



**HAL**  
open science

# Développement d'une méthode microfluidique pour la préparation de microparticules mimes de globules rouges avec une taille et des propriétés mécaniques contrôlables

Cheng Zhang

## ► To cite this version:

Cheng Zhang. Développement d'une méthode microfluidique pour la préparation de microparticules mimes de globules rouges avec une taille et des propriétés mécaniques contrôlables. Science des matériaux [cond-mat.mtrl-sci]. Université d'Aix-Marseille, 2020. Français. NNT : . tel-02474896

**HAL Id: tel-02474896**

**<https://theses.hal.science/tel-02474896>**

Submitted on 11 Feb 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.



UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE

ECOLE DOCTORALE 352

UFR SCIENCE

CINaM/UMR 7325

Thèse présentée pour obtenir le Grade Universitaire de Docteur

Discipline : Physique et science de la matière

Cheng ZHANG

Développement d'une méthode microfluidique pour la  
préparation de microparticules mimes de globules rouges avec  
une taille et des propriétés mécaniques contrôlables

Soutenue le 06/02/2020 devant le jury :

DUBAS Stephan	PPC Chulalongkorn University	Rapporteur
ELAISSARI Abdelhamid	Université Lyon 1	Rapporteur
DEPLANO Valérie	Aix-Marseille Université	Présidente
ILDEFONSO Manuel	Université de Pau et des Pays de l'Adour	Examineur
VEESLER Stéphane	CINaM-CNRS	Directeur de thèse
CANDONI Nadine	Aix-Marseille Université	Directrice de thèse
GROSSIER Romain	CINaM-CNRS	Invité



# Résumé

Ce travail de thèse fait partie d'un projet ANR appelé **CUMBA** (Cellular Ultrasonic imaging Modality to assess red Blood cell Aggregation *in vivo*) qui vise à prédire l'agrégation de globules rouges (GRs). En effet, l'hyperagrégation de GRs est un trouble hémorhéologique qui cause des dysfonctions microvasculaires et des thromboses veineuses. De plus, l'hyperagrégation de GRs est liée à l'augmentation de macromolécules plasmatiques inflammatoires, comme lors d'une transplantation d'organe. Ainsi, le but du projet **CUMBA** est de surveiller *in situ* l'agrégation de GRs grâce à une modalité d'imagerie ultrasonore mise au point pour du diagnostic précoce de l'hyperagrégation. Dans ce contexte, des microparticules mimes de GRs sont indispensables pour la calibration et les premiers tests sur un modèle. Pour cela, les microparticules doivent être contrôlées en taille et en propriétés mécaniques. De plus, l'utilisation de tensioactifs est à éviter pour l'application dans le dispositif d'imagerie ultrasonore.

Cette thèse porte sur une méthode microfluidique à base de gouttes et sans ajout de tensioactifs pour préparer les microparticules mimes de GRs. Les microparticules sont obtenues par gélification ionique d'un polymère naturel, l'alginate de sodium (Na-alginate), avec du chlorure de calcium pour former un gel d'alginate de calcium (Ca-alginate). La gélification est étudiée *in situ* dans le système microfluidique ou *ex situ* après la collecte de microparticules de Na-alginate. La taille, la structure et la teneur en alginate des microparticules de Na- et Ca-alginate formées sont étudiées en fonction des paramètres opératoires du montage microfluidique. La méthode microfluidique développée tout au long de cette thèse permet de contrôler la taille et les propriétés mécaniques des microparticules de Ca-alginate tout en évitant leur coalescence, malgré l'absence de tensioactifs. Ainsi, des microparticules de Ca-alginate monodisperses et présentant un module de Young proche des GRs sont obtenues et la faisabilité de leur utilisation pour des mesures ultrasonores est également montrée. Par ailleurs, des méthodes alternatives explorées en parallèle sont présentées à la fin de la thèse.

Mots-clés : microfluidique, microparticule, globule rouge

# Abstract

This work is included in an ANR project named **CUMBA** (Cellular Ultrasonic imaging Modality to assess red Blood cell Aggregation *in vivo*) whose purpose is to predict the aggregation of red blood cells ("RBCs"). The hyperaggregation of RBCs is a hemorheological disorder which leads to microvascular dysfunctions and venous thromboses. Moreover, RBCs may also aggregate during the organ transplantation due to the increase of inflammatory plasmatic macromolecules. The aim of the project **CUMBA** is to develop an ultrasonic imaging modality permitting *in situ* monitoring of RBC aggregation for early diagnosis of hyperaggregation. In this context, RBC-like microparticles are essential for both calibration and preliminary tests on the model. To do this, microparticles must be controlled in size and mechanical properties. In addition, the use of surfactants should be avoided for application in the ultrasound imaging device.

This thesis focuses on a droplet-based microfluidic method without the addition of surfactants to prepare RBC-like microparticles. The microparticles are obtained by ionic gelation of a natural polymer, sodium alginate (Na-alginate), with calcium chloride to form a gel of calcium alginate (Ca-alginate). Gelation is studied *in situ* in the microfluidic system or *ex situ* after the collection of Na-alginate microparticles. The size, the structure and the alginate concentration of the final microparticles are studied according to the operating parameters of the microfluidic system. The microfluidic method developed throughout this thesis allows to control the size and mechanical properties of Ca-alginate microparticles while avoiding their coalescence, despite the absence of surfactants. Thus, monodispersed Ca-alginate microparticles with a Young's modulus close to that of RBCs are obtained and the feasibility of their use for ultrasonic measurements is also shown. In addition, alternative methods explored in parallel are presented at the end of the thesis.

Key words: microfluidics, microparticle, red blood cell

# Table des matières

Résumé.....	1
Abstract .....	2
Liste des abréviations et des symboles .....	6
Introduction.....	8
A. Bibliographie .....	11
Chapitre I. Techniques existantes de préparation de mimes de globules rouges .....	12
I.1. Technique d'émulsification .....	12
I.2. Techniques « digitales » .....	14
I.2.1. Technique utilisant un masque .....	14
I.2.2. Technique utilisant un moule.....	14
I.2.3. Technique « couche par couche ».....	15
Chapitre II. Technique de microfluidique à base de gouttes .....	17
II.1. Structure du dispositif microfluidique .....	17
II.1.1. Les puces microfluidiques .....	17
II.1.2. Les montages microfluidiques avec des capillaires et des jonctions.....	18
II.1.3. Géométrie des canaux.....	19
II.1.3.1. La géométrie « cross-flow » .....	20
II.1.3.2. La géométrie « co-flow ».....	20
II.1.3.3. La géométrie « flow-focusing ».....	20
II.2. Génération des gouttes.....	21
II.2.1. Caractérisation des flux et des microgouttes.....	21
II.2.1.1. Le nombre de Reynolds.....	21
II.2.1.2. La longueur capillaire .....	21
II.2.1.3. Le nombre capillaire .....	22
II.2.2. Régimes de génération des gouttes.....	22
II.2.2.1. Régime « squeezing ».....	23
II.2.2.2. Régime « dripping » .....	23
II.2.2.3. Régime « jetting » .....	23
Chapitre III. Choix de l'hydrogel .....	24
III.1. Définition .....	24
III.2. Composition des hydrogels .....	25
III.3. Processus de gélification .....	25
III.3.1. Réticulation chimique .....	26
III.3.2. Réticulation physique.....	27
III.3.2.1. Par le changement de température - liaisons hydrogène .....	27
III.3.2.2. Par la présence d'ions – réticulation ionique.....	27
III.4. Propriétés des hydrogels.....	28
III.5. Hydrogel d'alginate .....	30
III.5.1. Description .....	30
III.5.2. Applications de l'alginate .....	31
III.5.3. Structure de l'alginate .....	31
III.5.4. Propriétés de l'alginate .....	32
III.5.4.1. Propriétés physicochimiques .....	32
III.5.4.2. Gélification de l'alginate .....	32

Chapitre IV. Préparation de microparticules d'hydrogel d'alginate en microfluidique à base de gouttes.....	35
IV.1. Gélification ionique interne .....	35
IV.1.1. Forme active du cation $X^{2+}$ .....	35
IV.1.1.1. Mélange avant la génération des gouttes .....	35
IV.1.1.2. Mélange après la génération de gouttes .....	36
IV.1.2. Forme inactive du cation dans l'élément $X^{2+}Y^{2-}$ .....	38
IV.2. Gélification ionique externe .....	41
IV.2.1. Cation $X^{2+}$ introduit lors de la génération des gouttes .....	41
IV.2.1. Cation $X^{2+}$ introduit lors de la collecte des gouttes .....	42
IV.3. Intégration de la diffusion de solvant .....	43
IV.3.1. Diffusion dans l'acétate de méthyle .....	43
IV.3.2. Diffusion dans le carbonate de diméthyle .....	45
B. Matériels et Méthodes.....	46
Chapitre I. Matériels.....	47
I.1. Matériaux chimiques.....	47
I.1.1. Composés chimiques.....	47
I.1.1.1. Alginate de sodium.....	47
I.1.1.2. Chlorure de calcium .....	47
I.1.1.3. Agarose.....	48
I.1.2. Solvants organiques .....	48
I.2. Dispositifs microfluidique à base de gouttes .....	48
I.2.1. Génération de gouttes .....	49
I.2.1.1. Pousse-seringues et seringues .....	49
I.2.1.2. Capillaires et jonctions .....	50
I.2.2. Collection de gouttes .....	51
I.2.3. Observation .....	51
I.2.3.1. Microscopes optiques .....	51
I.2.3.2. Système de « piscine » .....	52
I.2.4. Système thermostaté .....	53
Chapitre II. Méthodes.....	54
II.1. Principe de la diffusion de solvant .....	55
II.2. Caractérisation des gouttes .....	55
II.2.1. Mesure de la taille.....	55
II.2.2. Mesure de l'énergie interfaciale .....	57
II.3. Caractérisation de microparticules .....	59
II.3.1. Forme .....	59
II.3.2. Propriétés mécaniques.....	60
II.3.2.1. Mesure qualitative par micro-pince.....	60
II.3.2.2. Mesure du module de Young par Microscopie à Force Atomique (AFM) ..	61
C. Résultats et Discussions .....	63
Chapitre I. Préparation de microparticules de Na-alginate .....	64
I.1. Génération des gouttes.....	64
I.2. Contraction <i>in situ</i> .....	67
I.2.1. Contraction <i>in situ</i> des gouttes dans des capillaires de différents diamètres ....	68
I.2.1.1. Dans les capillaires de 500 $\mu$ m de diamètre interne.....	68
I.2.1.2. Dans les capillaires de 150 $\mu$ m de diamètre interne.....	69

I.2.2. Rôle de <b>k</b> dans la contraction <i>in situ</i> des gouttes .....	69
I.2.3. Influence de <b>QTOT</b> sur la contraction <i>in situ</i> des gouttes .....	72
I.3. Collecte des gouttes et contraction <i>ex situ</i> .....	73
I.3.1. Préparation des microparticules de Na-alginate .....	73
I.3.2. Contrôle du diamètre final ( <b>df</b> ) des microparticules de Na-alginate .....	75
I.3.3. Contrôle de la concentration finale ( <b>Cf</b> ) des microparticules de Na-alginate ...	77
Chapitre II. Préparation de microparticules de Ca-alginate .....	80
II.1. Gélification <i>in situ</i> .....	80
II.1.1. Par injection du mélange de Na-alginate et de CaCl <sub>2</sub> dans une jonction en T ..	80
II.1.2. Par le mélange de Na-alginate et CaCl <sub>2</sub> dans une jonction en croix .....	81
II.1.3. Par le mélange de Na-alginate et CaCl <sub>2</sub> dans une jonction en croix puis ajout de DMC dans une jonction en T .....	83
II.2. Gélification <i>ex situ</i> .....	85
II.2.1. Ajout de CaCl <sub>2</sub> lors de la collection .....	85
II.2.1.1. Collection dans une solution aqueuse de CaCl <sub>2</sub> .....	85
II.2.1.2. Collection dans un mélange de DMC/CaCl <sub>2</sub> .....	88
II.2.2. Gélification des microparticules après leur collection et leur séchage .....	90
Chapitre III. Caractérisation des microparticules .....	93
III.1. Forme des microparticules .....	93
III.2. Structure interne des microparticules .....	96
III.2.1. Méthodes développées pour « couper » les microparticules .....	96
III.2.2. Observation des microparticules « coupées » de Na-alginate et de Ca-alginate .....	97
III.2.3. Mécanisme de la formation des pores à l'intérieur des microparticules .....	98
III.2.3.1. Migration des chaînes de polymères .....	98
III.2.3.2. Mobilité des chaînes polymères .....	100
III.3. Propriétés mécaniques .....	102
III.3.1. Mesure qualitative par micro-pince .....	102
III.3.1.1. Calibration .....	102
III.3.1.2. Mesures sur les microparticules .....	103
III.3.2. Mesure quantitative par la microscopie à force atomique (AFM) .....	105
Chapitre IV. Mesures ultrasonores .....	108
IV.1. Technique de diffusion ultrasonore .....	108
IV.2. Diffusion ultrasonore sur des microparticules .....	109
IV.2.1. Essais préliminaires sur des microparticules de polystyrène (PS) .....	110
IV.2.2. Mesure de la rétrodiffusion sur les microparticules de Ca-alginate .....	111
Chapitre V. Méthodes alternatives .....	113
V.1. Variation de la phase continue .....	113
V.1.1. Solvants organiques : octan-1-ol et carbonate de diéthyle .....	113
V.1.1.1. Contraction <i>in situ</i> lors de la génération des gouttes .....	113
V.1.1.2. Contraction <i>ex situ</i> lors de la collecte des microparticules .....	115
V.1.2. Mélange DMC/éthanol .....	116
V.1.2.1. Forme des microparticules collectées .....	117
V.1.2.2. Taille des microparticules collectées .....	120
V.2. Variation de l'hydrogel : l'agarose .....	122
V.2.1. Détermination du point de gélification de l'agarose .....	122
V.2.2. Préparation des microparticules d'agarose .....	123



