

# Développement d'un microdigesteur pour le suivi de la digestion gastro-intestinale de gouttes d'huile isolées

Mélanie Marquis<sup>1</sup>, Gaëlle Rivière<sup>1</sup>, Hugo Algaba<sup>1</sup>, Sébastien Marze<sup>1</sup>

**Résumé.** La bonne assimilation des nutriments et micronutriments lipophiles (notamment vitamines) est capitale pour prévenir les maladies chroniques chez l'homme, en particulier cardiovasculaires. Toutefois, la digestion des lipides met en jeu de nombreux phénomènes qui sont difficilement quantifiables *in vivo* en condition d'alimentation normale. Les méthodes *in vitro* dynamiques (en flux continu) sont également trop complexes pour appréhender les mécanismes individuels. Afin de caractériser ces derniers au cours de la digestion de nutriments lipophiles (triglycérides) et de micronutriments lipophiles (vitamines liposolubles), nous avons développé une méthode microfluidique. Cela nous a permis de suivre en temps réel la diminution du volume de gouttes pour des huiles de différentes sources dans des conditions de digestion gastro-intestinale en flux continu.

**Mots clés :** digestion *in vitro*, microfluidique, émulsion, caractéristiques structurales

## Introduction

La maîtrise de plusieurs facteurs indispensables pour l'étude *in vitro* des lipides est offerte par les outils microfluidiques. La microfluidique est la science de la manipulation des fluides à l'échelle micrométrique. La microfluidique à gouttes a pour avantages de maîtriser (i) l'obtention d'une population de gouttes monodisperses, (ii) des débits et profils de vitesse, (iii) des temps de résidence dans le système et (iv) des mélanges. Elle permet également de réduire les quantités à l'échelle du microlitre abaissant ainsi considérablement les coûts d'expérimentation. D'autre part, les méthodes de microconstructions existantes sont extrêmement flexibles et peu coûteuses. Ces microsystèmes présentent ainsi une bonne modularité.

Dans ce contexte, la première étape du projet a été de développer un microdigesteur dynamique à gouttes permettant de mimer les flux de sucs digestifs dans différents environnements physico-chimiques représentatifs de ceux rencontrés dans la bouche, l'estomac et l'intestin grêle.

Ensuite l'utilisation du microsystème a permis d'explorer le rôle de nombreux paramètres (tels que la taille des gouttes, le type d'huile, le type d'émulsifiant à l'interface) sur la digestion de gouttes *in vitro*.

A terme, cet outil pourrait devenir un moyen de criblage de systèmes d'intérêt nutritionnel.

## Matériel et méthodes

### Conception du circuit microfluidique

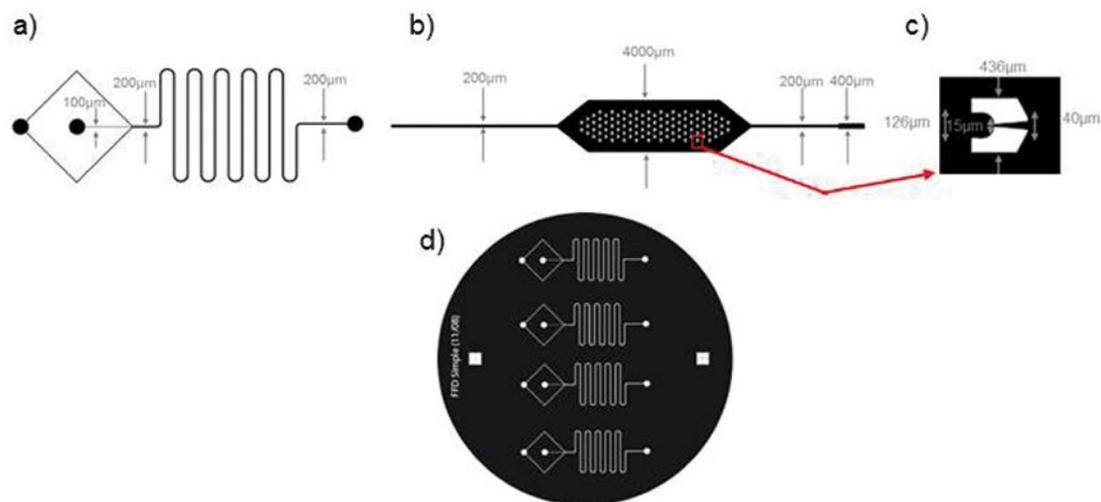
Le microdigesteur que nous avons imaginé est constitué de deux modules. Un premier pour la génération de gouttes d'huile monodisperses (toutes de la même taille), et un second pour le piégeage individuel de ces gouttes afin d'étudier leur digestion en flux continu. Ces deux modules sont reliés entre eux par un tuyau en plastique. La particularité de ce microsystème réside dans le fait que les surfaces internes doivent être hydrophiles afin d'obtenir des gouttes d'huile et non des gouttes d'eau. Pour cela, les canaux ont préalablement subi un traitement adéquat.

