulaire est observée : nous distinguons des structures très denses et compactes qui occupent tout le cœur de la capsule (Figure V. 13-3) et des structures présentant une morphologie différente et moins dense (Figure V. 13-4). Ceci s'explique par le fait que les concentrations d'ensemencement initiales des capsules sont dû au gradient de concentration lors de l'injection du volume de la suspension cellulaire. Nous précisons que les expériences d'encapsulation des cellules ont été réalisées avant la rectification de la dispersion des particules énoncée au chapitre III.

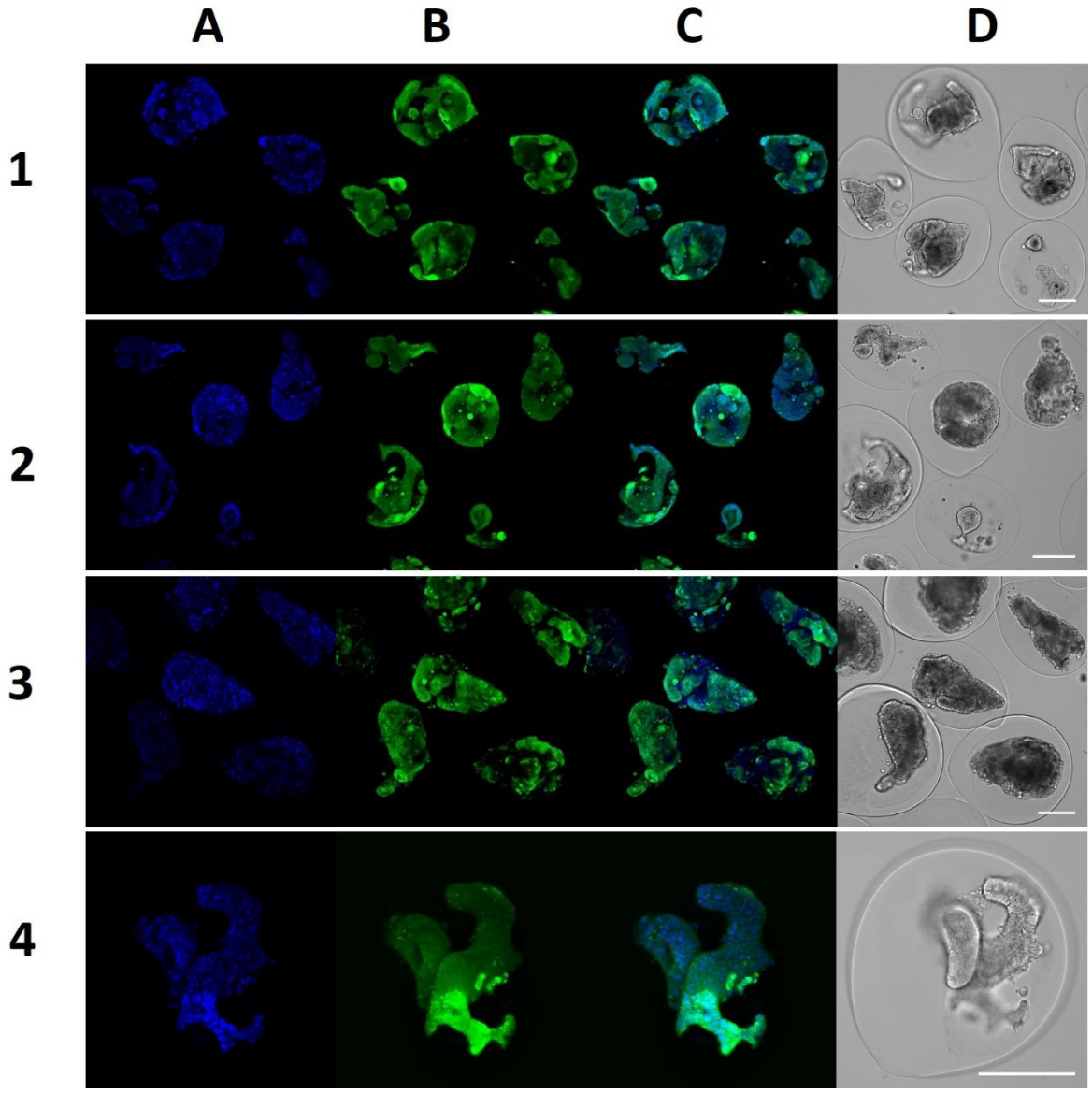

Figure V. 13 : Divers Organoïdes de Caco-2 formés au bout de 21 jour numéroté de 1 à 4. Marquage fluorescent des noyaux au Hoesct en bleu (A), des cytoplasmes des cellules vivantes à la calcéine AM en vert (B). La superposition des deux marquages (C) et les clichés en lumière blanche (D). La barre d'échelle représente 200 µm.

V.2.6 Des cellules Caco-2 polarisées formant des épithéliums

Plusieurs auteurs ont montré que ces cellules sont capables de former des structures polarisées au sein d'une matrice tridimensionnelle. La plupart des travaux utilisent le Matrigel®. Elles sont caractérisées par deux domaines membranaires distincts : apicale et basolatérale et notamment par une forte adhésion intercellulaire *via* des jonctions serrées[154].

Lorsque les cellules sont polarisées, elles présentent une accumulation de faisceaux d'actine au pôle apicale. Afin de mettre en évidence la polarisation des cellules encapsulées au sein de la matrice de collagène, nous avons utilisé la phalloïdine conjugée à un fluorophore pour sonder les filaments d'actine. La phalloïdine est une protéine d'une masse molaire approximative de 800 $g.mol^{-1}$ appartenant à la famille des toxines qui est communément utilisée pour imager sélectivement les filaments d'actine de cellules perméabilisées. Celle-ci est conjuguée à un fluorophore permettant ainsi de localiser par fluorescence l'actine au sein de la structure cellulaire. Nous observons une accumulation de l'actine sur les membranes plasmiques des cellules à la périphérie des organoïdes. A la Figure V. 14 sont illustrées la coupe médiane et la structure globale de deux organoïdes. Nous remarquons que la phalloïdine, mettant en évidence la polymérisation de l'actine, est accumulée au niveau de la surface externe des structures. Ainsi nous en déduisons que la surface apicale de ces organoïdes est située à la périphérie externe.

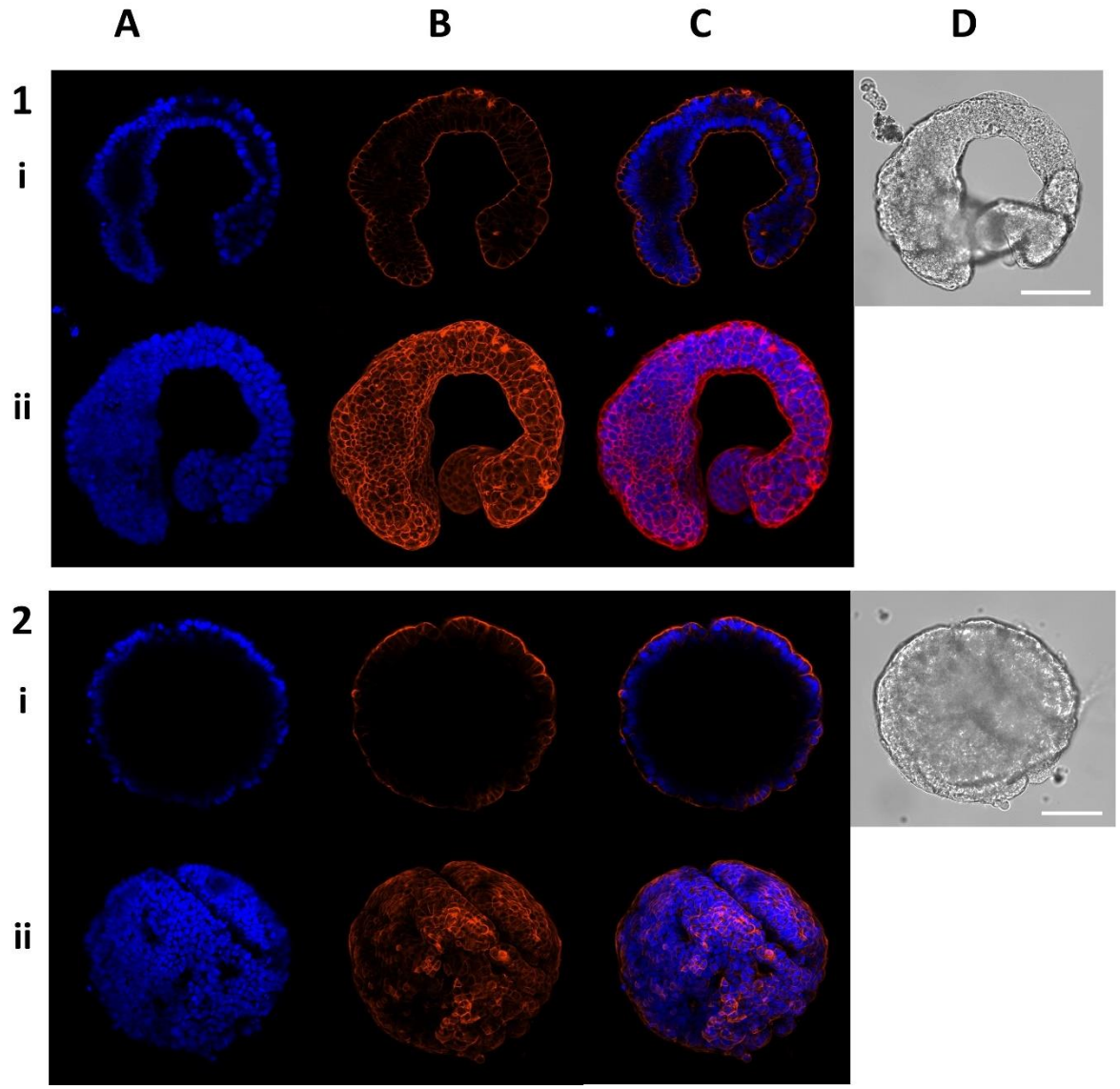

Figure V. 14 Formation d'organoïdes polarisés de cellules épithéliales Caco-2 au sein d'une matrice de collagène (1-2). Marquage fluorescent des noyaux au Hoechst en bleu (A), des filaments d'actine à la phaloïdine couplée à l'Alexa Fluor 540 (B). La superposition des deux marquages (C) et les clichés en lumière blanche (D). Coupe médiane de la structure (i) et projection des coupes de la structure (ii). La barre d'échelle représente 100 µm.