V.2.2.1. Gélification de l'agarose dans le capillaire .....	124
V.2.2.2. Collecte et observation des microparticules d'agarose.....	124
D. Conclusion générale et Perspectives .....	126
Références.....	130
ANNEXES.....	137
Annexe 1. Production industrielle de l'alginate .....	138
Annexe 2. Matériaux pour la fabrication des dispositifs microfluidiques .....	140
Annexe 3. Découpage d'une résine encapsulant des microparticules .....	142
3.1. Encapsulation des microparticules dans la résine .....	142
3.2. Découpe de la résine avec une scie à fil.....	142
Annexe 4. « Hachage » des microparticules avec un rasoir.....	144
Annexe 5. Traitement des données AFM pour la mesure du module de Young.....	146
Annexe 6. Publication dans « Chemical Engineering Science » .....	148

## Liste des abréviations et des symboles

AAD	Dihydraside d'acide adipique
AFM	Microscopie à force atomique
ANR	Agence Nationale de la Recherche
CINaM	Centre Interdisciplinaire de Nanoscience de Marseille
COC	Copolymère cyclo-oléfine
CUMBA	Cellular Ultrasonic imaging Modality to assess red Blood cell Aggregation <i>in</i>
DEC	Carbonate de diéthyle
DMC	Carbonate de diméthyle
EDC	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
EDTA	Ethylènediaminetétraacétique
EGDMA	Diméthacrylate d'éthylène glycol
FEP	Éthylène propylène fluoré
GR	Globule rouge
IRPHE	Institut de Recherche sur les Phénomènes Hors Equilibre
LAI	Laboratoire Adhésion et Inflammation
LbL	Layer by Layer
LBUM	Laboratoire de Biorhéologie et d'Ultrasonographie Médicale
LMA	Laboratoire de Mécanique et d'Acoustique
MEB	Microscopie électronique à balayage
NaPSS	Poly(styrène sulfonate) de sodium
PEEK	Polyétheréthercétone
PEGDM	Poly(éthylène glycol) diméthacrylate
PDMS	Polydiméthylsiloxane
PFA	Perfluoroalkoxy
pHEMA	Poly(méthacrylate d'hydroxyéthyle)
PLGA	Acide poly(lactique-co-glycolique)
PMMA	Poly(méthacrylate de méthyle)
PS	Polystyrène
PTFE	Polytétrafluoroéthylène
THF	Tétrahydrofurane

$Ca$	Nombre capillaire
$C_i$	Concentration initiale
$C_f$	Concentration finale
$d$	Densité de réticulation
$d_i$	Diamètre initial
$d_f$	Diamètre final
$\bar{d}_f$	Moyenne du diamètre final
$D$ ou $ID$	Diamètre interne du capillaire
$D_{goutte}$	Diamètre équivalent d'une goutte sous forme du plug
$e$	Espacement entre les deux bras de la micro-pince
$E$	Module de Young
$F$	Force
$g$	Accélération gravitationnelle
$J_{AB}$	Flux massique de la matière des gouttes entre les points A et B
$k$	Rapport des débits ( $Q_{DMC}/Q_{alginate}$ )
$L_{AB}$	Longueur de capillaire entre A et B
$l_c$	Longueur capillaire
$L_d$	Distance inter-goutte
$L_{goutte}$	Longueur de la goutte sous forme du plug
$m$	Masse
$M_C$	Masse moléculaire entre deux agents de réticulation
$n$	Indice de réfraction
$OD$	Diamètre externe du capillaire
$Q$	Débit
$Q_{TOT}$	Débit totale
$Re$	Nombre de Reynolds
$S_A$	Surface de la goutte au point A
$S_B$	Surface de la goutte au point B
$S_{mov}$	Surface moyenne de la goutte du point A au point B
$T_{gel}$	Point de gélification
$TR$	Taux de réduction de la goutte
$v$	Vitesse
$V_d$	Volume inter-goutte
$V_p$	Tension d'entrée
$V_s$	Tension de signal
$\gamma$	Energie interfaciale
$\sigma_{bs}$	Section efficace différentielle
$\rho$	Densité
$\tau_{AB}$	Temps de séjour des gouttes entre A et B
$\tau_{mov}$	Temps moyen de séjour des gouttes
$\xi$	Taille de maillage dans le réseau

# Introduction

Lors de la circulation sanguine, on observe souvent l'agrégation des globules rouges (GRs), ce qui est normal et en général réversible. Cependant, le phénomène d'hyperagrégation des GRs est un trouble hémorhéologique qui cause des dysfonctions microvasculaires et des thromboses veineuses. De plus, l'hyperagrégation des GRs est liée à l'augmentation de macromolécules plasmatiques inflammatoires, représentant ainsi un indice global de l'inflammation (Ami et al. 2001). Par exemple, cette hyperagrégation peut se produire lors de la transplantation d'organes à partir de donneurs en mort cérébrale. En effet, la mort cérébrale est précédée d'une inflammation cérébrale et d'un syndrome de réponse inflammatoire systémique (SRIS). Par conséquent, les organes transplantés ont une réponse inflammatoire accrue. Et au bout d'un certain moment, ils ne sont plus transplantables. Il est donc important de connaître le niveau d'inflammation afin d'éviter le rejet de l'organe transplanté (Mokken et al. 1995) (Barklin et al. 2008).

Aujourd'hui, il n'existe pas d'outils de diagnostic permettant la surveillance *in situ* de l'agrégation des GRs pour déterminer si un organe est transplantable (faible degré d'inflammation) ou pas. Dans ce contexte, un projet de recherche nommé **CUMBA**, « Cellular Ultrasonic imaging Modality to assess red Blood cell Aggregation *in vivo* », a obtenu un financement par l'ANR (Agence Nationale de la Recherche). L'objectif final est de développer une modalité d'imagerie ultrasonore pour le diagnostic précoce de l'hyperagrégation de GRs. Quatre laboratoires sont impliqués :

- Le Laboratoire de Mécanique et d'Acoustique (LMA)
- L'Institut de Recherche sur les Phénomènes Hors Equilibre (IRPHE)
- Le Centre Interdisciplinaire de Nanoscience de Marseille (CINaM)
- Le Laboratoire de Biorhéologie et d'Ultrasonographie Médicale (LBUM) au Canada (hors financement ANR).

Parmi ces laboratoires partenaires, le LMA travaille sur la calibration de l'outil ultrasonore et l'IRPHE sur l'étude en écoulement de l'agrégation des GRs. Pour toutes ces mesures optiques et ultrasonores, des GRs de tailles, de formes et de propriétés mécaniques identiques sont indispensables. Cependant, ces propriétés varient d'un prélèvement à l'autre même chez un seul donneur de GRs. De plus, pour la mesure optique à l'IRPHE, dû à l'hémoglobine qui rend les GRs opaques à l'observation optique, il est impossible de caractériser des agrégats de GRs. Pour résoudre ce problème, il faut utiliser des GRs transparents en enlevant l'hémoglobine, ce qui demande des manipulations longues à réaliser. La mission du CINaM est alors de préparer des mimes de GRs transparents afin de fournir les trois autres laboratoires. Pour cela, il dispose d'un savoir-faire dans la génération de microgouttes de tailles et de formes identiques en « microfluidique à base de gouttes » pour y étudier des réactions notamment de cristallisation. L'objectif de ma thèse est d'utiliser ces outils microfluidiques pour la préparation de microparticules mimes de GRs transparents, avec la possibilité de contrôler leur taille et leurs propriétés mécaniques.

Dans la démarche de cette thèse, deux points sont à souligner : 1) Pour les applications en mesures optiques et ultrasonores, nous cherchons en particulier des méthodes qui permettent de produire en grande quantité des microparticules transparentes monodisperses avec une taille et des propriétés mécaniques proches des GRs. Par contre, le contenu des GRs (en hémoglobine) et leur forme (biconcave comme les GRs) ne sont pas pour l'instant une contrainte dans le projet. 2) Les tensioactifs, souvent utilisés en microfluidique pour former et/ou stabiliser les gouttes, sont interdits dans notre cas dû à leur adsorption aux interfaces, ce qui les rend inutilisables sur les techniques des deux laboratoires partenaires. De plus, les tensioactifs ont également un effet sur la forme des microparticules, ce qui rajoute un paramètre indésirable dans notre étude (Pittermannová et al. 2016).

Ce mémoire est organisé en quatre parties :

1) La partie A consiste en une étude bibliographique des méthodes de préparation des microparticules mimes de GRs, notamment en utilisant la microfluidique à base de gouttes qui est la technique principale de ma thèse. Les hydrogels utilisés dans la littérature sont également présentés, notamment celui d'alginate que j'ai choisi comme matériau de base pour mes travaux.

2) La partie B décrit les produits chimiques utilisés, les matériels du montage expérimental et les méthodes de caractérisation.

3) Dans la partie C, les résultats sur la préparation des microparticules et leur caractérisation sont explicités et discutés. Les premiers essais de faisabilité des mesures ultrasonores sur ces microparticules sont présentés. Et d'autres alternatives de préparation de microparticules sont également explorées.

4) La partie D comprend une conclusion générale et des perspectives.

## A. Bibliographie

L'étude bibliographique débute par la présentation des techniques publiées dans la littérature qui sont dédiées à la préparation de **microparticules mimes de GRs** (Chapitre I). On en déduit le choix de la **microfluidique à base de gouttes** pour préparer les microparticules mimes de GRs, qui est décrite dans le chapitre II. Puis, le chapitre III présente de manière générale les hydrogels, notamment celui d'**alginate** qui est le matériau que l'on a choisi pour mimer les GRs. Enfin, dans le Chapitre IV, l'étude bibliographique porte sur la préparation de microparticules **d'alginate en microfluidique à base de gouttes**.

## **Chapitre I. Techniques existantes de préparation de mimes de globules rouges**

Dans le cadre de ma thèse, j'ai travaillé sur la mise au point d'une méthode pour la préparation de mimes de globules rouges (GRs) avec pour contraintes la quantité de mimes à produire et l'interdiction d'utiliser des tensioactifs. Dans ce manuscrit ces mimes seront appelés « microparticules » car ce sont des objets de taille micrométrique qui peuvent présenter différentes formes. Pour l'application biomédicale visée par cette thèse, ces microparticules monodisperses doivent ressembler aux GRs en termes de **taille** et de **propriétés mécaniques**, tout en ayant une forme sphérique.

Les GRs (8-10 $\mu$ m de diamètre) possèdent des fonctionnalités sophistiquées, comme la flexibilité pour traverser des capillaires très fins (jusqu'à 5 $\mu$ m de diamètre) et la capacité de transporter de l'oxygène. En effet, tout est lié à leurs propriétés physiques (taille, forme, propriétés de surface et propriétés mécaniques) et à leur composition chimique (She et al. 2013). Dans la littérature, de nombreuses méthodes sont publiées pour fabriquer des mimes avec des propriétés plus ou moins identiques à celles des GRs, soit par émulsification, soit par des techniques dites « digitales ».

### **I.1. Technique d'émulsification**

L'émulsification est souvent utilisée pour fabriquer les mimes de GRs avec la capacité de transporter de l'oxygène afin de substituer les vrais GRs en cas d'urgence. Cette technique comprend deux étapes : 1) une phase aqueuse contenant des hémoglobines (Hbs) est d'abord émulsifiée par agitation dans une phase d'huile ; 2) puis l'ensemble est dispersé également par agitation dans une autre phase aqueuse, formant l'émulsion multiple (Hb/phase d'huile/phase aqueuse) (Zheng, Beissinger, and Wasan 1991). L'utilisation de tensioactifs comme la lécithine est indispensable afin de stabiliser les microparticules formées dans l'émulsion. De plus, la lécithine forme une bicouche en surface (Figure 1), qui ressemble à la couche de phospholipides qui entoure les GRs.