1. INRA, UR 1268 BIA, Biopolymères Interactions et assemblages, F-44316 Nantes Cedex 3, France ; [Melanie.Marquis@nantes.inra.fr](mailto:Melanie.Marquis@nantes.inra.fr)

Concernant le premier module, la littérature a exploré plusieurs géométries pour la génération de gouttes de l'ordre de 100  $\mu\text{m}$ . Nous avons choisi la géométrie contenant une jonction avec focalisation des flux ou FFD (flow focusing device) (Zhang et al., 2006). Dans cette géométrie, deux canaux d'un fluide porteur, appelé phase continue, qui est dans notre cas une solution aqueuse, convergent vers un canal central contenant une huile appelée phase dispersée. La phase continue vient confiner la phase dispersée pour former des gouttes d'huile dans l'eau. En jouant sur les débits de chaque phase, il est possible de contrôler la taille des gouttes. Ainsi, plus le débit de la phase continue ( $Q_c$ ) est grand et le débit de la phase dispersée petit ( $Q_d$ ), plus les gouttes obtenues seront petites.

Pour le second module, afin de mimer au mieux les différentes étapes de la digestion sur des gouttes isolées, nous avons dessiné une chambre comprenant des pièges micrométriques (plots). La goutte va être dirigée vers un plot grâce à une fente d'aspiration au milieu de ce dernier. Une fois le plot rempli, la goutte va bloquer l'aspiration et les autres gouttes seront repoussées (Huebner et al., 2009).

Dans notre cas, les dessins de circuits sont créés à partir du logiciel Adobe Illustrator et sont imprimés, sur un transparent, en haute résolution (3600 dpi) afin de conserver les dimensions micrométriques. Les masques qui en résultent sont utilisés pour la construction de moules (Figure 1).



**Figure 1.** Dessins des différentes parties composant le microdigesteur, réalisés à l'aide du logiciel Adobe Illustrator. **a)** Module 1 : générateur de gouttes par une jonction Flow Focusing (FFD). **b)** Chambre de digestion avec des plots pour piéger les gouttes. **c)** Grossissement d'un plot constitué de deux parties laissant une fente d'aspiration. **d)** Motifs imprimés en négatif et en haute résolution (3600 dpi) pour l'obtention des masques qui serviront à la construction des moules par photolithographie.