Nous savons que l'établissement de jonctions serrées au pôle apical détermine l'intégrité de l'épithélium intestinal. A présent, nous souhaitons vérifier si les cellules ont fait l'acquisition de cette deuxième caractéristique propre à la polarisation des cellules. Pour visualiser la présence des jonctions serrées au sein de ces organoïdes, nous avons procédé à un marquage d'immunofluorescence par l'utilisation d'anticorps dirigés contre une protéine composant ces jonctions, ZO-1. Les images obtenues

par ce marquage confirment la présence de jonctions serrées et ainsi la formation d'un épithélium de Caco-2 (Figure V. 15).

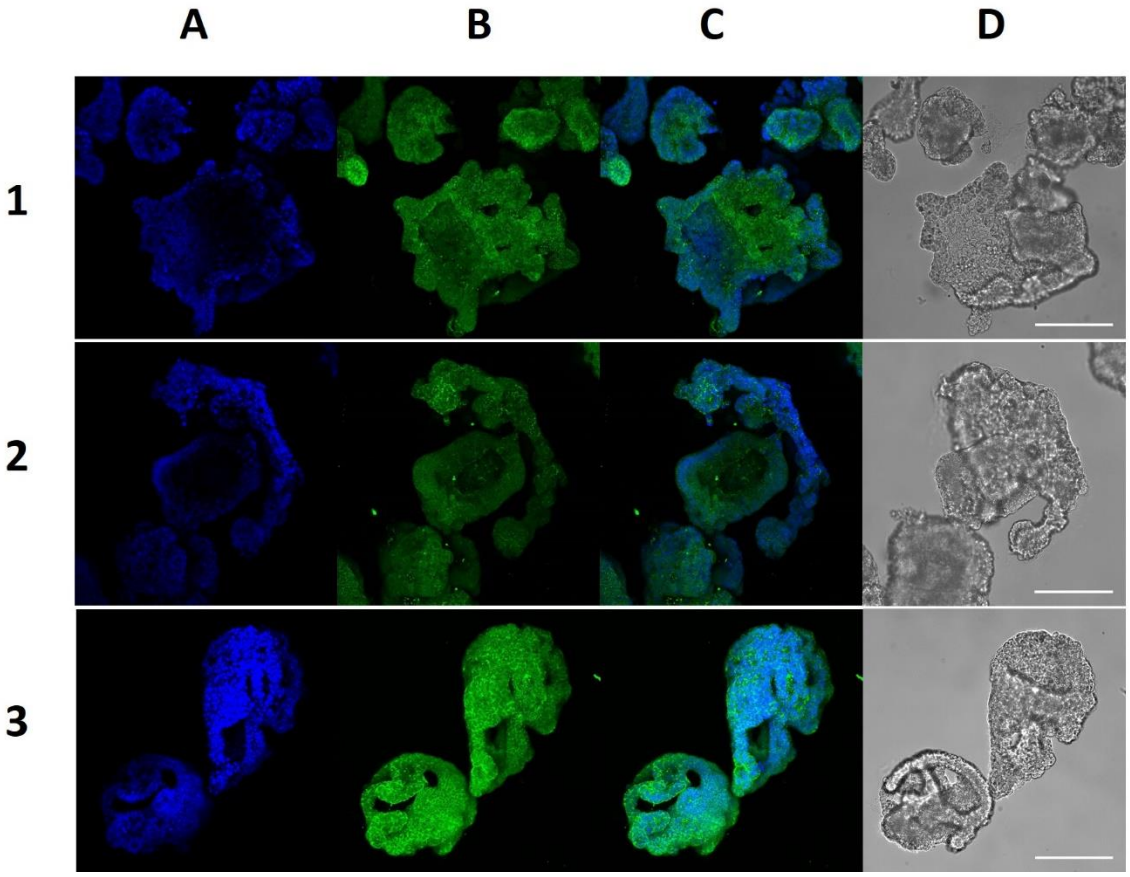

Figure V. 15: Mise en évidence de la présence des jonctions serrées au sein des organoïdes numéroté de 1 à 3. Marquage fluorescent des noyaux au Hoechst en bleu (A) et immunomarquage de zonula occludens-1 (ZO-1) (B). La superposition des deux marquages (C) et les clichés en lumière blanche (D). La barre d'échelle représente 100 µm.

V.2.7 Des cellules sécrétrices de mucus

Jusqu'à présent, nous avons démontré la formation d'un épithélium de Caco-2 polarisé. Une des fonctions essentielles de l'épithélium intestinal est sa fonction de barrière qui implique la production de mucus au pôle apical des cellules. Nous poursuivons alors notre étude sur les Caco-2 par vérifier si ces cellules sont capables de produire un composant du mucus. La mucine-2 est une mucoprotéine communément produite par l'intestin humain et c'est sur celle-ci que nous allons porter notre attention. L'immunomarquage dirigé vers mucine-2 a révélé la présence de sécrétion de cette protéine au bout de

21 jours au niveau de la surface externe des organoïdes (Figure V. 16). Ainsi nous déduisons que les Caco-2 se sont bien différenciées et sont fonctionnelles.

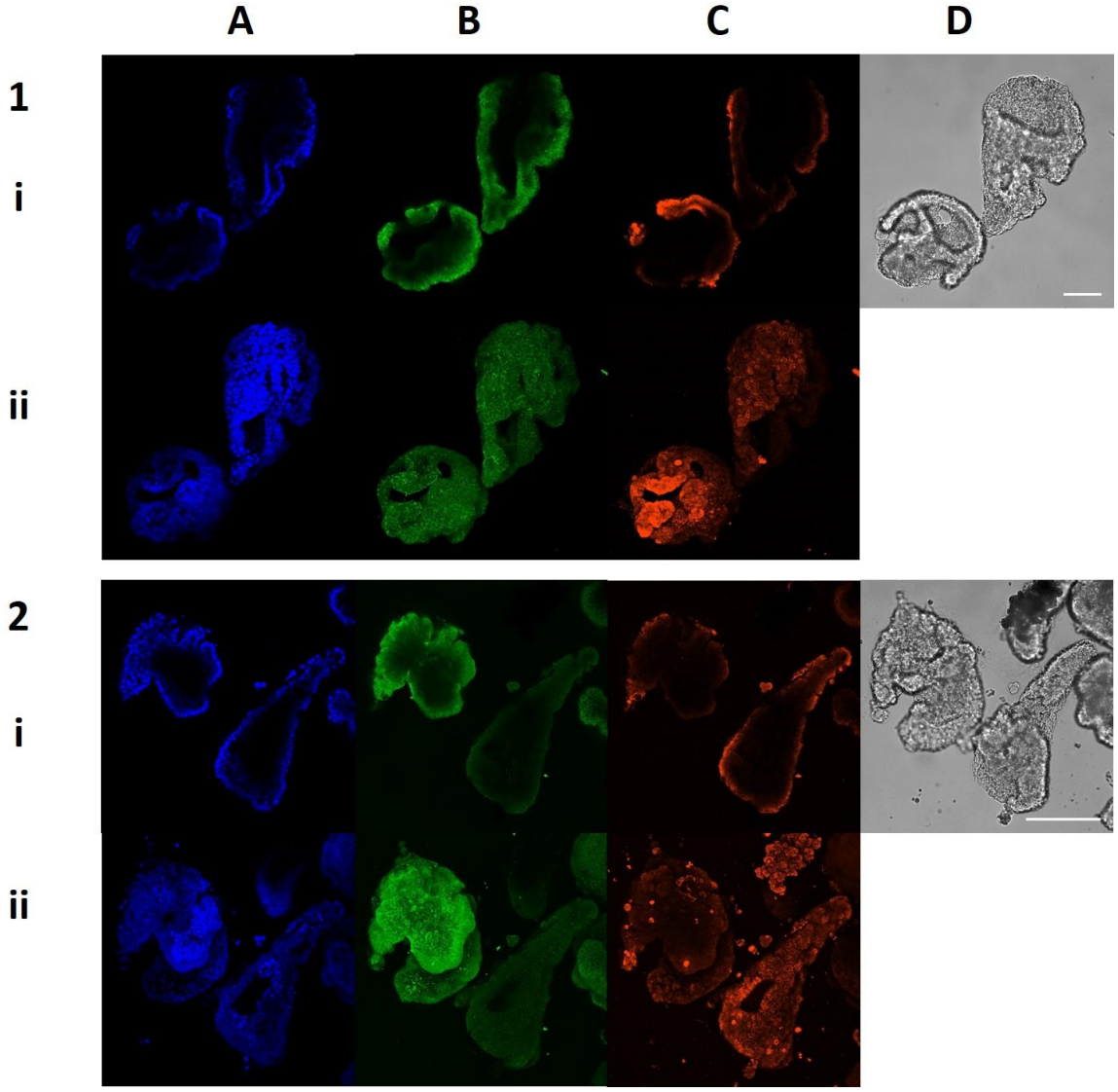

Figure V. 16 : Mise en évidence de la sécrétion de la protéine mucine des organoïdes polarisés (1-2). . Marquage fluorescent des noyaux au Hoechst en bleu (A), immunomarquages de zonula occludens-1 (ZO-1) (B), de la mucine-2 (MUC-2) (C) et les clichés en lumière blanche (D). Coupe médiane de la structure (i) et projection des coupes de la structure (ii). La barre d'échelle représente 100 µm.