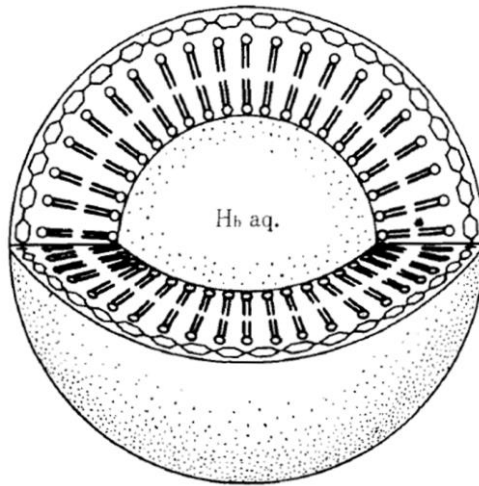


Figure 1. Schéma de mimes de GRs, dont la membrane est constituée de lécithine (tensioactif naturel), stabilisés par de la chitine (Kato, Arakawa, and Kondo 1984).

Cette technique permet de produire une grande quantité de mimes de GRs. Cependant, l'émulsification nécessite des tensioactifs pour stabiliser les microparticules. Par ailleurs, les mimes de GRs sont polydispersés (Figure 2), ce qui nécessite une étape supplémentaire de filtration (Muramatsu and Kondo 1980). Par conséquent, cela nécessite également l'utilisation de tensioactifs pour répondre à la coalescence des microparticules lors de la filtration. Comme on l'a vu dans l'introduction, pour l'application vers les mesures optiques et ultrasonores, les tensioactifs doivent absolument être évités car ils risquent de « polluer » les dispositifs utilisés.

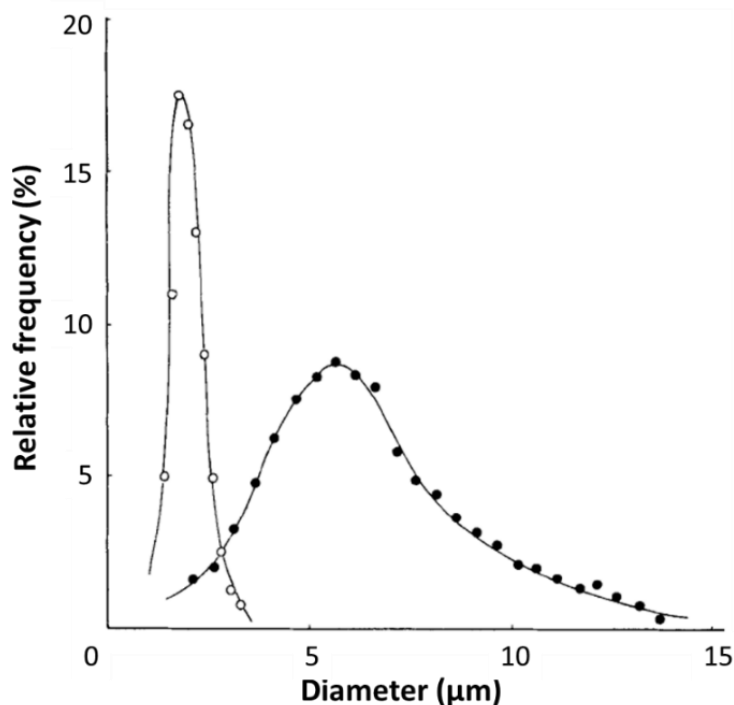


Figure 2. Distribution de la taille de mimes de GRs (●), préparés par émulsification et (○) de GRs de lapin. (Muramatsu and Kondo 1980)



## I.2. Techniques « digitales »

Afin de s'affranchir des tensioactifs tout en contrôlant la taille, la forme et les propriétés mécaniques des microparticules, des techniques de préparation à partir d'objets individuels ont été développées, on parle alors de techniques « digitales ».

### I.2.1. Technique utilisant un masque

Haghoogie et al. visent l'adaptation des mimes de GRs à l'environnement *in vivo* (Haghoogie, Toner, and Doyle 2009), notamment pour des applications biomédicales. Ils donnent donc une grande importance à la forme. Pour cela, ils appliquent la méthode « stop-flow lithographie » (Dendukuri et al. 2007) (Figure 3 (a)) pour la préparation de mimes de GRs par polymérisation dans une puce microfluidique. Des solutions de monomères sont d'abord mélangées et injectées dans un microcanal. Puis des rayons ultra-violet (UV) provoquent la photopolymérisation dans le canal à travers un masque poreux. Les mimes de GRs sont en forme de disques liée à la forme des pores du masque (Figure 3 (b)).

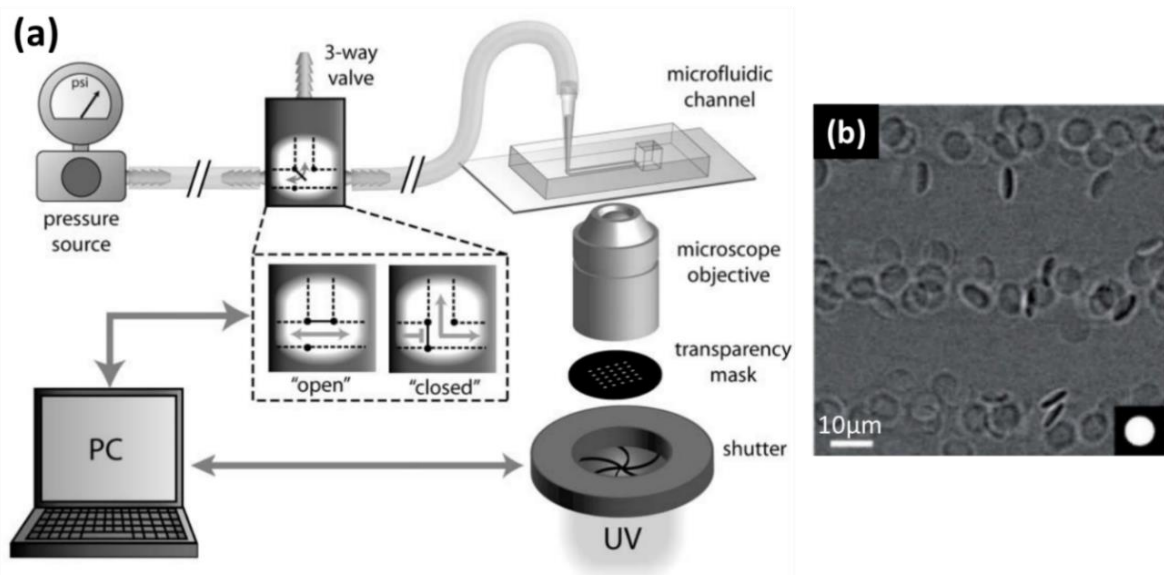


Figure 3. (a) Schéma de la méthode « stop-flow lithographie » (Dendukuri et al. 2007). (b) Image au microscope optique des microparticules de polymère produites (Haghoogie et al. 2009).

### I.2.2. Technique utilisant un moule

Merkel et al. utilisent quant à eux la technique « PRINT » (Figure 4 (a)) pour la préparation de mimes de GRs par réticulation d'un polymère à l'aide d'un moule. Un mélange (en couleur rouge) d'un polymère et d'un agent réticulant est injecté dans un moule creusé de puits en forme de disque (en couleur verte). La photoréticulation du mélange dans les puits produit les microparticules d'hydrogel. Un film de glace (en couleur bleue) est ensuite utilisé pour décoller les microparticules du moule et le film est fondu pour les libérer (Figure 4 (b)).

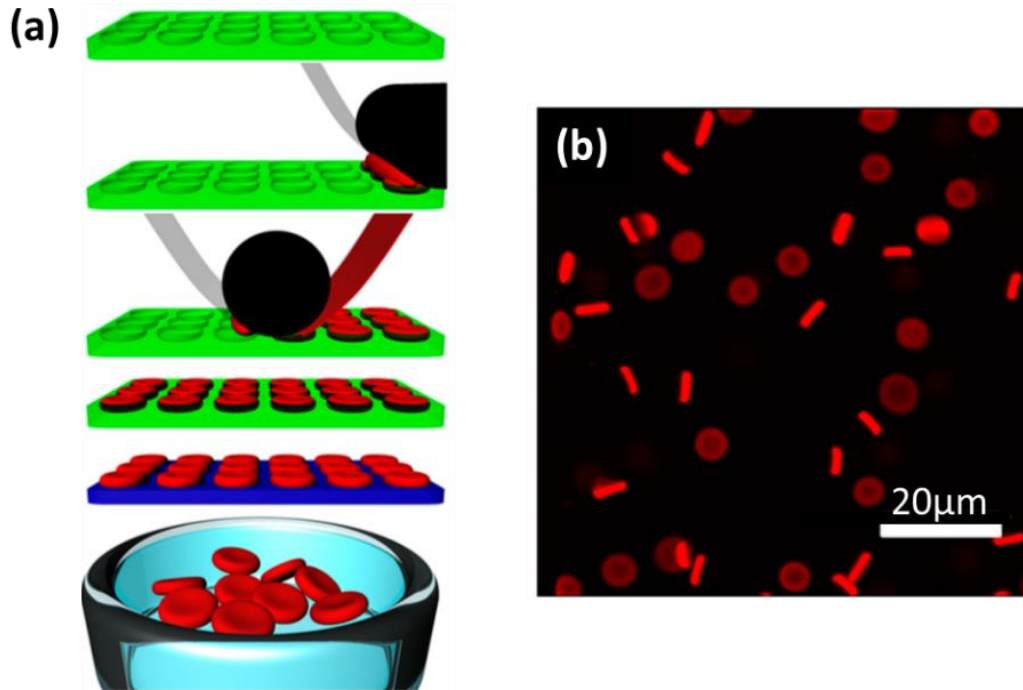


Figure 4. (a) Schéma du processus de la technique « PRINT ». (b) Image par microscopie à fluorescence de microparticules de polymère (Merkel et al. 2011).

Dans les deux méthodes présentées ci-dessus, la taille et la forme des pores ou des puits doivent être précises pour atteindre une monodispersité en taille et en forme. Ceci est un frein à la production de microparticules en grande quantité.

### 1.2.3. Technique « couche par couche »

La technique appelée « couche par couche » ou « Layer by Layer » (LbL) (Doshi et al. 2009) (She et al. 2013) consiste à construire des microcapsules de polymères à l'aide de particules modèles qui sont biconcaves et discoïdales, c'est-à-dire de même forme que les GRs, comme sur la Figure 5. Pour cela, la méthode « jetting électrodynamique » ou « pulvérisation électronique » (« electro spraying ») est appliquée. Une solution d'acide poly (lactique-co-glycolique) (PLGA) est d'abord mise dans une seringue qui est poussée par un pousse-seringue. Puis un capillaire est connecté à l'aiguille au bout de la seringue et une tension positive est appliqué entre la seringue et une feuille d'aluminium (à tension=0), placée en dessous du capillaire pour collecter les particules pulvérisées. Leur taille est influencée par le débit et la tension appliqués. Puis, ces particules sont incubées dans le propan-2-ol, ce qui transforme la forme de sphérique en biconcave et discoïdale. Le même effet peut être obtenu en mettant le PLGA et le propan-2-ol dans deux seringues différentes avant d'effectuer le processus de « jetting électrodynamique ». Ensuite, des polymères anioniques et cationiques sont ajoutés à leur surface de manière alternative. Après le dépôt d'un certain nombre de couches, la réticulation est réalisée pour renforcer la stabilité. Le noyau en PLGA est ensuite dissous en utilisant un mélange de tétrahydrofurane (THF)/propan-2-ol, ce qui donne des microcapsules de même forme que les GRs.

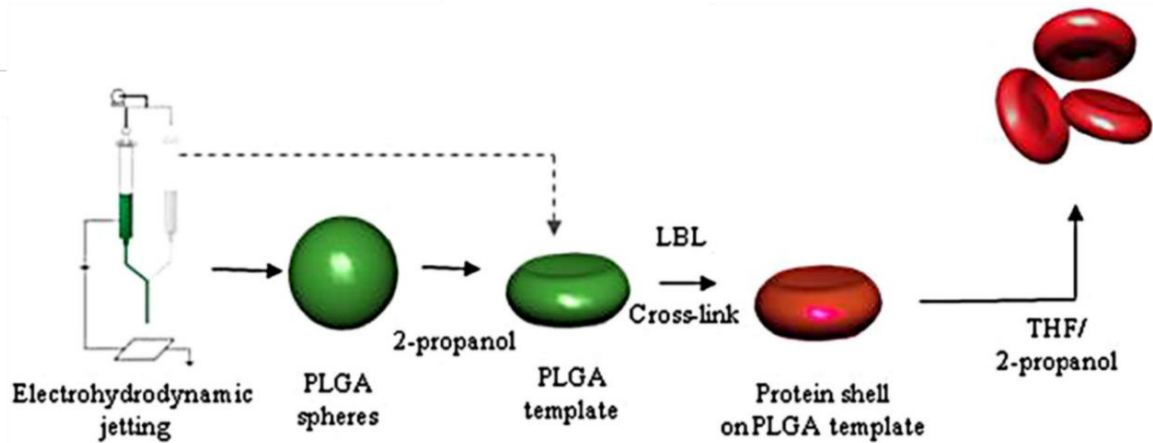


Figure 5. Schéma de la préparation de mimes globules rouges par la méthode « LbL » (Doshi et al. 2009)

Basée sur le même principe, d'autres matériaux peuvent aussi être choisis pour construire le noyau et les couches. Par exemple, She et al. utilisent des particules d'hydroxyde de calcium ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) préalablement traitées par du sulfate de dextran, comme noyau (She et al. 2013). En outre, la méthode « LbL » est performante pour retrouver les propriétés des GRs comme la taille, la forme, le module élastique et les fonctionnalités. Cependant, le processus comprend plusieurs étapes physiques et chimiques ce qui prend quelques jours pour une préparation. De plus, l'utilisation de produits chimiques toxiques comme le THF demande des précautions supplémentaires pendant la préparation.