## Fabrication des circuits

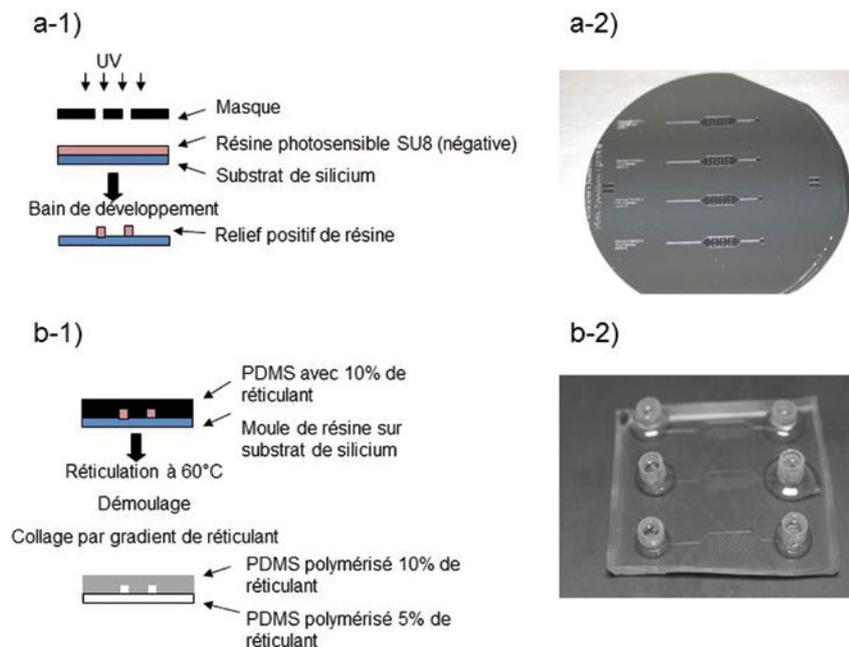
### Construction des micromoules par photolithographie

Cinq à dix millilitres d'une résine SU8 sensible aux ultra-violets (UV) (CTS, France) sont étalés au centre d'une galette de silicium de 10 cm de diamètre (Silicon Materials, Allemagne) à l'aide d'une tournette, ou spin coater (SPS-Europe, Pays-Bas), avec une accélération de 500 tr/min sur une durée de 30 s. L'ensemble subit une première étape de deux phases sur plaques chauffantes afin d'évaporer le solvant contenu dans la résine (5 min à 65°C puis 20 min à 95°C). Le masque, où sont représentés les motifs, est ensuite placé entre une source UV à 365 nm (UV-KUB 2, Kloé, France) et la résine. L'insolation dure 40 s à une puissance de 25 mW/m<sup>2</sup>. Une seconde étape de deux phases de chauffage est réalisée

afin d'assurer une bonne adhésion de la résine réticulée sur le substrat silicium (5 min à 65°C puis 10 min à 95°C). La partie de la résine exposée aux UV est devenue alors insoluble au solvant de développement qui est du propylène glycol méthyl éther acétate, PGMEA (Sigma-Aldrich, France) (**Figure 2a-1**). Après plusieurs étapes de lavage au PGMEA et à l'isopropanol (Sigma-Aldrich, France), les motifs apparaissent en relief. Le moule est séché sous un flux d'air avant d'être utilisé pour l'étape de lithographie molle (**Figure 2a-2**). Cette étape nécessite de travailler en environnement propre limitant le dépôt de poussière dans la résine non réticulée (Tabeling, 2003).

### Construction des circuits par lithographie molle

Cette étape se réalise sous hotte à flux laminaire pour éviter la présence de poussière dans les microcanaux. Du polydiméthylsiloxane, PDMS, est mélangé avec 10 % de réticulant (PDMS RTV615, Eleco Produits, France). Ce mélange est coulé sur le moule préalablement placé dans une boîte de Petri. En parallèle, un mélange de PDMS avec 5 % de réticulant est étalé, avec une épaisseur de 5 mm, au fond d'une boîte de Petri. Après une étape de dégazage pour éliminer les bulles dues au mélange, une première étape de réticulation à 70°C pendant 20-25 min est réalisée. Les microcircuits sont ensuite démoulés. Les entrées et les sorties sont poinçonnées de sorte à positionner les futures connectiques. Les microcircuits subissent un dernier nettoyage avec du papier adhésif afin d'éliminer le maximum de petits résidus et les poussières avant d'être délicatement positionnés sur la fine couche de PDMS contenant 5 % de réticulant. L'ensemble est placé à nouveau à 70°C pendant au moins une heure afin d'initier le collage par gradient de réticulant (**Figure 2 b-1**). Puis des renforts, en PDMS contenant 5 % de réticulant, sont réalisés au niveau des entrées et des sorties à l'aide d'un assemblage composé d'emporte-pièces adaptés en plastique et d'un tube en inox (Coop 23G/15 mm, Phymep, France) placé dans les trous préalablement poinçonnés. Les circuits finalisés sont placés au moins une nuit à 70°C pour terminer la réticulation (**Figure 2b-2**) (Xia et Whitesides, 1998).