En conclusion, en comparaison à un cœur liquide de HEC, la matrice solide de collagène de type I s'est révélée être un environnement pertinent et très favorable à la formation d'organoïdes de Caco-2. Les marquages fluorescents et les immunomarquages, démontrent que les Caco-2 forment un épithélium polarisé et suggèrent fortement la formation d'un lumen où les cellules sont organisées en une

monocouche continue. Par ailleurs, ces résultats semblent suggérer l'acquisition la fonction de barrière intestinale par la sécrétion de mucus.

Le marquage des filaments d'actine a mis en évidence que la polarité apicale de ces structures est à la périphérie externe de ces structures. Ainsi nous retrouvons au sein de ces structures, une courbure similaire à celle retrouvée chez l'*in vivo*. Par ailleurs, du fait que le pôle apical soit à la périphérie externe, ceci peut s'avérer être un avantage pour un accès facilité à la surface apicale de l'organoïde notamment pour des études d'interactions entre le microbiote intestinal et son hôte.

V.3 Une matrice solide de collagène pour le développement des cholangiocytes

Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe Protéines ciliaires et différenciation des cholangiocytes dirigée par Mme Pascale Dupuis-Williams au sein du laboratoire Interactions cellulaires et physiopathologie hépatique, nous nous sommes intéressés à un second type cellulaire : les cholangiocytes normaux de rat (NRC). Les cholangiocytes constituent avec les hépatocytes, les cellules épithéliales du foie. Tous deux sont des cellules différenciées de l'hépatoblaste (cellules précurseurs embryonnaires). Les cholangiocytes sont les cellules qui forment les conduits biliaires et connectent le foie à l'intestin pour sécréter la bile. Ces cellules contrôlent le débit du flux de la bile et son pH par la sécrétion d'eau et d'électrolytes (principalement de bicarbonate) respectivement.

Les cholangiocytes possèdent à leur surface apicale des cils qui constituent des chemio-, osmo- et mécano-capteurs des cellules épithéliales. Le dysfonctionnement de ces cils qui caractérise les ciliopathies hépatiques, maladies rares liées au cil fait l'objet de nombreux travaux au sein du laboratoire ICPH. Jusqu'à présent au sein de ce laboratoire, pour étudier l'organogenèse des NRC, les cellules sont dispersées dans des matrices de Matrigel® ou de collagène de type I en volume notamment par la technique de *sandwich.* Cette technique consiste à ensemencer les cellules sur une première couche d'hydrogel déposée sur une surface (plaque de puits par exemple) puis à les recouvrir par une deuxième. Du fait d'un volume d'ensemencement relativement important, il a été observé que les cellules restent isolées et forment très peu de micro-tissus.

L'encapsulation des cellules *via* notre procédé permettrait de confiner et ainsi de favoriser la proximité entre les cellules pour *in fine* aboutir à la formation de micro-tissus. Par ailleurs, la formation de ces capsules permettrait d'individualiser ces micro-tissus formés.

Afin d'élargir la palette de micro-tissus se formant au sein des capsules d'hydrogels hybrides, nous avons donc procédé à une encapsulation des cellules NRC. Nous présentons alors dans cette partie du manuscrit les résultats préliminaires obtenus.

Nous précisons que pour l'encapsulation des cellules NRC, nous avons suivi la même méthode d'encapsulation que celle établie pour les cellules intestinales. Le protocole de culture cellulaire utilisé est énoncé à la section V.2.1.

V.3.1 Formation de structures cellulaires en épithélium

A l'issue de l'encapsulation des NRC à deux concentrations cellulaires : 1.10^6 de cellules/mL et 5.10^5 cellules/mL dans une matrice de collagène, nous avons observé qu'à faible concentration les cellules sont peu nombreuses et distantes les unes des autres. Elles sont incapables de s'auto-assembler et restent isolées. A l'inverse, à 1.10^6 de cellules/mL, les cellules se sont organisées pour former soit une structure en forme de feuillet (Figure V. 17-2) soit une structure qui semble contenir un lumen (Figure V. 17-4).

Similairement aux Caco-2, les filaments d'actine des cellules NRC ont été marqués à la phalloïdine (Figure V. 18). Nous observons l'accumulation d'actine à la périphérie des structures cellulaires montrant la polymérisation de celle-ci. Ces résultats suggèrent grandement la formation d'un épithélium.
Afin de démontrer l'établissement d'un épithélium, nous nous sommes intéressés à une deuxième caractéristique spécifique des cellules formant un épithélium : la présence de jonction serrées. Nous avons alors procédé à l'immunomarquage de la PKC. Cette kinase membranaire est une composante d'un complexe protéique impliquée dans la formation des jonctions serrées. La présence de cette protéine est imagée à la Figure V. 19. Comme nous pouvons l'observer, la présence de fluorescence verte est localisée à la périphérie. Ceci nous informe la présence de PKC et donc de la formation des jonctions serrées.

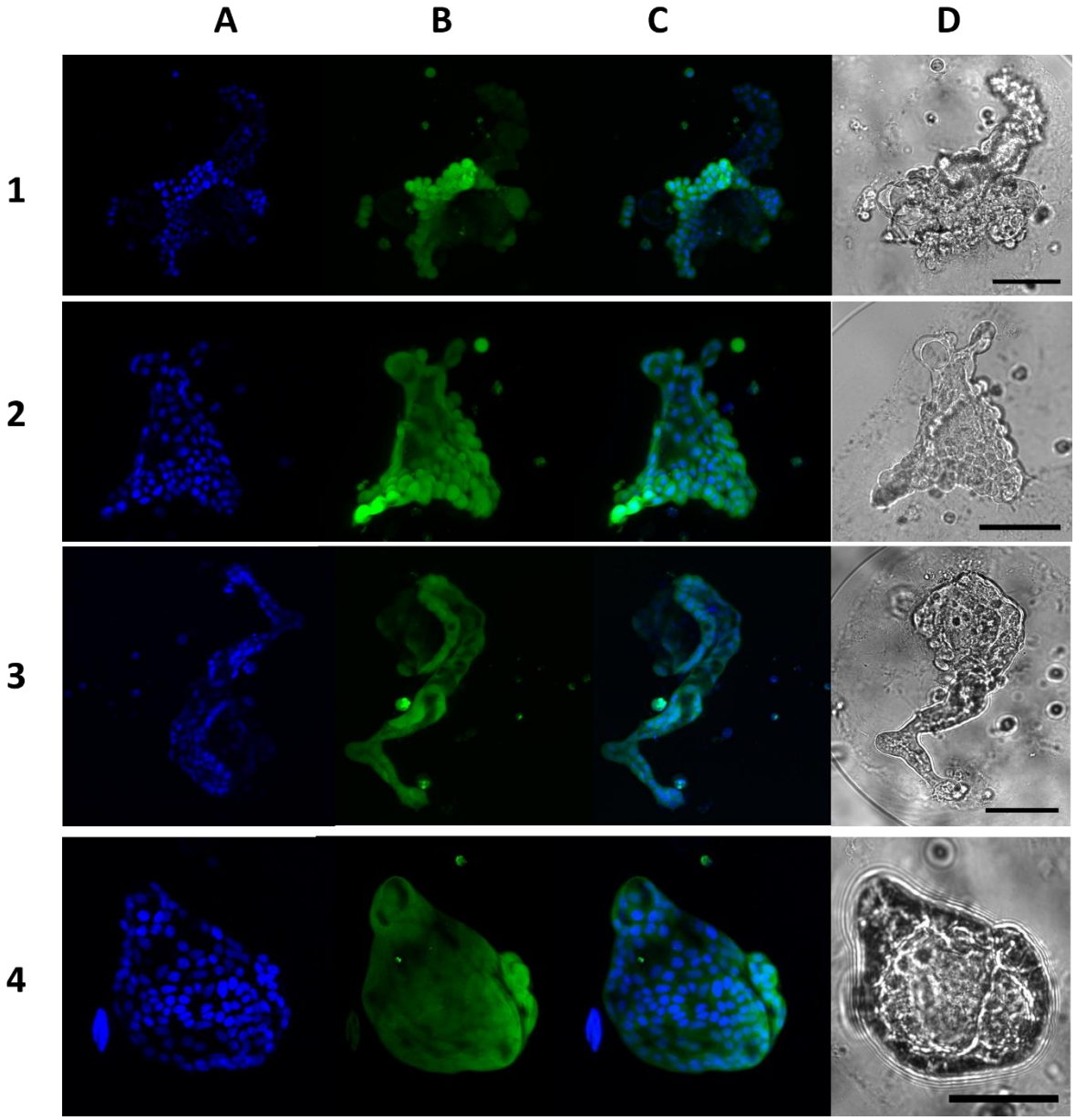

Figure V. 17 : Différentes structures formées par les NRC numérotées de 1 à 4. Marquage fluorescent des noyaux au Hoesct en bleu (A), des cytoplasmes à la calcéine AM en vert (B). La superposition des deux marquages (C) et les clichés en lumière blanche (D).