L'étude des méthodes existantes de préparation de mimes de GRs montre les avantages d'une part de l'émulsification en termes de quantité de microparticules produites dans un temps court et de simplicité de mise en œuvre et d'autre part des techniques « digitales » en termes de contrôle en taille, en forme et en propriétés des microparticules. Cependant, pour les applications en mesures optiques et ultrasonores, nous sommes surtout intéressés par la production d'une grande quantité de microparticules monodisperses avec une taille et des propriétés mécaniques contrôlées proches des GRs et sans présence de tensioactifs. Le contenu des GRs (en hémoglobine) et leur forme ne sont pas pour l'instant notre priorité. Ainsi les deux catégories de méthodes présentent des inconvénients majeurs en termes d'utilisation de tensioactif, de polydispersité et/ou de complexité des techniques. Dans le chapitre II, nous allons donc voir que l'on peut combiner les avantages de ces deux catégories de méthodes en générant une émulsion dans un canal microfluidique.

## **Chapitre II. Technique de microfluidique à base de gouttes**

La microfluidique correspond à l'écoulement de fluide dans des canaux de taille micrométrique. Les systèmes microfluidiques peuvent être monophasiques en ne fonctionnant qu'avec un fluide, ou multiphasiques avec au moins deux fluides qui sont en contact à travers des jonctions. Dans ces jonctions, la rencontre de fluides non miscibles peut donner lieu à la segmentation d'un des flux et à la génération de microgouttes. Les microgouttes sont alors générées avec une taille et une forme bien contrôlée (Seemann et al. 2012) et à haute fréquence (Teh et al. 2008). On appelle cette technique la microfluidique à base de gouttes et elle se rapproche de l'émulsification, avec l'avantage de ne pas nécessiter de tensioactifs. Ceci tout en permettant le contrôle et l'observation de chaque microgoutte, due à leur disposition dans le canal, d'où le rapprochement avec une technique « digitale ».

Ces microgouttes intéressent particulièrement les biologistes et les chimistes car elles peuvent servir comme microréacteurs pour effectuer des mélanges ou des réactions chimiques dans un environnement contrôlé, ou pour fabriquer des microparticules fonctionnelles comme par encapsulation (Baroud, Gallaire, and Dangla 2010) (Casadevall i Solvas and deMello 2011). Ainsi c'est une technique adaptée pour la fabrication de microparticules modèles. Dans ce chapitre, nous abordons les différentes techniques de microfluidique à base de gouttes qui se différencient par leur structure et les matériaux utilisés. Nous définissons également les régimes de formation des gouttes.

### **II.1. Structure du dispositif microfluidique**

Les dispositifs microfluidiques peuvent être fabriqués sous forme de puces (« chip ») intégrant les canaux et les jonctions ou sous formes de capillaires et de jonctions connectés entre eux.

#### **II.1.1. Les puces microfluidiques**

Les puces microfluidiques sont les dispositifs les plus utilisés dans la littérature. Les canaux et les jonctions sont gravés, en général par « soft lithographie ». Le matériau constituant la puce est important pour définir la technique de fabrication (Ren, Zhou, and Wu 2013). Le choix du matériau de la puce microfluidique dépendra également de la phase dispersée sous forme de microgouttes et de la phase continue qui doit être non miscible avec la phase dispersée et qui doit mouiller la surface des canaux.

Une grande variété de matériaux sont utilisés dont les principaux sont le polydiméthylsiloxane (PDMS), le verre et les thermoplastiques :

- Le matériau le plus utilisé en biologie est le PDMS (Figure 6) car c'est un élastomère biocompatible (Whitesides 2006). Sa transparence permet d'observation par microscopie optique et ses propriétés élastiques facilitent l'utilisation de valves micromécaniques (Mukhopadhyay 2007). Comme il est hydrophobe, il est plus facilement utilisé pour générer

des gouttes de phase aqueuse dans une huile proche chimiquement du PDMS. Cependant, le PDMS est poreux ce qui ne permet pas de stocker des microgouttes longtemps au risque qu'elles se déforment. De plus, son élasticité le rend déformable si on applique de fortes pressions. Enfin, il n'est pas compatible avec les solvants organiques et peut se dissoudre ou gonfler au contact de ces solvants (Whitesides 2006). Cela limite l'utilisation du PDMS notamment pour certaines synthèses chimiques. Par ailleurs, même si le PDMS est traité auparavant pour rendre la surface du canal hydrophile, elle redevient hydrophobe au bout d'un moment (Mukhopadhyay 2007).

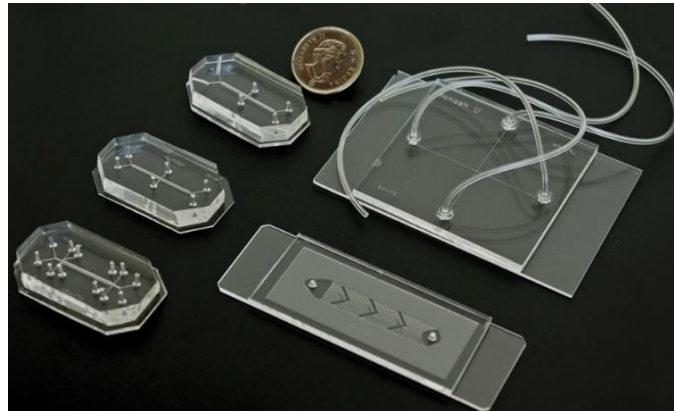


Figure 6. Exemples de puces microfluidiques de PDMS (<https://ufluidix.com/portfolio/device-materials/>)

- Un autre matériau est le verre. Comme il est hydrophile, il nécessite de le traiter pour le rendre hydrophobe et générer des microgouttes de phase aqueuse dans le cas d'applications en biologie.

- Des alternatives sont les thermoplastiques comme le poly(méthacrylate de méthyle) (PMMA) qui est plus rigide que le PDMS, et le copolymère cyclo-oléfine (COC) qui est moins poreux que le PDMS (Mukhopadhyay 2007) (Nge, Rogers, and Woolley 2013). Cependant, tous les deux sont incompatibles avec les solvants organiques. D'autres matériaux utilisés pour la fabrication des puces microfluidiques sont présentés dans le Tableau de l'Annexe 2.

### II.1.2. Les montages microfluidiques avec des capillaires et des jonctions

Des capillaires en verre ou en **téflon** (en tétra-fluoroéthylène, comme le polytétrafluoroéthylène (PTFE) ou le perfluoroalkoxy (PFA)) peuvent aussi être utilisés pour la génération de gouttes. Par rapport au PDMS, le verre et le téflon sont plus résistants aux solvants organiques et ne sont pas poreux (Ren et al. 2013). Cela permet d'élargir l'éventail de choix de fluides. De plus, la construction d'un dispositif à partir de capillaires est beaucoup plus simple et flexible (tant que les opérations restent relativement simples) que la fabrication d'une puce microfluidique qui demande un nouveau moule à chaque modification.

Les capillaires en téflon sont connectés à des jonctions en téflon ou en polyétheréthercétone (PEEK) pour le croisement des phases continues (huile) et dispersées (Figure 7). Comme ils sont hydrophobes, des gouttes de phase aqueuse sont générées dans

l'huile alors que le verre demanderait un traitement de surface. De plus ils sont moins rigides que le verre. J'ai donc choisi de travailler avec des capillaires en téflon et des jonctions en PEEK durant ma thèse.

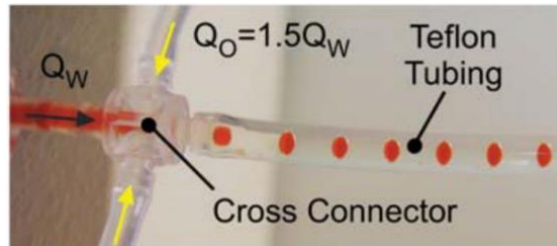


Figure 7. Utilisation de capillaires en téflon pour la génération de microgouttes d'eau dans de l'huile (Trivedi et al. 2010)

### II.1.3. Géométrie des canaux

La géométrie des canaux influence la forme et la taille des gouttes générées. Les trois géométries les plus utilisées sont le « *cross-flow* », le « *co-flow* » et le « *flow-focusing* » (Figure 8). Dans les trois géométries, la force de cisaillement visqueuse conduit à la génération des gouttes (Zhu and Wang 2017).

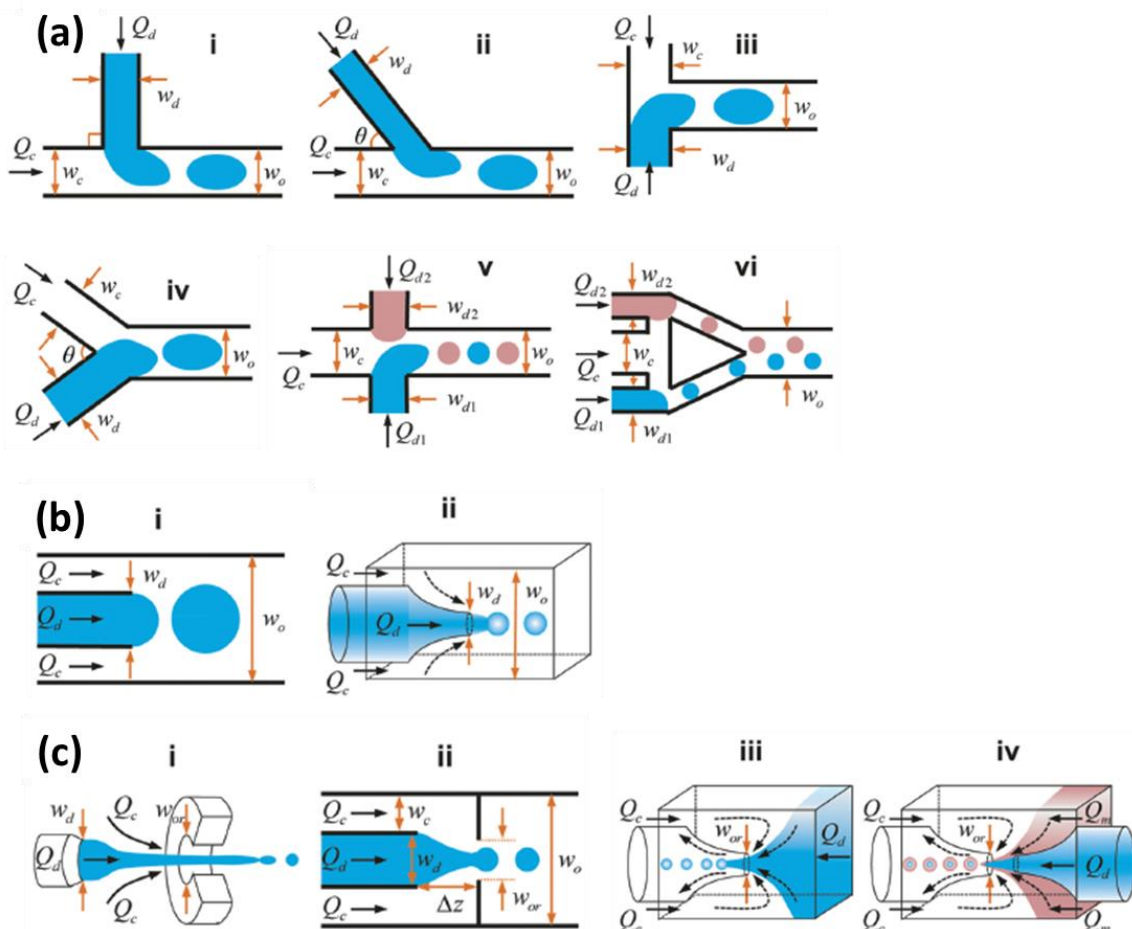


Figure 8. Géométrie des canaux et des jonctions : (a) en « *cross-flow* », (b) en « *co-flow* » et (c) en « *flow-focusing* ». Sur les schémas,  $Q$  indique le débit et  $w$  la largeur. Les indices  $d$ ,  $c$ ,  $o$  et  $or$  signifient respectivement la phase dispersée, la phase continue, le canal de sortie et l'orifice en géométrie « *flow-focusing* » (Zhu and Wang 2017).