**Figure 2.** Etapes de microconstruction.

**a-1)** Schéma du principe de l'étape de fabrication d'un moule en résine photosensible par photolithographie.

**a-2)** Photo d'un moule avec les motifs de résine en relief sur un substrat silicium.

**b-1)** Schéma du principe de fabrication d'un microcircuit par lithographie molle avec du polydiméthylsiloxane (PDMS).

**b-2)** Photo de circuits fermés et avec renforts au niveau des connectiques ; (photos : BIA Nano- ISD).



### Traitement hydrophile

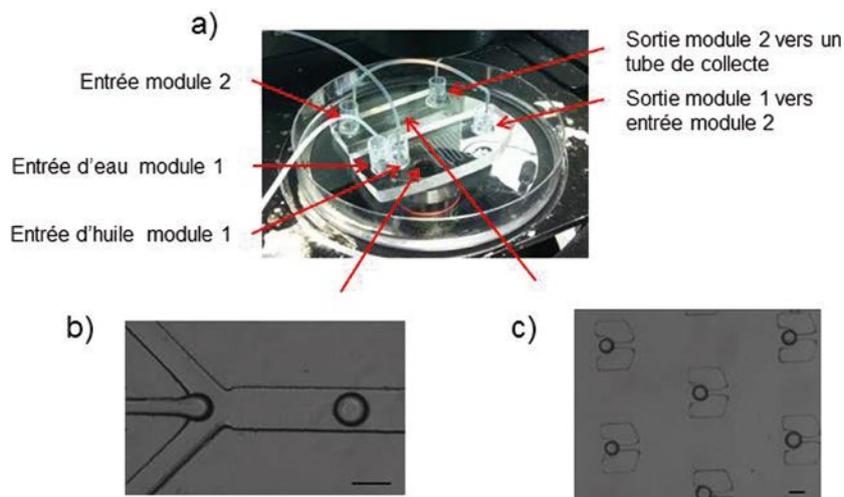
Comme expliqué précédemment, pour générer des gouttes d'huile dans l'eau, les canaux doivent être hydrophiles, lié au fait que la phase continue soit de l'eau. Initialement le PDMS est un composé hydrophobe. Un traitement adapté des canaux est nécessaire pour les rendre hydrophiles.

Pour ce faire, nous avons choisi d'utiliser la méthode de dépôt d'acide acrylique réticulé en acrylate sur la surface des canaux (Schneider et al., 2010). Pour cela une solution de benzophénone (Sigma-Aldrich, France) à 10 % dans l'acétone est injectée dans les canaux à l'aide de seringues en verre (2 mL, Hamilton, Suisse) et de tuyaux en polytétrafluoroéthylène, PTFE (11919445, Fisher Scientific, France) à un débit de 200  $\mu\text{L}/\text{min}$  pendant 10 min. La benzophénone diffuse dans le PDMS car ce dernier est perméable à l'acétone. La solution d'acétone résiduelle dans les canaux est éliminée par évaporation sous flux d'azote gazeux et par un passage sous vide de 10 min minimum. Ensuite l'acide acrylique issu d'une bouteille fraîchement ouverte (Sigma-Aldrich, France) est préparé à 20 % dans de l'eau Millipore (eau ultra pure). La solution est injectée avec un débit de 200  $\mu\text{L}/\text{min}$  pendant 2 min. Le circuit rempli est ensuite exposé aux UV à 365 nm pendant 5 min à 25  $\text{mW}/\text{m}^2$ . L'insolation génère des radicaux libres et a pour but de polymériser l'acide acrylique au contact de la benzophénone. Ensuite l'acide acrylique non réticulé est éliminé par lavage à l'éthanol à 95 %, injecté à 200  $\mu\text{L}/\text{min}$  dans les canaux pendant 45 min. Il en résulte une fine couche hydrophile de PAA (polyacrylic acid) à la surface des canaux. Les canaux sont ensuite rincés avec un flux d'eau à pH 11 pendant 45 min à 200  $\mu\text{L}/\text{min}$  et sont conservés à 4°C.