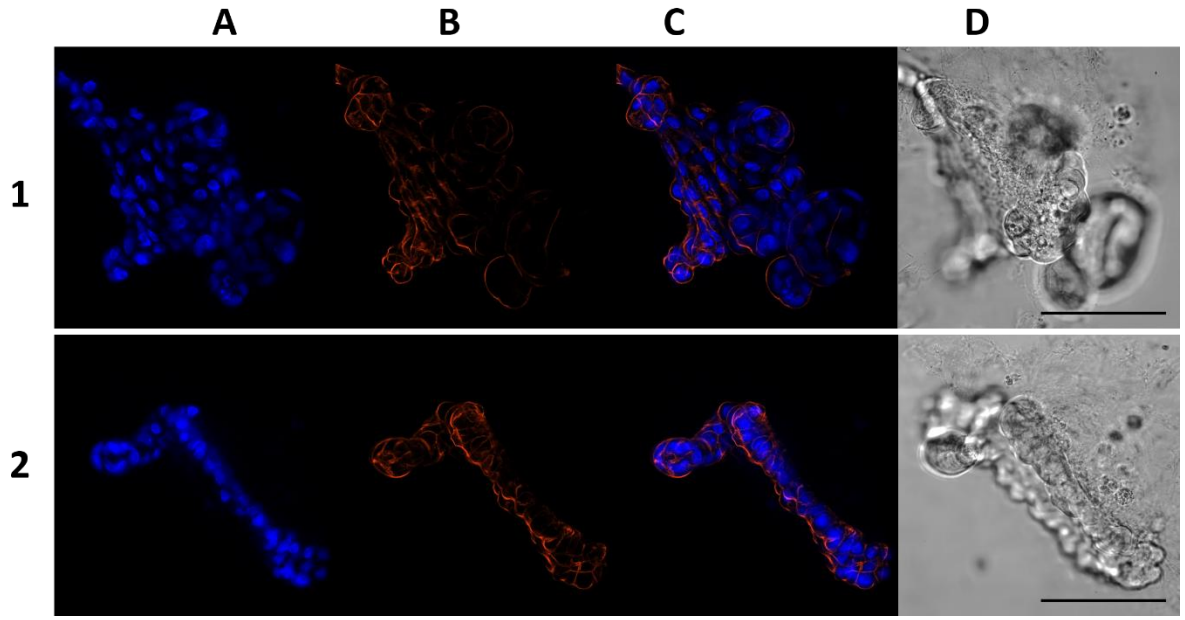

Figure V. 18 : Les cellules NRC formant des épithélium (1 et 2). Marquage fluorescent des noyaux au Hoesct en bleu (A), des filaments d'actine à la phalloïdine couplée à l'Alexa Fluor 540 en orange (B). La superposition des deux marquages (C) et les clichés en lumière blanche (D).

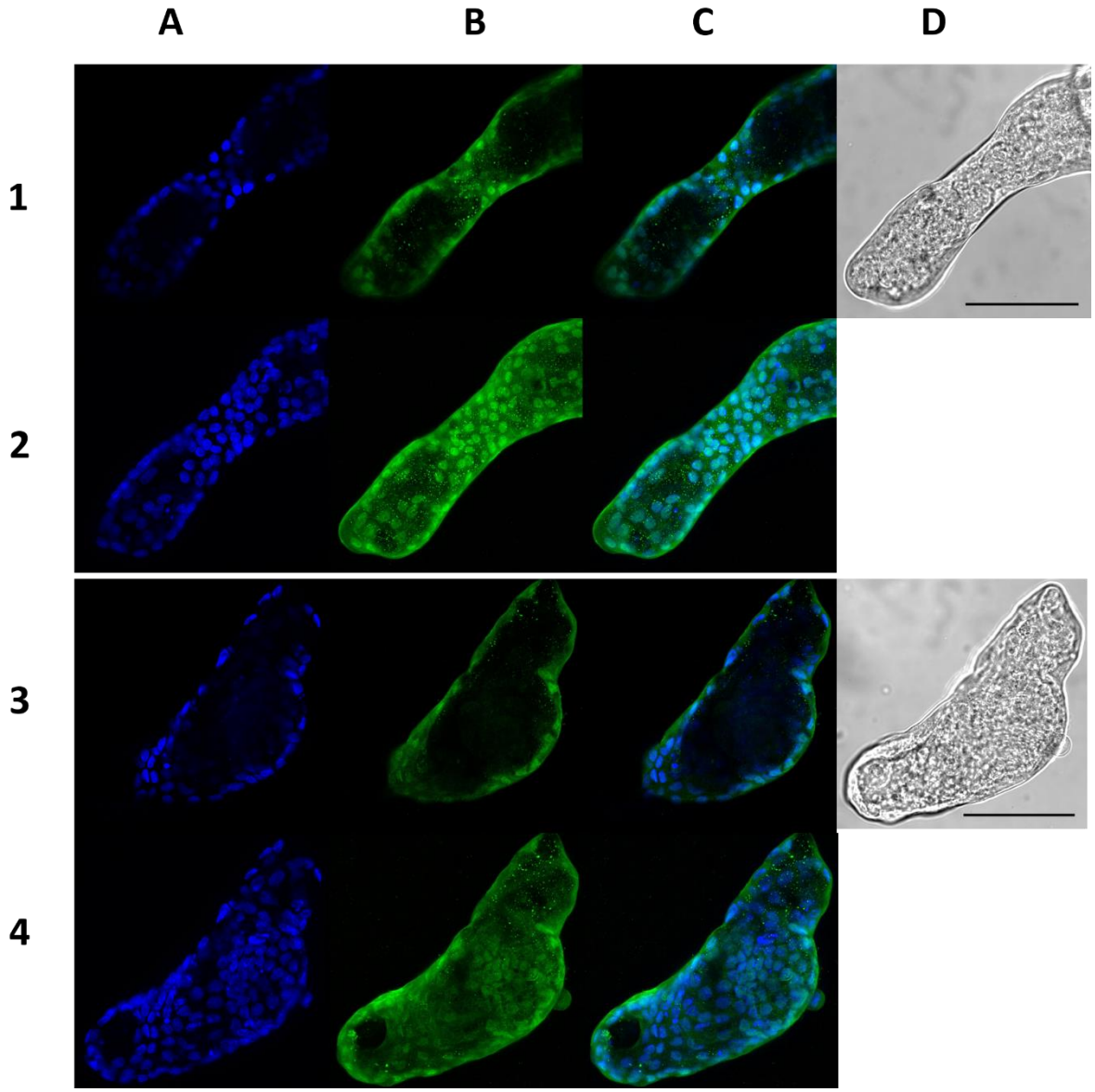

Figure V. 19 : Les cellules NRC formant des épithéliums (1 et 2). Marquage fluorescent des noyaux au Hoesct en bleu (A), des jonctions serrées par immunomarquage en vert (B). La superposition des deux marquages (C) et les clichés en lumière blanche (D).

V.3.2 Des cellules fonctionnelles sécrétrices

Les précédents résultats nous ont permis de confirmer la formation d'un épithélium polarisé. Maintenant, nous souhaitons nous focaliser sur la fonctionnalité de ces cellules. Etant donné que les cholangiocytes sont les cellules formant les canaux biliaires et impliqués dans la sécrétion et l'acheminement de la bile, nous avons sondé cette propriété majeure des cholangiocytes. Pour cela, nous incubons les cellules NRC en présence d'une molécule exogène, la CFDA. L'hydrolyse de la CFDA en CF, une molécule fluorescente nous permet de visualiser la sécrétion de cette molécule exogène. Au bout de 45 minutes, nous observons de la fluorescence relativement importante dans la totalité du compartiment interne des structures tridimensionnelles indiquant alors que l'hydrolyse s'est bien produite et qu'il y a bien la formation d'un lumen (Figure V. 20). La non superposition des fluorescences bleu et verte correspondant respectivement aux noyaux et à la présence de CF nous confirme que cette dernière a bien été sécrétée (Figure V. 20-1 et Figure V. 20-3). Par ailleurs, ce marquage fluorescent nous indique que la sécrétion se produit à la surface apicale des cellules. Ainsi les cellules NRC ont acquis une polarité apico-basale physiologique.