### II.1.3.1. La géométrie « cross-flow »

Dans la géométrie « cross-flow », la phase continue et la phase dispersée se croisent avec un angle  $\theta$  ( $0^\circ < \theta \leq 180^\circ$ ) (Figure 8 (a)). Due à l'immiscibilité des deux phases, une interface se forme à la jonction. Au cours de l'écoulement, la phase dispersée entre dans le canal principal où se trouve la phase continue et la force de cisaillement pousse la goutte qui se forme jusqu'au moment où elle se détache du fluide original (Teh et al. 2008).

Cette géométrie est largement utilisée dû à la simplicité de la fabrication et de la manipulation (Seemann et al. 2012) (Zhu and Wang 2017). La jonction peut être sous la forme en T (Figure 8 (a) i, ii et iii) ou en Y (iv). Le cas particulier où les deux phases se croisent en arrivant face à face ( $\theta=180^\circ$ ) (iii) s'appelle « head-on ». La géométrie peut aussi présenter deux jonctions en T (v et vi) pour l'injection de deux phases dispersées.

### II.1.3.2. La géométrie « co-flow »

Dans la géométrie « co-flow », les deux phases circulent en parallèle dans le canal (Figure 8 (b)). La Figure 9 montre l'exemple de deux capillaires concentriques en verre. Le capillaire circulaire se trouve à l'intérieur de l'autre à section carrée. La phase dispersée circule dans le capillaire circulaire, alors que la phase continue circule dans le capillaire carré. Les gouttes sont générées après la zone de rencontre des deux phases. Pour un capillaire en verre, la dimension et la structure peuvent être modifiées par la technique de tirage de capillaire en chauffant (Utada et al. 2007).

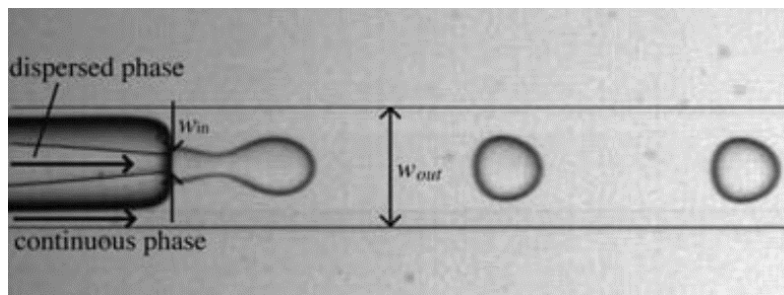


Figure 9. Génération de gouttes en « co-flow » (Baroud et al. 2010)

### II.1.3.3. La géométrie « flow-focusing »

La géométrie « flow-focusing » (Figure 8 (c)) ressemble à la géométrie « co-flow ». En effet, la distinction est ambiguë dans la littérature, et certains auteurs pensent que la géométrie « flow-focusing » est un cas particulier de la géométrie « co-flow » (Seemann et al. 2012). Dans le cas de la géométrie « flow-focusing », les deux phases sont focalisées à travers un orifice qui permet de générer des gouttes plus petites que celles issues de la géométrie « co-flow » (Zhu and Wang 2017).

Les géométries « co-flow » et « flow-focusing » permettent de générer des gouttes avec une meilleure monodispersité et une fréquence plus élevée que la « cross-flow » (Seemann et al. 2012), mais elles sont plus compliquées à fabriquer.

## II.2. Génération des gouttes

La génération des gouttes est influencée par les débits appliqués pour les deux fluides et par leurs propriétés physico-chimiques (Teh et al. 2008), donne lieu à différents régimes.

### II.2.1. Caractérisation des flux et des microgouttes

#### II.2.1.1. Le nombre de Reynolds

Le régime d'écoulement des fluides (laminaire ou turbulent) est donné par le nombre de Reynolds ( $Re$ ) qui est un nombre adimensionnel représentant le rapport entre la force inertielle et la force visqueuse :

$$Re = \frac{\rho \times v \times D}{\mu}$$

Equation 1

$\rho$  : densité du fluide ( $\text{kg/m}^3$ )

$v$  : vitesse moyenne du fluide ( $\text{m/s}$ )

$D$  : diamètre du canal qui est une longueur caractéristique ( $\text{m}$ )

$\mu$  : viscosité dynamique du fluide ( $\text{Pa}\cdot\text{s}$ )

Pour un écoulement en microfluidique ( $D < 1\text{mm}$ ),  $Re$  varie entre  $10^{-6}$  et 1, ce qui signifie que l'écoulement est laminaire et que la force visqueuse est dominante. Par conséquent, les mélanges se font essentiellement par diffusion et non par convection. De plus, dans ces conditions, la vitesse moyenne  $v$  d'un fluide peut être calculée à partir de son débit  $Q$  par :

$$v = \frac{Q}{\pi(D/2)^2}$$

Equation 2

#### II.2.1.2. La longueur capillaire

La longueur capillaire ( $l_c$ ) est définie par le rapport entre les effets capillaires et les effets de gravité :

$$l_c = \sqrt{\frac{\gamma_{CD}}{\Delta\rho \times g}}$$

Equation 3

$\gamma_{CD}$  : énergie interfaciale entre la phase continue et la phase dispersée ( $\text{N/m}$ )

$\Delta\rho$  : différence de la densité entre les deux phases ( $\text{kg/m}^3$ )

$g$  : accélération gravitationnelle ( $\text{m/s}^2$ )



En général  $l_c$  est supérieur à 1mm. Ainsi le canal étant submillimétrique, les gouttes formées auront un diamètre inférieur à  $l_c$ , ce qui conduit à des effets de gravité qui sont négligeables et à des effets capillaires qui prédominent. (Zhang et al. 2015)

### II.2.1.3. Le nombre capillaire

Le nombre capillaire ( $Ca$ ) est un nombre adimensionnel qui représente le rapport entre les effets visqueux et les effets capillaires (Christopher and Anna 2007) (Zhu and Wang 2017). En microfluidique à base de gouttes,  $Ca$  est souvent calculé pour la phase continue car elle cause la déformation des gouttes (Christopher and Anna 2007).

$$Ca = \frac{\mu_c \times v_c}{\gamma_{CD}}$$

Equation 4

$\mu_c$  : viscosité dynamique de la phase continue (Pa·s)

$v_c$  : vitesse de la phase continue (m/s)

$\gamma_{CD}$  : énergie interfaciale entre la phase continue et la phase dispersée (N/m)

Typiquement,  $Ca$  est inférieur à 1, ce qui montre l'importance des effets capillaires.  $Ca$  permet de délimiter les régimes de génération des gouttes.

### II.2.2. Régimes de génération des gouttes

Pour chaque géométrie de canal, trois régimes de génération de gouttes peuvent être observés. La Figure 10 montre un exemple pour la génération de gouttes dans une jonction en T (« cross-flow ») où une phase continue circule de droite à gauche dans le canal horizontal et la phase dispersée arrive par le canal vertical de bas en haut.

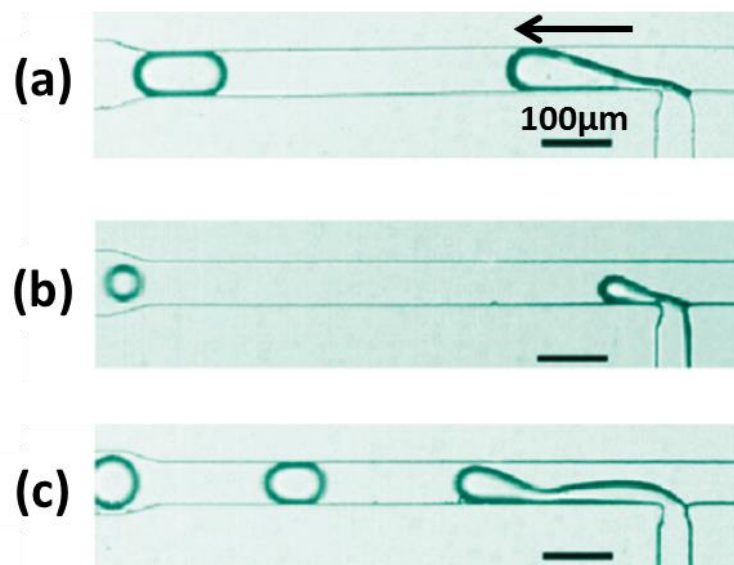


Figure 10. Régimes de génération des gouttes : (a) « squeezing » (b) « dripping » (c) « jetting ». La flèche signifie le sens de circulation des gouttes. (Zagnoni, Anderson, and Cooper 2010)

### II.2.2.1. Régime « squeezing »

Dans le régime « squeezing » (Figure 10 (a)), la « tête » du flux de phase dispersée entre dans le canal principal et le faible cisaillement de la phase continue la pousse à avancer en formant un « cou » mince. La goutte peut alors se remplir sans se détacher même après avoir touché la paroi opposée du canal. Et le cou continue à mincir jusqu'au moment où il se casse. La goutte formée est allongée (appelée « plug ») avec un volume important et elle touche la paroi du canal. Dans la littérature, ce régime apparaît pour des  $Ca \leq 0,01$  (De Menech et al. 2008) dû à un faible débit et/ou une faible viscosité par rapport à l'énergie interfaciale (Zhu and Wang 2017).

### II.2.2.2. Régime « dripping »

Dans le régime « dripping », le cisaillement est plus important et les gouttes se détachent avant de toucher la paroi opposée (Figure 10 (b)). Les gouttes sont alors sphériques avec un diamètre inférieur à celui du canal. Les forces visqueuses deviennent donc importantes et ce régime correspond à  $Ca \geq 0,02$  (De Menech et al. 2008).

### II.2.2.3. Régime « jetting »

Dans le régime « jetting », un « filet » de phase dispersée collée à la paroi est observé en sortie de la jonction (Figure 10 (c)). Ceci est dû à un très fort cisaillement de la phase continue sur la phase dispersée lié à un fort débit et/ou une viscosité élevée par rapport à l'énergie interfaciale (Christopher and Anna 2007) (Zhu and Wang 2017). La rupture a lieu en aval dues aux instabilités de Rayleigh-Plateau, produisant des gouttes avec des tailles et une fréquence polydispersées. C'est donc un régime qui apparaît à des valeurs de  $Ca \approx 0,2$ .

Ce chapitre montre l'intérêt de la microfluidique à base de gouttes pour la génération de gouttes monodisperses. J'ai donc choisi cette technique que j'ai adapté au cours de ma thèse pour la préparation de microparticules monodisperses. Pour le matériau constituant les microparticules, j'explore dans le chapitre III la famille des hydrogels, afin de viser des propriétés mécaniques proches de celles des GRs. Enfin dans le chapitre IV, je présente la bibliographie sur la préparation de microparticules de l'hydrogel que j'ai choisi, en microfluidique à base de gouttes.

## Chapitre III. Choix de l'hydrogel

### III.1. Définition

Les hydrogels sont définis par « des réseaux polymères réticulés hydrophiles, capables d'absorber et de garder une quantité significative d'eau dans leur structure » (Rosiak and Yoshii 1999) (Hoffman 2012) (Caccavo et al. 2018). Ainsi ils peuvent présenter des propriétés mécaniques variées suivant le taux de réticulation et/ou la teneur en eau. Ce sont donc des matériaux adaptés pour mimer les GRs.

La définition ci-dessus se focalise sur la structure chimique et l'interaction avec l'eau, mais sans imposer l'existence d'eau à l'intérieur. C'est pour cette raison que la nomination de « hydrogel sec » est trouvée dans certaines publications (Fonteno and Bilderback 1993) (Satarkar and Zach Hilt 2007) (Hoffman 2012). D'ailleurs, on mesure la capacité de gonflement des hydrogels, en comparant l'hydrogel avant et après hydratation (Lee et al. 2000) (Wu et al. 2018). Ainsi, deux propriétés sont reconnues pour les hydrogels :

- 1) les hydrogels gonflent en présence d'eau dû aux groupes fonctionnels hydrophiles ;
- 2) les hydrogels ne se dissolvent pas dans l'eau dû à la structure du réseau formé après gélification (processus qui est détaillé en III.3.) (Ahmed 2015).

Les hydrogels sont activement étudiés depuis plus de 50 ans, dans des domaines variés comme en biomédical et en pharmaceutique (Maitra and Shukla 2014) (Ahmed 2015). La première application biologique d'hydrogels a été publiée en 1960 par (Wichterle and Lim 1960), en tant que matériau compatible avec les tissus, capable de contenir de l'eau et perméable aux métabolites. Ces propriétés de biocompatibilité et de similarité avec la structure intracellulaire ont ainsi motivé l'utilisation des hydrogels en biomédecine (Hoffman 2012) (Agüero et al. 2017) et en ingénierie tissulaire (Lee and Mooney 2012).

Avec le développement des technologies biomédicales, les microparticules d'hydrogel sont souvent utilisées comme matrice pour encapsuler des agents bioactifs (médicaments, protéines, cellules, etc.). Ces agents sont ainsi protégés avant d'être libérés. L'encapsulation peut aussi fournir un environnement *in vivo* qui permet la prolifération des cellules pour réparer ou régénérer des tissus, mais aussi pour générer des produits biomédicaux (Utech et al. 2015). Grâce à la biocompatibilité des hydrogels, il n'y a pas d'irritation ou de rejet par le système immunitaire du patient, ce qui garantit la réussite de la circulation dans le corps et de la libération des objets encapsulés.