## Mise en fonctionnement du microdigesteur

### Génération de gouttes d'huile et remplissage de la chambre de digestion

Les entrées et les sorties des deux modules sont connectées vers l'extérieur par des tubes inox reliés à un tuyau PTFE. Les liquides sont injectés dans le module 1 à l'aide de seringues en plastique (Terumo, Belgique) montées sur des pousse-seringues PHD 2000 (Harvard Apparatus, France) (**Figure 3-a**). L'ensemble est placé sur un microscope inversé IX51 (Olympus, France) équipé d'une caméra C4742-95 (Hamamatsu, France) et d'un objectif au grossissement x4 (Olympus, France). La caméra est pilotée par un logiciel développé par notre Unité. Cela permet d'observer et de contrôler d'une part, la génération de gouttes d'huile de diamètre voulu au niveau de la jonction du module 1 (**Figure 3-b**) et d'autre part, le piégeage des gouttes dans les plots du module 2 (**Figure 3-c**). Les deux modules du microdigesteur sont connectés entre eux par un tuyau PTFE dès lors que la taille des gouttes visée est stable à la sortie du module 1. La chambre de digestion se remplit donc avec les gouttes de taille contrôlée générées dans le module 1.



**Figure 3.** Microdigesteur en fonctionnement.

- a)** Les deux modules sont placés sur un microscope inversé. Les solutions sont injectées par des seringues en verre montées sur des pousse-seringues. Les connectiques sont réalisées par des tuyaux PTFE et tubes inox (les deux modules sont connectés entre eux par un tuyau PTFE).
- b)** Génération de gouttes d'huile dans l'eau au niveau de la jonction Flow Focusing Device (FFD), l'échelle est de 130  $\mu\text{m}$ .
- c)** Gouttes d'huile de 130  $\mu\text{m}$  piégées dans les plots de la chambre de digestion, l'échelle est de 200  $\mu\text{m}$  ; (photos : BIA Nano-ISD).

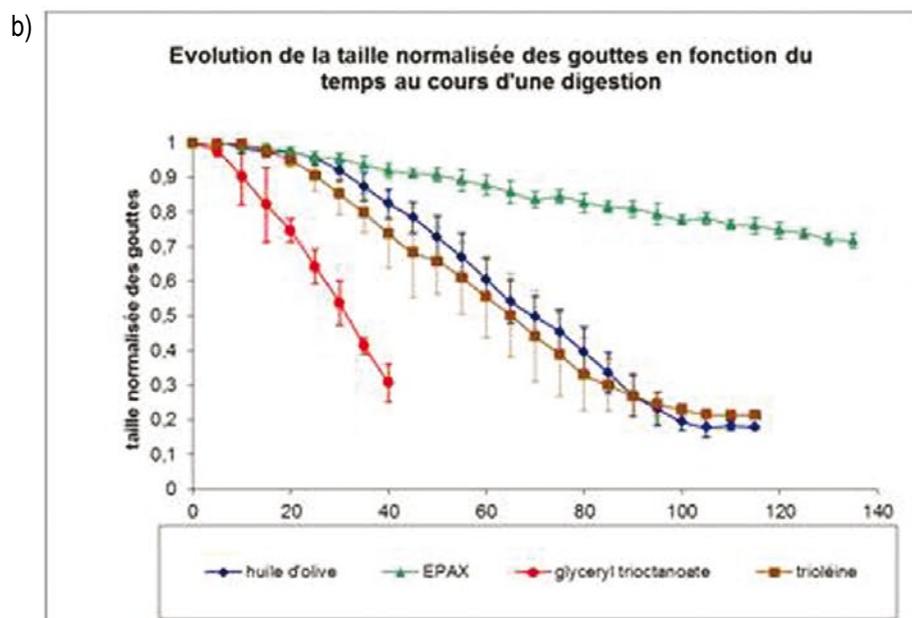
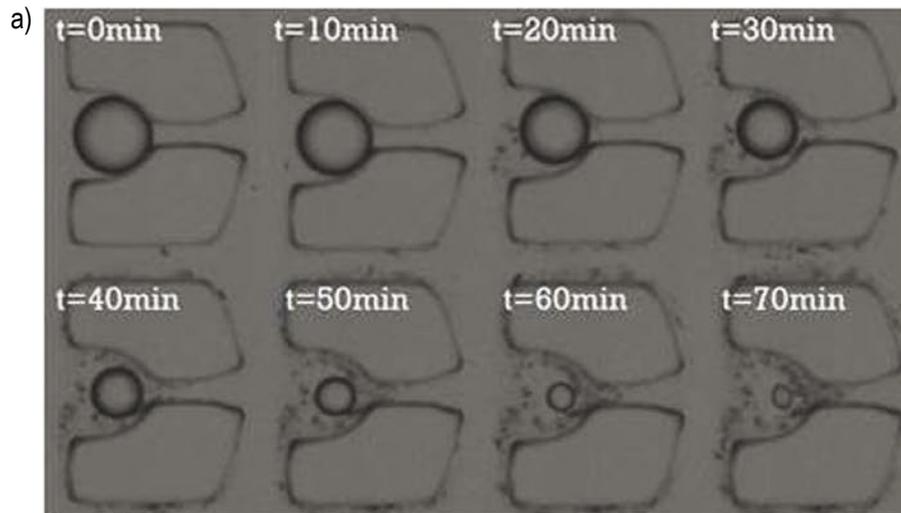
## Digestions