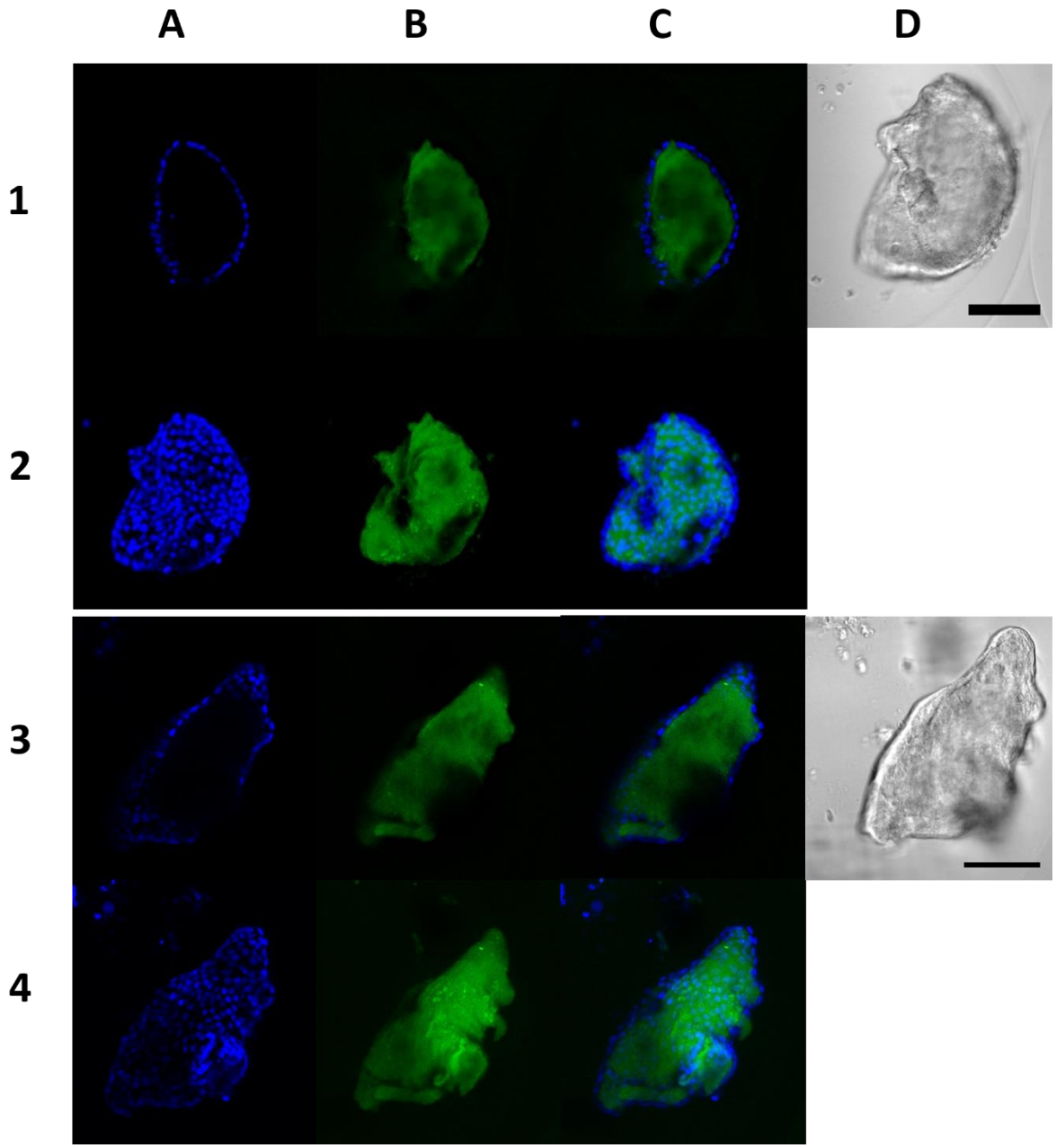

Figure V. 20 : Les cellules NRC hydrolysent et sécrètent la CFDA. Marquage fluorescent des noyaux au Hoechst en bleu (A), molécules CF en vert (B). La superposition des deux marquages (C) et les clichés en lumière blanche (D). (1 et 3) Coupes médianes et (2 et 4) Superposition des coupes de la structure.

Conclusion

Le principe d'encapsulation repose sur la co-extrusion et la fragmentation dans l'air de fluides suivie par la gélification de l'enveloppe des bi-gouttes formées.

Un jet composé est soumis à une perturbation harmonique à l'aide d'un actuateur piézoélectrique pour permettre de contrôler l'instabilité capillaire et ainsi d'obtenir des gouttes calibrées. Une électrode placée au niveau de la zone de fragmentation du jet composé permet de charger les bi- gouttes formées. Les interactions répulsives conduisent à la séparation des bi gouttes afin d'éviter le phénomène de coalescence dans l'air. Ainsi, nous parvenons à produire des objets de taille identique de l'ordre de 500 µm. Les bi-gouttes sont ensuite immergées dans un bain permettant de gélifier la solution de coque.

Au chapitre III, nous nous sommes intéressés à l'écoulement d'une dispersion de particules non browniennes de volume fini dans un tube, suivi de sa fragmentation en gouttes. Cette étude, réalisée à partir d'une dispersion modèle, visait à comprendre les phénomènes observés lors de l'encapsulation de cellules de mammifères qui ne prolifèrent pas et en nombre suffisant pour permettre la formation d'un sphéroïde fonctionnel.

Cela nous a conduit à mener tout d'abord une étude sur la dispersion convective de particules micrométriques dans un tube. Dans les conditions de débits requis par le procédé d'encapsulation, nous observons que la dispersion convective de particules, donc longitudinale, est affectée par le développement d'une couche de déplétion de particules proche des parois. En effet les particules n'explorant pas la zone de vitesse faible, la dispersion est moins étalée le long de l'écoulement. Aux conditions de vitesse et de taille des particules considérées, l'inertie du fluide porteur entre en jeu. Les particules subissent alors une force de portance qui les éloigne de la paroi et modifie la distribution radiale de ces dernières.

Afin de limiter cette dispersion, nous avons ajouté des bulles aux deux extrémités de l'échantillon afin de le compartimenter. Nous avons alors mis en lumière un phénomène d'accumulation de particules à l'avant de la dispersion c'est-à-dire derrière la première bulle. Cette accumulation est également due à la migration latérale des particules qui résulte en un flux net de particules dirigé le long de l'écoulement. Nous avons évalué un débit critique et donc un nombre de Reynolds au-dessus duquel le phénomène apparait. En dessous de ce nombre de Reynolds critique, la concentration de l'échantillon sous écoulement reste homogène. D'un point de vue pratique, afin d'encapsuler un même nombre de cellules par capsule,

il suffit alors d'augmenter le diamètre du tube avant l'injecteur ou bien la viscosité de la phase porteuse tout en maintenant le même débit.

A l'aide de cette dispersion modèle, nous avons étudié l'impact de la présence de ces particules sur la formation et la fragmentation du jet. Nous mettons en évidence un phénomène de battement similaire à celui observé lorsqu'il existe un contraste de propriétés viscoélastiques des deux fluides en co-écoulement. Nous observons une oscillation de la position du fluide de cœur au cours du temps. Les mécanismes sous-jacents restent à être élucidés. La présence de quelques particules au sein du jet entraine la déstabilisation de la fragmentation initialement rendue régulière à l'aide de l'actuateur piézoélectrique. Nous supposons que la taille des particules, qui est du même ordre de grandeur que le diamètre du jet, est à l'origine de ce phénomène. En effet, la présence des particules modifie le champ de vitesse et donc de contraintes visqueuses au sein de l'injecteur dont leur relaxation en sortie d'injecteur contrôle la position de l'interface libre du jet. Une dispersion diluée de particules non browniennes étant caractérisé par une fraction volumique hétérogène induit des modulations erratiques du diamètre du jet amplifié par l'instabilité capillaire. A des fractions volumiques similaires à celles utilisées pour l'encapsulation de cellules non prolifératives, nous avons déterminé des conditions de fréquence et de tension de l'actuation minimisant l'impact des particules sur la fragmentation contrôlée du jet.

Certaines cellules ont besoin d'une matrice dans laquelle elles se développent pour former un micro-tissu. Dans cette thèse, au chapitre IV, nous avons ajouté une nouvelle fonctionnalité aux capsules en implémentant une matrice extracellulaire. Le collagène de type I, une protéine abondante de la MEC a été choisi afin de constituer ce nouveau compartiment cellulaire. L'hydrogel de collagène se forme dans les conditions physiologiques. L'incorporation des cellules dans la solution de collagène nécessite de se mettre dans des conditions de pH et d'osmolarité qui induisent alors la gélification du collagène. Il a fallu donc trouver des solutions pour retarder la gélification adaptée également au procédé qui implique la co-extrusion à haute vitesse de polyélectrolytes. Nous avons d'abord suivi une stratégie précédemment proposée qui consiste à travailler à froid. En effet, l'agrégation étant thermodynamiquement activée, l'abaissement de la température permet de ralentir la cinétique de cette dernière. Malheureusement, nous n'avons pas pu obtenir une fragmentation régulière et donc des capsules de composition homogène. Les caractéristiques de la fragmentation de ce jet composé sont à rapprocher à celle de la dispersion de particules. Ceci laisse à penser que la gélification n'a pas été suffisamment retardée et qu'il existe donc des agrégats de l'ordre de quelques dizaines de micromètres. Nous avons adopté une autre stratégie pour modifier la cinétique d'agrégation. Celle-ci est basée sur l'utilisation de l'ion sulfate qui modifie la cinétique

d'agrégation des micro-fibrilles, qui est la première phase d'agrégation des oligomères de collagène. Nous obtenons ainsi des capsules possédant un cœur de collagène casi-homogène en taille. Des travaux complémentaires restent à être entrepris afin de caractériser les propriétés de structure et mécaniques de l'hydrogel de collagène *in situ*, à l'aide des techniques de micro-rhéologie par exemple.

Enfin, le chapitre V présente l'utilisation de ce procédé pour la formation de micro-tissus de cellules de mammifères encapsulées. Nous avons choisi d'encapsuler deux types de cellules épithéliales au sein de cette matrice : des cellules humaines cancéreuses du colon, les Caco-2 et les cholangiocytesde rat normaux (NRC). Le développement de ces cellules au sein de la matrice de collagène a abouti à la formation d'organoïdes, ainsi la biocompatibilité du procédé d'encapsulation a été démontrée.

Au sein de cette matrice, nous mettons en évidence la formation de structures polarisées en épithélium des cellules Caco-2. Les marquages réalisés suggèrent grandement la présence d'un lumen au sein de ces structures. Ces cellules ont également acquis la propriété de sécrétion de mucus, qui est caractéristique des cellules intestinales. Nous avons noté que la surface apicale de ces organoïdes se situe à la périphérie externe. La polarité est donc inversée par rapport à celle physiologique. L'inversement de cette polarité apico-basolatérale pourrait s'avérer intéressante car dans ce cas l'accès à au pôle apical est plus accessible. La formation d'organoïdes de Caco-2 au sein de ces capsules à cœur solide de collagène pourrait trouver des applications en pharmacologie pour l'étude d'absorption intestinale de molécules ou encore l'étude des interactions hôte-pathogène.