### III.2. Composition des hydrogels

Les hydrogels peuvent être constitués d'un biopolymère (polymère naturel) ou d'un polymère synthétique ou d'un mélange des deux. Depuis le début du 20<sup>ème</sup> siècle, les biopolymères sont progressivement remplacés par les polymères synthétiques car ils démontrent une meilleure performance et des propriétés plus reproductibles (Ahmed 2015). Depuis quelques temps, avec le développement de la recherche biologique et biomédicale, les biopolymères attirent à nouveau l'attention des chercheurs dû à leurs propriétés de biocompatibilité, de biodégradabilité et de non-toxicité (Acarturk 1999) (Lee and Mooney 2012). Deux types de biopolymères sont beaucoup utilisés (Figure 11) : les protéines comme la gélatine (obtenue par l'hydrolyse du collagène) et les polysaccharides. Parmi les polysaccharides, certains sont issus de sources marines comme l'agarose (extrait des algues rouges) et l'alginate (extrait des algues brunes). Certains viennent de sources végétales comme la cellulose, la pectine, etc.

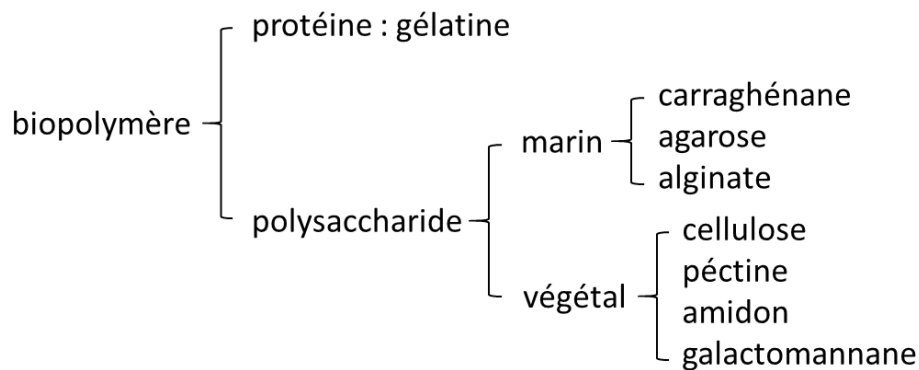


Figure 11. Biopolymères utilisés pour la préparation des hydrogels

### III.3. Processus de gélification

Pour former un hydrogel à partir d'un polymère, la gélification est réalisée à travers la réticulation (« cross-linking »). C'est un processus qui permet de lier les chaînes macromoléculaires en formant un réseau tridimensionnel. Deux méthodes principales peuvent être utilisées pour effectuer la réticulation (Figure 12).

La réticulation chimique signifie que l'on crée les liaisons covalentes entre les chaînes macromoléculaires à travers un agent de réticulation (« crosslinker » en anglais). L'agent de réticulation peut rester dans le réseau (Figure 12 (a)), ou être éliminé (Figure 12 (b)). La réticulation physique (Figure 12 (c)) indique que les chaînes sont liées avec les liaisons non covalentes (liaisons hydrogène, liaisons ioniques, etc.).

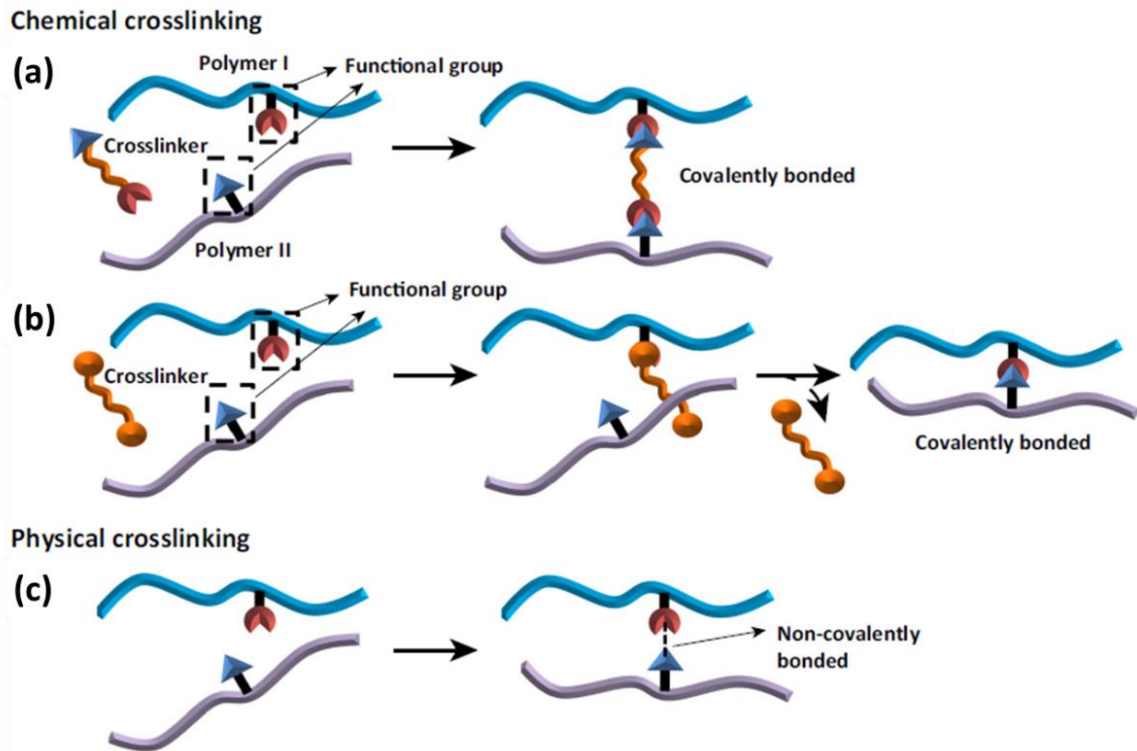


Figure 12. Présentation schématique de différents types de réticulation (Reddy, Reddy, and Jiang 2015)

### III.3.1. Réticulation chimique

Lors de la réticulation chimique, les liaisons covalentes formées sont relativement fortes rendant l'hydrogel stable. Cet hydrogel est appelé « gel chimique » ou « gel permanent » (Rosiak and Yoshii 1999) (Hoffman 2012) (Caccavo et al. 2018). Un exemple de réticulation chimique est la formation de l'hydrogel pHEMA (poly(méthacrylate d'hydroxyéthyle)). En présence d'EGDMA (diméthacrylate d'éthylène glycol), un agent de réticulation, les chaînes de HEMA sont liées alternativement (Figure 13). Un réseau est désormais créé, formant le pHEMA. Wichterle et al. ont synthétisé du pHEMA pour fabriquer des lentilles, des artères artificielles, etc (Wichterle and Lim 1960).

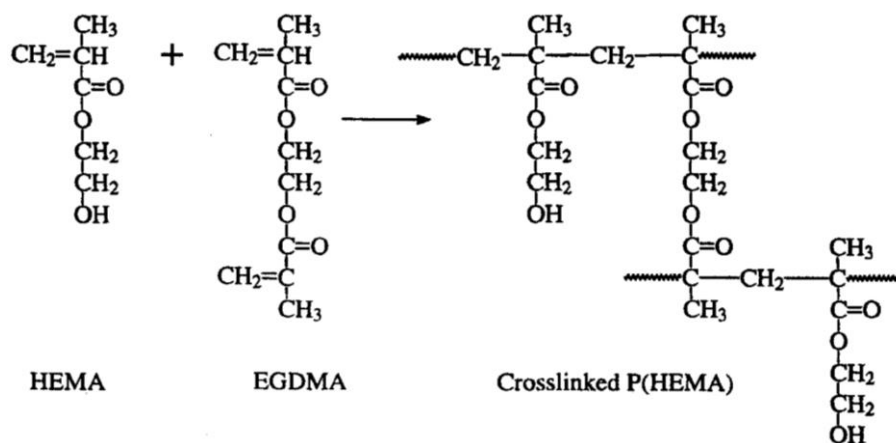


Figure 13. Réticulation chimique du pHEMA (Mathur, Moorjani, and Scranton 1996)

### III.3.2. Réticulation physique

L'hydrogel formé par réticulation physique est appelé « gel physique » ou « gel réversible » (Rosiak and Yoshii 1999) (Hoffman 2012) (Maitra and Shukla 2014) (Caccavo et al. 2018). La réticulation physique peut être initiée soit par la température, soit par la présence d'ions.

#### III.3.2.1. Par le changement de température - liaisons hydrogène

Un exemple de gélification initiée par le changement de la température est la gélification de l'agarose. L'agarose est un polysaccharide (Figure 14 (a)) à base d'agar-agar purifié, extrait des algues rouges. Il est soluble dans l'eau chaude ( $>40^{\circ}\text{C}$ ). Quand la température est inférieure à  $40^{\circ}\text{C}$  (Clark and Ross-Murphy 1987), les chaînes d'agarose passent de l'état de « bobines aléatoires » à celui de double hélice, par les liaisons hydrogène (Figure 14 (b)). Finalement, le réseau contenant les agrégats d'hélices mène à la gélification de l'agarose, donnant un gel transparent et élastique.

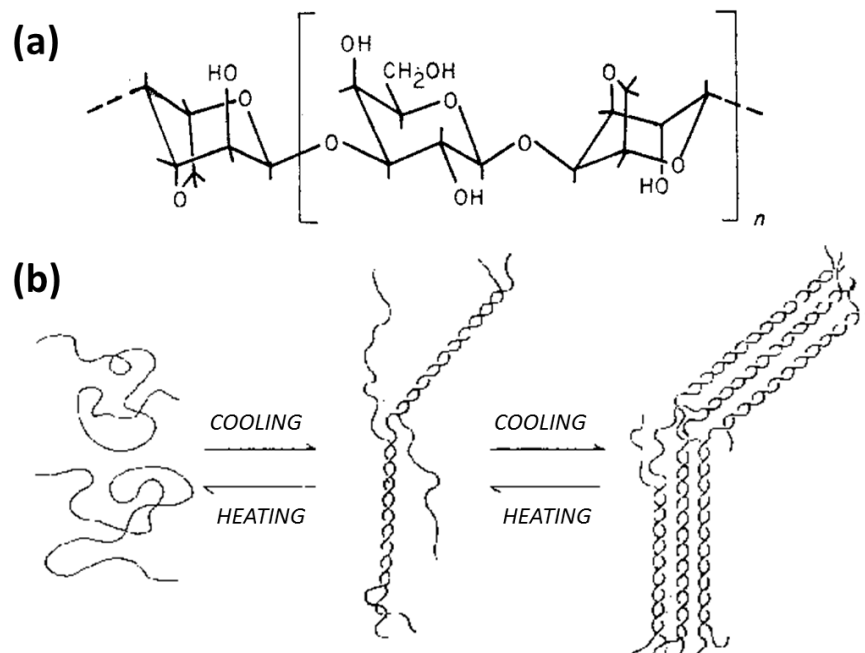


Figure 14. (a) Structure chimique de l'agarose (Arnott, Fulmer, and Scott 1974). (b) Formation du réseau d'agarose (Armisen and Galatas 1987)

#### III.3.2.2. Par la présence d'ions – réticulation ionique

Les chaînes macromoléculaires sont chargées et des liaisons ioniques peuvent se former avec des ions de charge opposée, ce qui déclenche la réticulation en chaîne. Ce processus est appelé réticulation ionique (« ionic cross-linking »). Un exemple est la gélification de l'alginate (Figure 15), qui sera détaillée dans la partie III.5.4.2. L'alginate est un biopolymère anionique. Au contact avec des cations divalents comme le cation calcium  $\text{Ca}^{2+}$ , les liaisons ioniques se forment rapidement entre les cations et les chaînes d'alginate. L'hydrogel d'alginate est formé.

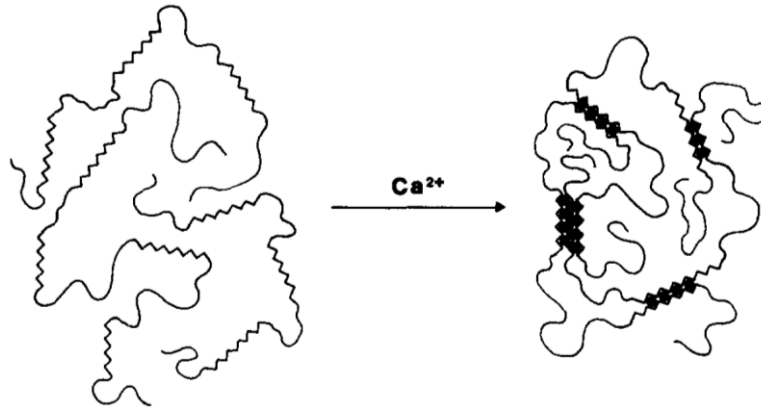


Figure 15. Formation d'un réseau d'alginate (Gacesa 1988)

Comme les liaisons ioniques sont relativement faibles, l'hydrogel formé n'est pas stable au changement de l'environnement. Par exemple, l'hydrogel peut se dissoudre dû à un changement du pH, de la force ionique du solvant, de la température, etc. (Kumacheva and Garstecki 2011)

### III.4. Propriétés des hydrogels

Les propriétés des hydrogels très étudiées dans la littérature sont les propriétés mécaniques comme la rigidité, le module d'élasticité et la stabilité, afin de faciliter la manipulation (Hoffman 2012). D'autres propriétés comme la porosité et la capacité de gonflement sont aussi discutées.