Une fois les plots de la chambre remplis, le module 1 est déconnecté du module 2. L'entrée de la chambre de digestion est ensuite directement connectée à une seringue contenant un fluide digestif injecté à un débit de 50  $\mu\text{L}/\text{min}$  à partir d'un pousse-seringue. Afin de se rapprocher des conditions réelles de digestion, il est nécessaire de placer la chambre du microdigesteur à une température de 37°C. Pour cela, elle est installée sur une platine chauffante adaptée au microscope.

Lorsque le fluide circule dans le module 2, la digestion débute et l'observation de la diminution de la taille des gouttes en fonction du temps (**Figure 4a**) peut être évaluée par mesure du diamètre par analyse d'image.

Nous avons appliqué cette méthode sur quatre huiles différentes : l'huile d'olive (O1514, Sigma-Aldrich, France), la trioléine (T7140, Sigma-Aldrich, France), le glyceryl trioctanoate (T9126, Sigma-Aldrich, France) et l'huile de poisson (EPAX 1050 TG, Polaris, France) (**Figure 4b**). Le fluide digestif injecté est composé de lipase porcine (L3126, lipase de pancréas de porc type II, Sigma-Aldrich, France) et d'un sel biliaire (sodium glycodeoxycholate, G9910, Sigma-Aldrich, France) à pH 7,5.





**Figure 4.** Digestion de gouttes d'huile dans le microdigesteur contenant de la lipase porcine et du sodium glycodeoxycholate à un pH 7,5. **a)** Observation de la diminution de la taille d'une goutte d'huile d'olive piégée. **b)** Graphique montrant l'évolution de la taille des gouttelettes en fonction du temps. Huiles étudiées : huile d'olive, huile de poisson EPAX 1050, glyceryl trioctanoate, trioléine ; (photo :BIA Nano-ISD).

Les premiers résultats nous ont permis de voir que l'huile d'olive, riche en trioléine, a un comportement proche de la trioléine pure. Par contre, les deux autres huiles ne se digèrent pas du tout à la même vitesse. Nous avons constaté que les gouttes d'huile de poisson ont encore 70 % de leur taille initiale après plus de 120 min de digestion, alors que les trois autres huiles ont des tailles de gouttes qui tendent à se stabiliser (entre 20 et 35 % de leurs tailles initiales) à des temps plus courts. Ces différences peuvent s'expliquer par la longueur des différentes chaînes carbonées constituant les lipides. En effet, plus la chaîne est longue et plus la digestion durera. L'huile de poisson est principalement constituée de chaînes avec plus de 20 atomes de carbone tandis que les deux autres huiles possèdent des chaînes de moins de 20 atomes de carbone (18 pour l'huile d'olive et la trioléine et 8 pour le glyceryl

trioctanoate). Cette différence de rapidité de digestion est due à deux facteurs déjà démontrés dans la littérature : la lipase pancréatique hydrolyse généralement plus rapidement les chaînes les plus courtes et ces mêmes chaînes sont solubilisées en plus grande quantité par les sels biliaires sous forme de monoglycéride et d'acide gras.