L'encapsulation des cellules NRC a également permis de former des épithéliums caractérisés par une polarité apico-basolatérale physiologique. Nous avons montré la formation d'un lumen au sein de ces structures sécrétrices. Ces organoïdes sont donc fonctionnels.

Ainsi, la formation de divers micro-tissus cellulaires au sein de ces capsules à cœur solide de collagène, caractérise la versatilité de cet outil innovant de culture cellulaire. Ce procédé d'encapsulation permet de produire des bioréacteurs à haut débit. Cet atout du procédé est pertinent pour des applications de criblage à haut débit en pharmacologie.

Références

1. Harrison, R. G., Greenman, M. J., Mall, F. P. & Jackson, C. M. Observations of the living developing nerve fiber. *Anat. Rec.* **1,** 116–128 (1907).
2. Harrison, R. G. The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic movement. *J. Exp. Zool.* **9,** 787–846 (1910).
3. E. Cukierman, Pankov, R., Stevens, D. R. & Yamada, K. M. Taking Cell-Matrix Adhesion to the Third Dimension. *Science (80-.).* **294,** 1704–1708 (2001).
4. McBeath, R., Pirone, D. M., Nelson, C. M., Bhadriraju, K. & Chen, C. S. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stemm cell lineage commitment. *Dev. Cell* **6,** 483–495 (2004).
5. Thomas, C. H., Collier, J. H., Sfeir, C. S. & Healy, K. E. Engineering gene expression and protein synthesis by modulation of nuclear shape. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99,** 1972–1977 (2002).
6. Petersen, O. W., Ronnov-Jessen, L., Howlett, A. R. & Bissell, M. J. Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89,** 9064–9068 (1992).
7. Von Der Mark, K., Gauss, V., Von Der Mark, H. & Müller, P. Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture [26]. *Nature* **267,** 531–532 (1977).
8. Debnath, J. & Brugge, J. S. Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures. *Nat. Rev. Cancer* **5,** 675–688 (2005).
9. Nelson, C. M. *et al.* NIH Public Access. *J. Phys. (main title)* **22,** 16–19 (2010).
10. Edmondson, R., Broglie, J. J., Adcock, A. F. & Yang, L. Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. *Assay Drug Dev. Technol.* **12,** 207–218 (2014).
11. Medical, F. O. R. the Development in Vitro of Chimeric Aggregates of. 184–194 (1956).
12. Akkerman, N. & Defize, L. H. K. Dawn of the organoid era: 3D tissue and organ cultures revolutionize the study of development, disease, and regeneration. *BioEssays* **39,** 1–10 (2017).
13. Clevers, H. Modeling Development and Disease with Organoids. *Cell* **165,** 1586–1597 (2016).
14. Lancaster, M. a *et al.* Europe PMC Funders Group Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* **501,** 373–379 (2013).
15. Franko, A. J., Parliament, M. B., Allalunis-Turner, M. J. & Wolokoff, B. G. Variable presence of hypoxia in M006 human glioma spheroids and in spheroids and xenografts of clonally derived sublines. *Br. J. Cancer* **78,** 1261–1268 (1998).
16. Hirschhaeuser, F. *et al.* Multicellular tumor spheroids: An underestimated tool is catching up again. *J. Biotechnol.* **148,** 3–15 (2010).
17. Lin, R. Z. & Chang, H. Y. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol. J.* **3,** 1172–1184 (2008).
18. Sato, T. *et al.* Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal

niche. *Nature* **459,** 262–265 (2009).

19. Spence, J. R. *et al.* NIH Public Access. *Nature* **470,** 105–109 (2011).

20. Campbell, J. J. & Watson, C. J. Three-dimensional culture models of mammary gland. *Organogenesis* **5,** 43–49 (2009).

21. Achilli, T., Meyer, J. & Morgan, J. R. Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids. *Expert Opin Biol Ther* **12,** 1347–1360 (2012).

22. Raghavan, S. *et al.* Comparative analysis of tumor spheroid generation techniques for differential in vitro drug toxicity. *Oncotarget* **7,** 16948–61 (2016).

23. Yuhas, J. M., Li, A. P., Martinez, A. O. & Ladman, A. J. A simplified method for production and growth of multicellular tumor spheroids. *Cancer Res.* **37,** 3639–43 (1977).

24. Ivascu, A. & Kubbies, M. Rapid generation of single-tumor spheroids for high-throughput cell function and toxicity analysis. *J. Biomol. Screen.* **11,** 922–932 (2006).

25. Paşca, A. M. *et al.* Functional cortical neurons and astrocytes from human pluripotent stem cells in 3D culture. *Nat. Methods* **12,** 671–678 (2015).

26. Foty, R. A Simple Hanging Drop Cell Culture Protocol for Generation of 3D Spheroids. *J. Vis. Exp.* **20,** 4–7 (2011).

27. Kelm, J. M., Timmins, N. E., Brown, C. J., Fussenegger, M. & Nielsen, L. K. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnol. Bioeng.* **83,** 173–180 (2003).

28. Messner, S., Agarkova, I., Moritz, W. & Kelm, J. M. Multi-cell type human liver microtissues for hepatotoxicity testing. *Arch. Toxicol.* **87,** 209–213 (2013).

29. Paper, W. Using Perfecta3D Hanging Drop Plates to Assess Chemosensitivity. *3D Biomatrix TM Three-Dimensional Cell Cult. - White Pap.* 1–11 (2011). doi:papers3://publication/uuid/1D187293-4058-452B-A24A-194F5A5BDACE

30. Kumar, A. *et al.* Large scale industrialized cell expansion: producing the critical raw material for biofabrication processes. *Biofabrication* **7,** 044103 (2015).

31. Cherry, R. S. Animal cells in turbulent fluids: Details of the physical stimulus and the biological response. *Biotechnol. Adv.* **11,** 279–299 (1993).

32. King, J. A. & Miller, W. M. Bioreactor development for stem cell expansion and controlled differentiation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **11,** 394–398 (2007).

33. Massai, D. *et al.* A versatile bioreactor for dynamic suspension cell culture. Application to the culture of cancer cell spheroids. *PLoS One* **11,** 1–16 (2016).

34. Ying, L., Munson, D. C., Koetter, R. & Frey, B. J. Multibaseline insar terrain elevation estimation: A dynamic programming approach. *IEEE Int. Conf. Image Process.* **3,** 157–160 (2003).

35. Peppas, N. A. & Merrill, E. W. Poly(Vinyl Alcohol) Hydrogels: Reinforcement of Radiation-Crosslinked Networks By Crystallization. *J Polym Sci Polym Chem Ed* **14,** 441–457 (1976).

36. K. Y. Lee, D. J. M. Alginate : properties and biomedical applications. *Prog. Polym. Sci.* **37,** 106–126 (2012).

37. Jen, A. C., Wake, M. C. & Mikos, A. G. Review: Hydrogels for cell immobilization. *Biotechnol.*

Bioeng. **50,** 357–364 (1996).

38. Lin, C. Q. & Bissell, M. J. Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. *FASEB J.* **7,** 737–43 (1993).

39. Hernández-Carmona, G., McHugh, D. J., Arvizu-Higuera, D. L. & Rodríguez-Montesinos, Y. E. Pilot plant scale extraction of alginate from Macrocystis pyrifera. 1. Effect of pre-extraction treatments on yield and quality of alginate. *J. Appl. Phycol.* **10,** 507–513 (1998).

40. Cole, D. R., Waterfall, M., McIntyre, M. & Baird, J. D. Microencapsulated islet grafts in the BB/E rat: a possible role for cytokines in graft failure. *Diabetologia* **35,** 231–237 (1992).

41. Koo, L. Y., Irvine, D. J., Mayes, A. M., Lauffenburger, D. a & Griffith, L. G. Co-regulation of cell adhesion by nanoscale RGD organization and mechanical stimulus. *J. Cell Sci.* **115,** 1423–1433 (2002).

42. Dhoot, N. O., Tobias, C. A., Fischer, I. & Wheatley, M. A. Peptide-modified alginate surfaces as a growth permissive substrate for neurite outgrowth. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **71,** 191–200 (2004).

43. Luís J. del Valle, A. D. and J. P. Hydrogels for Biomedical Applications: Cellulose, Chitosan, and Protein/Peptide Derivatives. *Gels* **3,** 27 (2017).

44. Gurski, L. A., Jha, A. K., Zhang, C., Jia, X. & Farach-, M. C. NIH Public Access. **30,** 6076–6085 (2010).

45. Moscato, S., Ronca, F., Campani, D. & Danti, S. Poly(vinyl alcohol)/gelatin Hydrogels Cultured with HepG2 Cells as a 3D Model of Hepatocellular Carcinoma: A Morphological Study. *J. Funct. Biomater.* **6,** 16–32 (2015).

46. Zahari, N. K., Idrus, R. B. H. & Chowdhury, S. R. Laminin-coated poly(Methyl methacrylate) (PMMA) nanofiber scaffold facilitates the enrichment of skeletal muscle myoblast population. *Int. J. Mol. Sci.* **18,** (2017).

47. Lutolf, M. P. *et al.* Synthetic matrix metalloproteinase-sensitive hydrogels for the conduction of tissue regeneration: Engineering cell-invasion characteristics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100,** 5413–5418 (2003).

48. Phelps, E. A. NIH Public Access. **6,** 1–12 (2013).

49. Hubbell, J. A. Synthetic biodegradable polymers for tissue engineering and drug delivery. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **3,** 246–251 (1998).