Les propriétés des hydrogels dépendent de leur structure qui est constituée d'un réseau de chaînes macromoléculaires (Figure 16).

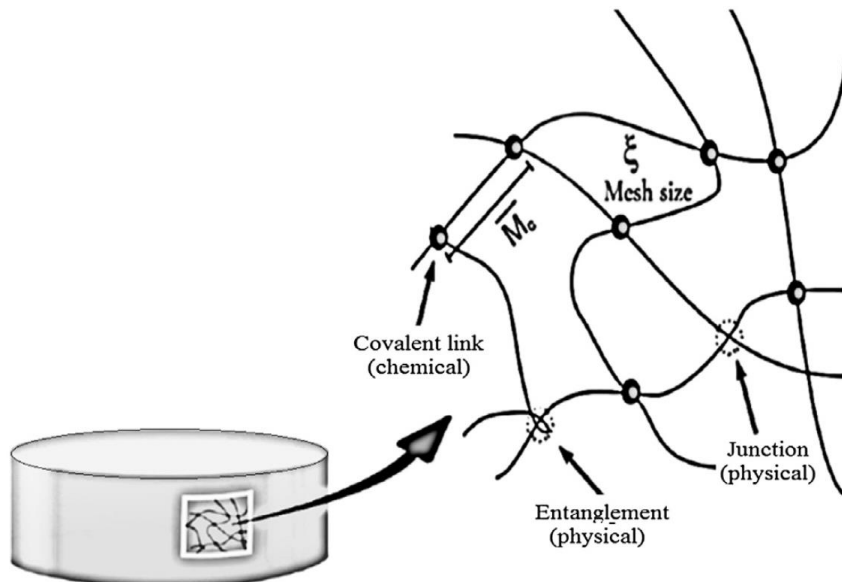


Figure 16. Structure chimique d'un hydrogel (Ullah et al. 2015)

Les chaînes peuvent être réticulées par les liaisons chimiques (covalentes) ou physiques (hydrogène, ioniques ou simplement par enchevêtrement). Deux paramètres sont souvent utilisés pour quantifier l'effet de la structure chimique sur les propriétés de l'hydrogel :

la masse moléculaire entre deux agents de réticulation ( $M_C$ ) et la taille de maillage dans le réseau ( $\xi$ ). Ces deux paramètres reflètent la densité de réticulation  $d$ . Plus  $M_C$  ou  $\xi$  sont élevées, plus le nombre d'unités de monomères se situant entre deux agents/jonctions de réticulation est élevé, i.e. les agents se situent plus loin les uns des autres dans le réseau. Par conséquent, l'augmentation de  $M_C$  ou  $\xi$  signifie la diminution de  $d$ .

Le module de Young ( $E$ ) et la capacité de gonflement de l'hydrogel sont influencés par le type de gélification et la densité de liaisons entre les chaînes macromoléculaires dans le réseau (Maitra and Shukla 2014). (Caccavo et al. 2018) ont étudié la relation entre  $E$  et  $M_C$ , à partir de cinq hydrogels différents présentant des liaisons dominantes de nature différente. Par exemple pour l'hydrogel d'agarose, le réseau est formé par des liaisons hydrogène alors que l'hydrogel d'alginate comprend des liaisons ioniques.

La Figure 17 montre que  $E$  est influencé par deux paramètres :

1) La densité de réticulation  $d$  qui dépend de  $M_C$  (en abscisse dans la Figure 17) : on a vu auparavant que  $d$  diminue lorsque  $M_C$  augmente. Or on voit sur la Figure 17 que  $E$  diminue quand  $M_C$  augmente. Par conséquent  $E$  augmente avec  $d$ . Ceci est logique si on considère que plus les liaisons sont denses, plus le mouvement des molécules est gêné, ce qui rend l'hydrogel plus rigide.

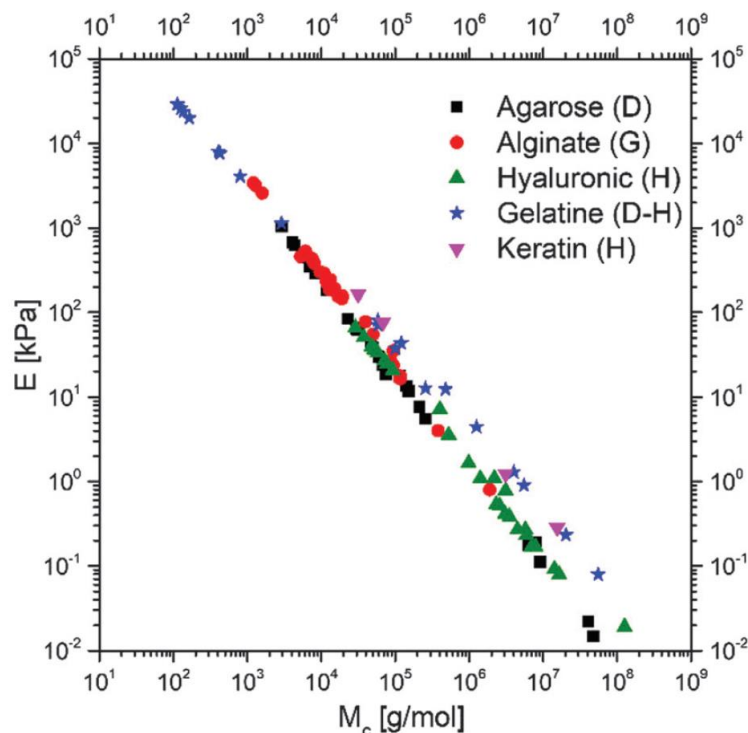


Figure 17. Le module de Young ( $E$ ) en fonction de la masse moléculaire entre deux agents de réticulation ( $M_C$ ) pour cinq hydrogels différents présentant des liaisons dominantes de nature différente : liaison hydrogène (D) ; liaison ionique (G) ; liaison covalente (H) (Caccavo et al. 2018).



2) La force de liaison de réticulation qui dépend du type de liaison (en légende dans la Figure 17) : elle décroît lorsqu'on passe des liaisons covalentes (H) aux liaisons ioniques (G) puis aux liaisons hydrogène (D). Quand la densité de liaisons est faible ( $M_c$  élevé), il faut des liaisons fortes pour rigidifier l'hydrogel et augmenter  $E$ . C'est pour cela que la kératine et la gélatine présentent un  $E$  supérieur à celui de l'agarose.

Par ailleurs, la porosité et la capacité de gonflement sont aussi influencé par la densité de réticulation  $d$ . Quand  $d$  est faible, la structure locale est plus poreuse et l'hydrogel présente une capacité de gonflement supérieure.

On remarque que parmi ces hydrogels, celui d'alginate forme un réseau en impliquant des liaisons ioniques. C'est pour cela que la gélification est facile à réaliser et la structure obtenue est flexible. De plus,  $E$  varie de 1 à  $10^3$  kPa (Figure 17), ce qui suffit pour s'approcher de celui des GRs ( $E=26\pm 7$  kPa (Dulińska et al. 2006)). Ce sont les deux principales raisons pour lesquelles j'ai choisi le gel d'alginate pour mimer les GRs. Dans la partie qui suit, je décris donc les mécanismes de gélification et les propriétés des hydrogels d'alginate.

### III.5. Hydrogel d'alginate

En général, le terme *alginate* ou *algin* correspond au sel de l'acide alginique. Mais on le retrouve dans la littérature pour parler de l'acide alginique. Dans ce manuscrit, sans mention supplémentaire, l'alginate signifie le sel de l'acide alginique.

#### III.5.1. Description

L'alginate est un polysaccharide linéaire et anionique, extrait des algues brunes, représentant jusqu'à 40% de la matière sèche (Draget 2009). Il peut également être synthétisé par biosynthèse bactériale, ce qui donne une structure chimique et des propriétés physiques mieux définies (Lee and Mooney 2012). Cependant, les alginates commerciaux sont aujourd'hui tous produits par l'extraction des algues brunes. Dans les algues brunes, l'alginate est sous forme de sel avec des cations notamment de calcium ( $Ca^{2+}$ ), un peu de magnésium ( $Mg^{2+}$ ) et de sodium ( $Na^+$ ). Le processus de production industrielle de l'alginate est décrit en Annexe 1 où on voit que la première étape consiste à transformer les sels insolubles, Ca-alginate et Mg-alginate, en sel soluble, Na-alginate. Ainsi en pratique, l'alginate de sodium (Na-alginate) est la forme la plus répandue du sel d'alginate (McHugh 1987). Selon la pureté, il existe plusieurs grades d'alginate (Agüero et al. 2017). L'alginate est non toxique et biocompatible quand la pureté est assez élevée (Lee and Mooney 2012). Il est soluble dans l'eau et la solution visqueuse obtenue peut être utilisée comme un additif de nourriture, un agent d'encollage, etc. (Iwata et al. 1994).

### III.5.2. Applications de l'alginate

L'alginate a des effets bénéfiques en santé. Quand l'alginate est ingéré, il va se transformer en gel d'acide alginique dû à l'acidité de l'estomac. Comme ce gel ne peut pas être digéré dû à l'absence de l'enzyme qui permet de le dégrader (l'alginate), il fonctionne comme une fibre et est utile pour la régulation intestinale. De plus, l'alginate accélère l'élimination du cholestérol et abaisse l'absorption de métaux nocifs comme le strontium (Sr) et le cadmium (Cd). En pharmacie, l'alginate est aussi utilisé pour traiter les maladies comme l'ulcère peptique (Iwata et al. 1994). Par ailleurs l'alginate est aussi très utilisé sous forme d'hydrogel, notamment pour l'encapsulation de cellules. Pour cela, de l'alginate est préparé sous forme de microparticules (Chapitre IV), car il a une structure similaire aux matrices extracellulaires. D'autres agents bioactifs, comme des protéines et des médicaments, peuvent aussi être encapsulés de la même manière (Agüero et al. 2017). Par ailleurs, l'hydrogel d'alginate est utilisé dans les pansements pour ses propriétés hydrophiles, ce qui permet de garder l'humidité et de faciliter la cicatrisation (Lee and Mooney 2012) (Wu et al. 2018).

### III.5.3. Structure de l'alginate

L'alginate est un copolymère linéaire constitué de deux monomères :  $\beta$ -D-mannuronate (appelé M) et  $\alpha$ -L-gulonate (appelé G) (Figure 18).

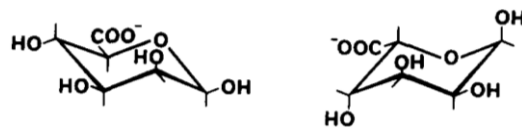


Figure 18. Monomères de l'alginate :  $\beta$ -D-mannuronate appelé M (gauche) et  $\alpha$ -L-gulonate appelé G (droite). (Gacesa 1988)

Les deux monomères peuvent s'associer pour former des blocs : le *bloc M* entre plusieurs M consécutifs, le *bloc G* entre plusieurs G consécutifs et le *bloc alternatif* entre des monomères M et G (Figure 19).

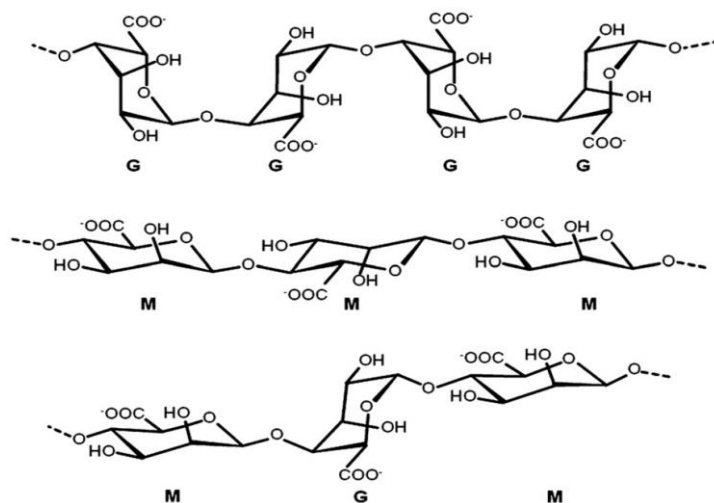


Figure 19. Structure chimique du *bloc G* (haut), *bloc M* (milieu) et *bloc alternatif* (bas). (Lee and Mooney 2012)

### **III.5.4. Propriétés de l'alginate**

#### **III.5.4.1. Propriétés physicochimiques**

Suivant les algues dont les alginates sont extraits, ils peuvent avoir des structures différentes, en termes de longueur de bloc (Acarturk 1999), de ratio de nombre de monomère M/G (Iwata et al. 1994), etc. Les conditions d'extraction (température, temps, etc.) influencent aussi la structure de l'alginate. Par exemple, l'extraction sous haute température ou sur de longues durées casse des chaînes macromoléculaires, ce qui réduit la masse moléculaire et la viscosité. Ces deux paramètres sont importants pour la formation de l'hydrogel :

- Plus l'alginate est visqueux, plus il est difficile de le manipuler. De plus, lors d'application biologique, une solution très visqueuse d'alginate risque d'endommager des cellules dû à la force de cisaillement importante (Lee and Mooney 2012).
- Plus la masse moléculaire est élevée, plus l'hydrogel produit aura des propriétés mécaniques performantes. La masse moléculaire de l'alginate de sodium commercial varie de 32 000 à 400 000 g/mol.