Enfin, notre méthode a permis de mettre en évidence un résultat jusqu'ici non observé (Marze et al., 2014). En comparant nos résultats, qui peuvent être exprimés en volume, avec des données obtenues par une méthode *in vitro* réalisée sur émulsions en tube (Marze et al., 2012), nous avons en effet constaté que les gouttes générées en microfluidique sont digérées bien plus rapidement que les gouttes d'émulsion en tube. La différence s'explique par le fait que nos résultats sont obtenus en flux continu et non en statique. Ainsi, en microfluidique, le fluide digestif est renouvelé tout au long de la digestion comme cela se passe *in vivo*. De plus, les gouttes étant isolées, aucune floculation ou coalescence ne peut retarder la digestion.

## Conclusion et perspectives

Le microdigesteur que nous avons mis au point permet d'étudier des gouttes de triglycérides dans des conditions plus proches de ce qui se passe *in vivo*. Les caractéristiques structurales des gouttelettes peuvent être évaluées au cours de la digestion gastro-intestinale en flux continu. Ce système modèle nous a permis de réaliser des tests préliminaires sur la bioaccessibilité de micronutriments lipophiles (vitamines) contenus dans les gouttelettes d'huiles précédemment étudiées via le couplage du montage microfluidique à un microscope confocal inversé. Par ailleurs, notre microdigesteur pourrait tout à fait s'appliquer à l'étude de gouttes aqueuses contenant des protéines ou des polysaccharides, à la fois pour étudier la dégradation et la réticulation de ces biomolécules par des enzymes appropriées.

## Références bibliographiques

- Huebner A, Bratton D, Whyte G, Yang M, de Mello AJ, Abell C, Hollfelder F (2009) Static microdroplets arrays : A microfluidic device for droplet trapping, incubation and release for enzymatic and cell-based assays, *Lab on a Chip* **9** : 692-698. DOI: 10.1039/B813709A dernière consultation le 05-01-2015.
- Marze S, Algaba H, Marquis M (2014) A microfluidic device to study the digestion of trapped lipid droplets. *Food & Function* **5** : 1481-1488. DOI: 10.1039/c4fo00010b dernière consultation le 05-01-2015.
- Marze S, Choimet M (2012) In vitro digestion of emulsions: mechanistic and experimental models. *Soft Matter* **8** : 10982-10993. DOI: 10.1039/c2sm26336j dernière consultation le 05-01-2015.
- Schneider MH, Willaime H, Tran Y, Rezgui F, Tabeling P (2010) Wettability patterning by UV-initiated graft polymerization of poly(acrylic acid) in closed microfluidic systems of complex geometry. *Anal Chem* **82** : 8848-8855. DOI: 10.1021/ac101345m dernière consultation le 05-01-2015.
- Tabeling P (2003) *Introduction à la microfluidique*. Edition Belin, Paris.
- Xia YN, Whitesides GM (1998) Soft lithography. *Ann Rev Materials Sci* **28** : 153-184. DOI: 10.1002/(SICI)1521-3773(19980316)37:5<550::AID-ANIE550>3.0.CO;2-G dernière consultation le 05-01-2015.
- Zhang H, Tumarkin E, Peerani R, Nie Z, Sullan RMA, Walker GC, Kumacheva E (2006) Microfluidic production of biopolymer microcapsules with controlled morphology. *J Amer Chem Soc*, **128** : 12205-12210. DOI: 10.1021/ja0635682 dernière consultation le 05-01-2015.