50. Metters, A. & Hubbell, J. Network formation and degradation behavior of hydrogels formed by Michael-type addition reactions. *Biomacromolecules* **6,** 290–301 (2005).

51. Polizzotti, B. D., Fairbanks, B. D. & Anseth, K. S. Three-dimensional biochemical patterning of click-based composite hydrogels via thiolene photopolymerization. *Biomacromolecules* **9,** 1084–1087 (2008).

52. Sanborn, T. J., Messersmith, P. B. & Barron, A. E. In situ crosslinking of a biomimetic peptide-PEG hydrogel via thermally triggered activation of factor XIII. *Biomaterials* **23,** 2703–2710 (2002).

53. Ehrbar, M. *et al.* Biomolecular hydrogels formed and degraded via site-specific enzymatic reactions. *Biomacromolecules* **8,** 3000–3007 (2007).

54. Lutolf, M. P. & Hubbell, J. A. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat. Biotechnol.* **23,** 47–55 (2005).

55. Tibbitt, M W., Anseth, K. S. Hydrogel as Extracellular Matrix Mimics for 3D Cell Culture. *NIH Public Access* **103,** 655–663 (2010).

56. Badylak, S. F., Freytes, D. O. & Gilbert, T. W. Reprint of: Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. *Acta Biomater.* **23,** S17–S26 (2015).

57. Pham, Q. P., Sharma, U. & Mikos, A. G. Electrospinning of Polymeric Nanofibers for Tissue Engineering Applications: A Review. *Tissue Eng.* **0,** 060509065116001 (2006).

58. Engler, A. J., Sweeney, H. L., Discher, D. E. & Schwarzbauer, J. E. Extracellular matrix elasticity directs stem cell differentiation. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* **7,** 335 (2007).

59. Brown, R. A., Wiseman, M., Chuo, C. B., Cheema, U. & Nazhat, S. N. Ultrarapid engineering of biomimetic materials and tissues: Fabrication of nano- and microstructures by plastic compression. *Adv. Funct. Mater.* **15,** 1762–1770 (2005).

60. Hendriks, J., Riesle, J. & Blitterswijk, C. A. van. Co-culture in cartilage tissue engineering. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **4,** 524–531 (2010).

61. Whitesides, G. M. The origins and the future of microfluidics. *Nature* **442,** 368–373 (2006).

62. Lauren L. Bischel, Edmond W.K. Young, Brianah R. Mader, and D. J. B. NIH Public Access. **34,** 1471–1477 (2014).

63. Verbridge, S. S. *et al.* Oxygen-controlled three-dimensional cultures to analyze tumor angiogenesis. *Tissue Eng. Part A* **16,** 2133–41 (2010).

64. Fang, C., Avis, I., Salomon, D. & Cuttitta, F. Novel phenotypic fluorescent three-dimensional platforms for high-throughput drug screening and personalized chemotherapy. *J. Cancer* **4,** 401–415 (2013).

65. Han, S. *et al.* A versatile assay for monitoring in vivo-like transendothelial migration of neutrophils. *Lab Chip* **12,** 3861–3865 (2012).

66. Günther, A. *et al.* A microfluidic platform for probing small artery structure and function. *Lab Chip* **10,** 2341–2349 (2010).

67. Laurence, I., Bernard, M., Creeth, E. & Stead, W. J. (12) United States Patent. **1,** (2001).

68. Eggers, J. & Villermaux, E. Physics of liquid jets. *Reports Prog. Phys.* **71,** (2008).

69. Christophe Clanet, J. C. L. J. Fluid Mech. **383,** 307–326 (1999).

70. Le, H. P. Progress and trends in ink-jet printing technology. *J. Imaging Sci. Technol.* **42,** 49–62 (1998).

71. Wijshoff, H. The dynamics of the piezo inkjet printhead operation. *Phys. Rep.* **491,** 77–177 (2010).

72. Duby, M. H., Deng, W., Kim, K., Gomez, T. & Gomez, A. Stabilization of monodisperse electrosprays in the multi-jet mode via electric field enhancement. *J. Aerosol Sci.* **37,** 306–322 (2006).

73. Utada, A. S. *et al.* Dripping, jetting, drops, and wetting: The magic of microfluidics. *MRS Bull.* **32,** 702–708 (2007).

74. Utada, A. S., Fernandez-Nieves, A., Stone, H. A. & Weitz, D. A. Dripping to jetting transitions in coflowing liquid streams. *Phys. Rev. Lett.* **99,** 1–4 (2007).

75. Chan, H. F. *et al.* Rapid formation of multicellular spheroids in double-emulsion droplets with

controllable microenvironment. *Sci. Rep.* **3,** 1–8 (2013).

76. Ungrin, M. D., Joshi, C., Nica, A., Bauwens, C. & Zandstra, P. W. Reproducible, ultra high-throughput formation of multicellular organization from single cell suspension-derived human embryonic stem cell aggregates. *PLoS One* **3,** (2008).

77. Lina Schukur. NIH Public Access. **2,** 195–205 (2014).

78. Dolega, M. E., Abeille, F., Picollet-D'hahan, N. & Gidrol, X. Controlled 3D culture in Matrigel microbeads to analyze clonal acinar development. *Biomaterials* **52,** 347–357 (2015).

79. Doméjean, H. *et al.* Controlled production of sub-millimeter liquid core hydrogel capsules for parallelized 3D cell culture. *Lab Chip* **17,** 110–119 (2017).

80. Propri, L. R. Propri ´ et ´ es physico-chimiques de capsules d ' hydrogel ` a coeur liquide To cite this version : Propriétés physico-chimiques de capsules d ' hydrogel à cœur liquide. (2013).

81. Alessandri, K. *et al.* Cellular capsules as a tool for multicellular spheroid production and for investigating the mechanics of tumor progression in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110,** 14843–14848 (2013).

82. Condell, R. A., Hanko, V. P., Larenas, E. A., Wallace, G. & McCullough, K. A. Analysis of native collagen monomers and oligomers by size-exclusion high-performance liquid chromatography and its application. *Analytical Biochemistry* **212,** 436–445 (1993).

83. Paredes JuÃ¡rez, G. A., Spasojevic, M., Faas, M. M. & de Vos, P. Immunological and Technical Considerations in Application of Alginate-Based Microencapsulation Systems. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2,** (2014).

84. McDonagh, B. H. Optimalised Carbodiimide Chemistry for RGD-coupled Alginate. 1–187 (2012).

85. Dom, H., Dom, H. & Paris, C. Formation de capsules d ' hydrogel ` a coeur aqueux par fragmentation d ' un jet compos ´ e de fluides complexes To cite this version : Docteur de l ' Université Pierre et Marie Curie. (2015).

86. Doméjean, H., Bibette, J. & Bremond, N. Traffic collision during the breakup of an aqueous viscous compound jet. *Phys. Rev. Fluids* **1,** 063903 (2016).

87. Leach, S. J. & Scheraga, H. A. Effect of Light Scattering on Ultraviolet Difference Spectra. *J. Am. Chem. Soc.* **82,** 4790–4792 (1960).

88. Antoine, E. E., Vlachos, P. P. & Rylander, M. N. Tunable collagen I hydrogels for engineered physiological tissue micro-environments. *PLoS One* **10,** 1–18 (2015).

89. Khan, S. a, Royer, J. R. & Raghavan, S. R. Rheology: Tools and Methods. *Aviation Fuels with Improved Fire Safety A Proceedings* 31–46 (1997). doi:10.1017/CBO9781107415324.004

90. Larson, R. G. *The structure and rheology of complex fluids*. (1999).

91. Taylor, G. Dispersion of Soluble Matter in Solvent Flowing Slowly through a Tube. *Proc. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **219,** 186–203 (1953).

92. Zhang, X., Shen, S. & Fan, L. Uniform polystyrene particles by dispersion polymerization in different dispersion medium. *Polym. Bull.* **61,** 19–26 (2008).

93. Mainard, M. & Jacob, D. Comprendre. La mesure de taille de nanoparticules par diffusion dynamique de la lumière. **1827,** 40–44 (1827).

94. Nelson & Cox. *Principles of Biochemistry*. *Chinese Journal of Integrative Medicine* **17,** (2011).

95. Drury, J. L. & Mooney, D. J. Hydrogels for tissue engineering: Scaffold design variables and applications. *Biomaterials* **24,** 4337–4351 (2003).

96. Parenteau-Bareil, R., Gauvin, R. & Berthod, F. Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications. *Materials (Basel).* **3,** 1863–1887 (2010).

97. Abraham, L. C., Zuena, E., Perez-Ramirez, B. & Kaplan, D. L. Guide to collagen characterization for biomaterial studies. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* **87,** 264–285 (2008).

98. McCance, K. L. *et al.* Collagen Structure and Stability. *PLoS One* **78,** 929–958 (2010).

99. Yang, W., Chan, V. C., Kirkpatrick, A., Ramshaw, J. A. M. & Brodsky, B. Gly-Pro-Arg confers stability similar to Gly-Pro-Hyp in the collagen triple-helix of host-guest peptides. *J. Biol. Chem.* **272,** 28837–28840 (1997).

100. Qiu, B. *et al.* Measurement of hydroxyproline in collagen with three different methods. *Mol. Med. Rep.* **10,** 1157–1163 (2014).

101. Jenkins, C. L., Bretscher, L. E., Guzei, I. A. & Raines, R. T. Effect of 3-hydroxyproline residues on collagen stability. *J. Am. Chem. Soc.* **125,** 6422–6427 (2003).

102. Eastoe, J. E. The amino acid composition of mammalian collagen and gelatin. *Biochem. J.* **61,** 589–600 (1955).

103. Ananthanarayanan, S. & Veis, A. The molecular parameters of monomeric and acid-soluble collagens. Low shear gradient viscosity and electric birefringence. *Biopolymers* **11,** 1365–1377 (1972).

104. Ramachandran, G. N. Structure of collagen [14]. *Nature* **177,** 710–711 (1956).

105. Rich, A. & Crick, F. H. C. The molecular structure of collagen. *J. Mol. Biol.* **3,** IN1-IN4 (1961).

106. Cowan, P. M., McGavin, S. & North, A. C. T. The polypeptide chain configuration of collagen. *Nature* **176,** 1062–1064 (1955).

107. Engel, J. & Bächinger, H. P. Structure, stability and folding of the collagen triple helix. *Top. Curr. Chem.* **247,** 7–33 (2005).

108. Kreger, S. T. *et al.* Polymerization and matrix physical properties as important design considerations for soluble collagen formulations. *Biopolymers* **93,** 690–707 (2010).

109. Wolf, K. *et al.* Collagen-based cell migration in vitro and in vivo. *Semin. Cell Dev. Biol.* **20,** 931–941 (2009).

110. Williams, R., Gelman, A. & Poppke, C. Barbara R. Williams, Robert A. Gelman,. (1978).

111. Antoine, E. E., Vlachos, P. P. & Rylander, M. N. Review of Collagen I Hydrogels for Bioengineered Tissue Microenvironments: Characterization of Mechanics, Structure, and Transport. *Tissue Eng. Part B Rev.* **20,** 683–696 (2014).

112. Cross, V. L. *et al.* NIH Public Access. **31,** 8596–8607 (2011).

113. Li, Y. & Douglas, E. P. Effects of various salts on structural polymorphism of reconstituted type I collagen fibrils. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **112,** 42–50 (2013).

114. Loo, R. W., Goh, J. B., Cheng, C. C. H., Su, N. & Goh, M. C. In vitro Synthesis of Native, Fibrous Long Spacing and Segmental Long Spacing Collagen. *J. Vis. Exp.* (2012).

doi:10.3791/4417

115. Canty, E. G. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J. Cell Sci.* **118,** 1341–1353 (2005).

116. Silver, F. H. & Trelstad, R. L. Linear aggregation and the turbidimetric lag phase: Type I collagen fibrillogenesis in vitro. *J. Theor. Biol.* **81,** 515–526 (1979).

117. Comper, W. D. & Veis, A. The mechanism of nucleation forin vitro collagen fibril formation. *Biopolymers* **16,** 2113–2131 (1977).

118. Helseth, D. L. & Veis, A. Collagen self-assembly in vitro. Differentiating specific telopeptide-dependent interactions using selective enzyme modification and the addition of free amino telopeptide. *J. Biol. Chem.* **256,** 7118–7128 (1981).

119. Silver, F. H. Type I Collagen Fibrillogenesis in Vitro. **256,** (1981).

120. Lees, S., Bonar, L. C. & Mook, H. A. A study of dense mineralized tissue by neutron diffraction. *Int. J. Biol. Macromol.* **6,** 321–326 (1984).

121. Petruska, J. A. & Hodge, A. J. a Subunit Model for the Tropocollagen Macromolecule. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **51,** 871–876 (1964).

122. Licup, A. J. *et al.* Stress controls the mechanics of collagen networks. **112,** (2015).

123. Bancelin, S., Aimé, C., Coradin, T. & Schanne-Klein, M.-C. In situ three-dimensional monitoring of collagen fibrillogenesis using SHG microscopy. *Biomed. Opt. Express* **3,** 1446 (2012).

124. Wood, G. C. & Keech, M. K. The formation of fibrils from collagen solutions 1. The effect of experimental conditions: kinetic and electron-microscope studies. *Biochem. J.* **75,** 588–598 (1960).

125. Silver, F. H. & Birk, D. E. Kinetic Analysis of Collagen Fibrillogenesis: I. Use of Turbidity-Time Data. *Top. Catal.* **3,** 393–405 (1983).

126. Aukkanit, N. & Garnjanagoonchorn, W. Temperature effects on type I pepsin-solubilised collagen extraction from silver-line grunt skin and its in vitro fibril self-assembly. *J. Sci. Food Agric.* **90,** 2627–2632 (2010).

127. Li, Y., Asadi, A., Monroe, M. R. & Douglas, E. P. pH effects on collagen fibrillogenesis in vitro: Electrostatic interactions and phosphate binding. *Mater. Sci. Eng. C* **29,** 1643–1649 (2009).

128. Kuznetsova, N., Chi, S. L. & Leikin, S. Sugars and polyols inhibit fibrillogenesis of type I collagen by disrupting hydrogen-bonded water bridges between the helices. *Biochemistry* **37,** 11888–11895 (1998).

129. Borja-Cacho, D. & Matthews, J. NIH Public Access. *Nano* **6,** 2166–2171 (2008).

130. Vrana, N. E. *et al.* Engineering Functional Epithelium for Regenerative Medicine and *In Vitro* Organ Models: A Review. *Tissue Eng. Part B Rev.* **19,** 529–543 (2013).

131. Farquhar, M. G. & Palade, G. E. Junctional complexes in various epithelia. *J. Cell Biol.* **17,** 375–412 (1963).

132. Zahraoui, A. Les jonctions serrées. *Médecine Sci.* **20,** 580–585 (2004).

133. Shah, P., Jogani, V., Bagchi, T. & Misra, A. Role of Caco-2 cell monolayers in prediction of intestinal drug absorption. *Biotechnol. Prog.* **22,** 186–198 (2006).

134. Sarmento, B. *et al.* Cell-based *in vitro* models for predicting drug permeability. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **8,** 607–621 (2012).

135. Yu, L. C.-H. Host-microbial interactions and regulation of intestinal epithelial barrier function: From physiology to pathology. *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* **3,** 27 (2012).

136. Bernet, M. F., Brassart, D., Neeser, J. R. & Servin, A. L. Lactobacillus acidophilus LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut* **35,** 483–489 (1994).

137. Yin, Y. & Zhou, D. Organoid and Enteroid Modeling of Salmonella Infection. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **8,** (2018).

138. Fogh, J., Fogh, J. M. & Orfeo, T. One Hundred and Twenty-Seven Cultured Human Tumor Cell Lines Producing Tumors in Nude Mice23. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **59,** 221–226 (1977).

139. Chantret, I., Barbat, A., Dussaulx, E., Brattain, M. G. & Zweibaum, A. Epithelial Polarity , Villin Expression , and Enterocytic Differentiation of Cultured Human Colon Carcinoma Cells : A Survey of Twenty Cell Lines Epithelial Polarity , Villin Expression , and Enterocytic Differentiation of Cultured Human Colon Carcinoma C. *Cancer Res.* **48,** 1936–1942 (1988).

140. Matsumoto, H. *et al.* Biosynthesis of alkaline phosphatase during differentiation of the human colon cancer cell line Caco-2. *Gastroenterology* **98,** 1199–1207 (1990).

141. Salter, K. D., Roman, R. M., Larusso, N. R., Fitz, J. G. & Doctor, R. B. Modified culture conditions enhance expression of differentiated phenotypic properties of normal rat cholangiocytes. *Lab. Investig.* **80,** 1775–1778 (2000).

142. Meyer, K. *et al.* A Predictive 3D Multi-Scale Model of Biliary Fluid Dynamics in the Liver Lobule. *Cell Syst.* **4,** 277–290.e9 (2017).

143. Lin, J. *et al.* Giant Cellular Vacuoles Induced by Rare Earth Oxide Nanoparticles are Abnormally Enlarged Endo/Lysosomes and Promote mTOR-Dependent TFEB Nucleus Translocation. *Small* **12,** 5759–5768 (2016).

144. Trepat, X., Zaozao, C. & Jacobson, K. Cell Migration. *Compr. Physiol.* **2,** 2369–2392 (2012).

145. Labrousse, A. M. *et al.* Cell Migration Integrating Signals from front to back. **302,** 1704–1710 (2003).

146. Andrew D. Doyle, Ryan J. Petrie, Matthew L. Kutys, and K. M. Y. NIH Public Access. *Curr. Opin. Cell Biol.* **25,** 642–649 (2013).

147. Duval, K. *et al.* Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology* **32,** 266–277 (2017).

148. Wu, P.-H., Gilkes, D. M. & Wirtz, D. The Biophysics of 3D Cell Migration. *Annu. Rev. Biophys.* **47,** 549–567 (2018).

149. Lange, J. R. & Fabry, B. Cell and tissue mechanics in cell migration. *Exp. Cell Res.* **319,** 2418–2423 (2013).

150. Wolf, K. *et al.* Physical limits of cell migration: Control by ECM space and nuclear deformation and tuning by proteolysis and traction force. *J. Cell Biol.* **201,** 1069–1084 (2013).

151. Burgess, B. T., Myles, J. L. & Dickinson, R. B. Quantitative analysis of adhesion-mediated cell migration in three-dimensional gels of RGD-grafted collagen. *Ann. Biomed. Eng.* **28,** 110–118

(2000).

152. Riching, K. M. *et al.* 3D collagen alignment limits protrusions to enhance breast cancer cell persistence. *Biophys. J.* **107,** 2546–2558 (2015).

153. Raab, M. *et al.* ESCRT III repairs nuclear envelope ruptures during cell migration to limit DNA damage and cell death. *Science (80-.).* **352,** 359–362 (2016).

154. Nelson, W. J. NIH Public Access. **422,** 766–774 (2012).