#### **III.5.4.2. Gélification de l'alginate**

La gélification de l'alginate, permettant d'obtenir l'hydrogel d'alginate, est simple à réaliser sous conditions douces. C'est une des raisons pour lesquelles l'hydrogel d'alginate est fréquemment utilisé en recherche. La gélification peut être réalisée par réticulation covalente (chimique) ou réticulation ionique (physique). Cette dernière est souvent utilisée, car elle est simple à effectuer et le matériau nécessaire est facilement accessible. Cependant, la réticulation covalente permet d'obtenir un hydrogel plus stable et résistant.

##### **a) Réticulation covalente d'alginate**

###### **- Mécanisme de gélification**

La réticulation covalente d'alginate peut être effectuée à l'aide de plusieurs molécules, dont le dihydrazide d'acide adipique (AAD). Comme indiqué dans la Figure 20, après être activés par l'ajout du 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC) en milieu acide, les groupements carboxyliques (-COOH) d'alginate sont condensés avec les groupements amines primaires (-NH<sub>2</sub>) d'AAD. Les chaînes macromoléculaires d'alginate sont désormais liées à travers des liaisons covalentes avec AAD.

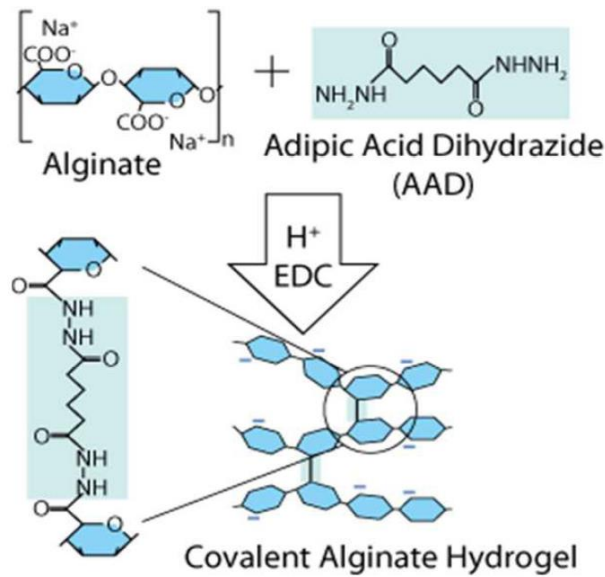


Figure 20. Schéma du mécanisme de la réticulation covalente d'alginate avec le dihydrazide d'acide adipique (AAD) (Braschler, Wu, and Wildhaber 2015)

### - Propriétés mécaniques de l'hydrogel

Les propriétés mécaniques de l'hydrogel de l'alginate réticulé de façon covalente dépendent des molécules de réticulation, de la densité de réticulation, etc. De plus, la réticulation covalente cause souvent la perte de l'hydrophilicité de l'alginate, car les groupements carboxyliques ( $-\text{COOH}$ ) sont occupés. Donc, la capacité de gonflement de l'hydrogel est diminuée (Lee et al. 2000). Les molécules avec les groupements hydrophiles supplémentaires peuvent compenser cet effet.

Comme la réticulation covalente donne les liaisons plus fortes, les propriétés mécaniques sont plus performantes que dans le cas de la réticulation ionique. Cependant, les agents de réticulation covalente sont souvent toxiques, comme le glutaraldéhyde (Agüero et al. 2017), ce qui limite l'application de l'hydrogel dans le domaine biologique. C'est pour cela que pour la gélification de l'alginate, la réticulation ionique est la plus utilisée.

## b) Réticulation ionique d'alginate

### - Mécanisme de gélification

La méthode la plus simple pour gélifier l'alginate est la réticulation ionique avec des cations multivalents. La gélification peut être réalisée à la température ambiante ou jusqu'à  $100^\circ\text{C}$  (McHugh 1987). Le réseau formé est issu de l'interaction entre les groupes carbonyles de  $\alpha$ -L-gulonate (G) et les cations. Comme la structure spatiale des blocs G est favorable pour la chélation (Gacesa 1988) (Figure 21 (a)), il n'y a que les blocs G qui participent à la réticulation ionique (Lee and Mooney 2012). Le « modèle de boîte à œufs » (« egg-box model ») a été proposé pour décrire le mécanisme de la réticulation ionique d'alginate (Grant et al. 1973) (Figure 21 (b)).

Entre deux ou plusieurs chaînes macromoléculaires d'alginate, des blocs G forment des sites ondulés, comme une boîte à œufs avec des interstices, dans lesquels des cations ( $\text{Ca}^{2+}$  par exemple) peuvent s'intégrer. Les liaisons ioniques entre les blocs et les cations permettent alors de lier les chaînes macromoléculaires d'alginate, conduisant à la gélification et formant un hydrogel.

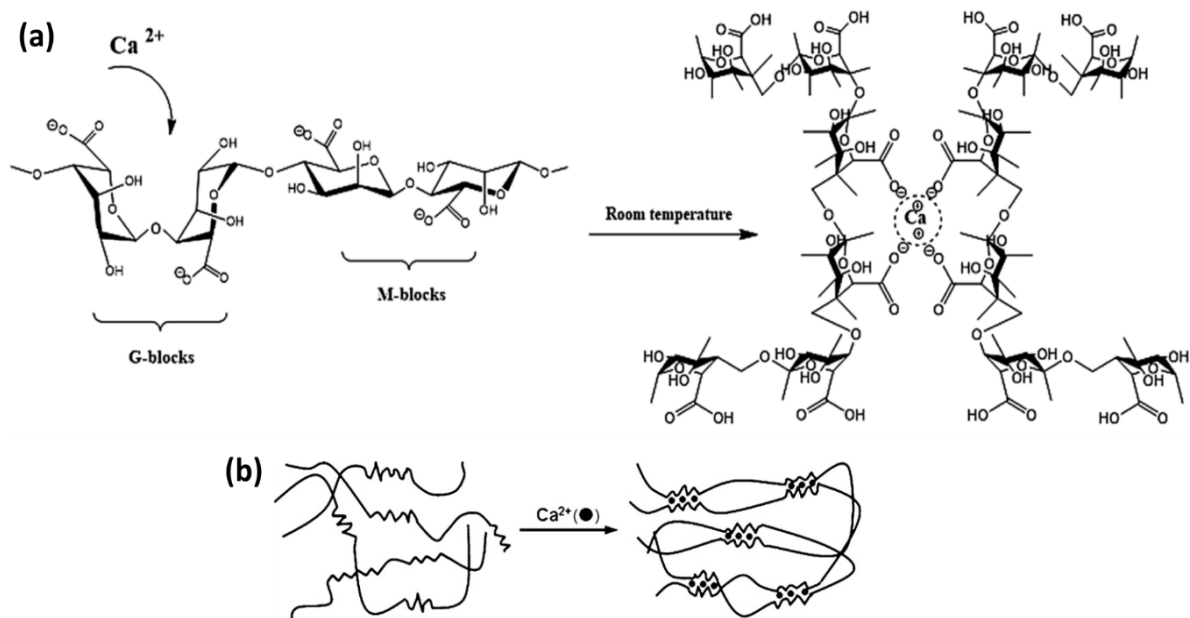


Figure 21. Schéma du (a) mécanisme de la chélation entre les blocs G et  $\text{Ca}^{2+}$  (Agüero et al. 2017) et (b) modèle « boîte à œufs » de la réticulation ionique d'alginate en prenant  $\text{Ca}^{2+}$  comme exemple de cation multivalent (Lee and Mooney 2012).

### - Propriétés mécaniques de l'hydrogel

Les propriétés mécaniques augmentent avec la longueur du bloc G, la masse moléculaire (Lee and Mooney 2012) et la concentration de cation (Lee et al. 2000). Même si les cations trivalents forment les liaisons ioniques plus fortes que les cations divalents, les cations divalents sont les plus étudiés dans la littérature. Parmi eux, la force d'interaction avec les blocs G suit l'ordre :  $\text{Pb}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Ca}^{2+}$  (Mørch, Donati, and Strand 2006). En réalité,  $\text{Ca}^{2+}$  est le plus utilisé, car il n'est pas toxique, et la force d'interaction dans le réseau de l'hydrogel d'alginate de calcium (Ca-alginate) est suffisante pour les applications usuelles. Parfois,  $\text{Ba}^{2+}$  et  $\text{Sr}^{2+}$  sont aussi utilisés pour gélifier l'alginate, alors que  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Cd}^{2+}$  sont les moins utilisés à cause de leur toxicité (Agüero et al. 2017).

Pour conclure, dû à sa facilité de gélification, sa flexibilité de structure, sa possibilité d'atteindre des propriétés mécaniques proches des GRs et sa disponibilité, j'ai choisi **l'hydrogel d'alginate** comme matériau principal dans mon étude. Je décris donc dans le Chapitre IV la préparation de microparticules à partir d'hydrogel d'alginate et pour cela, j'ai choisi la **microfluidique à base de gouttes**, dont j'ai présenté les avantages dans le Chapitre II.

## Chapitre IV. Préparation de microparticules d'hydrogel d'alginate en microfluidique à base de gouttes

Pour la préparation de microparticules de l'hydrogel d'alginate, une fois les gouttes d'alginate générées en microfluidique dans une phase continue d'huile, elles vont être transformées en microparticules par gélification et nous avons choisi la méthode de réticulation ionique. L'ajout de cations peut alors se faire en le mélangeant à l'alginate dans la goutte (**gélification ionique interne**) ou par diffusion à travers la surface de la goutte (**gélification ionique externe**). Dans les deux types de gélification, on peut également rajouter une étape de diffusion du solvant.

### IV.1. Gélification ionique interne

Dans la gélification ionique interne, le cation divalent  $X^{2+}$  est mélangé à l'intérieur des gouttes d'alginate. Ce cation est introduit en solution sous la forme **active**  $X^{2+}$  ou sous la forme **inactive**  $X^{2+}Y^{2-}$  qui a besoin d'une modification de pH dans la goutte pour libérer le cation  $X^{2+}$ .

#### IV.1.1. Forme active du cation $X^{2+}$

##### IV.1.1.1. Mélange avant la génération des gouttes

La méthode la plus directe pour mélanger l'alginate et le cation consiste à émulsifier un fluide de gel d'alginate contenant les deux éléments dans une huile. Trivedi et al. font l'expérience dans des capillaires de Téflon (Figure 22 (a)). Le fluide d'alginate rencontre le fluide de  $BaCl_2$  par une jonction en Y puis les deux fluides se mélangent. L'huile est ensuite injectée par « flow-focusing » (jonction en croix) afin de générer des gouttes. Cependant, comme l'alginate réagit avec le cation  $Ba^{2+}$ , la gélification débute, ce qui rend le mélange visqueux. Ainsi un jet de gel apparaît dès la sortie de la jonction en croix (Figure 22 (b)) et il est difficile de générer des gouttes.

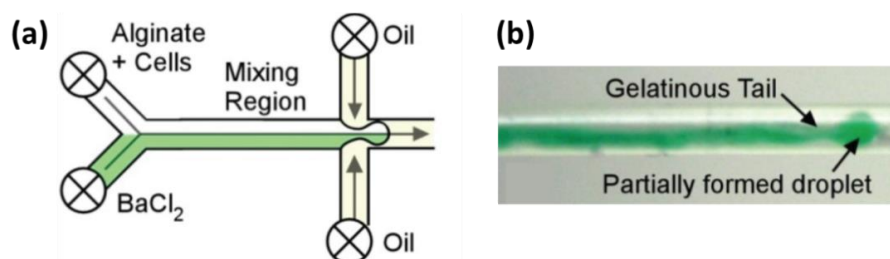


Figure 22. (a) Montage pour le mélange de l'alginate et du cation  $Ba^{2+}$  avant la génération de gouttes. (b) Image du gel formé dans l'huile après la jonction en croix. (Trivedi et al. 2010)

Pour améliorer cette situation, Zhang et al. réduisent la zone de mélange de l'alginate et utilise le cation  $Ca^{2+}$  du  $CaCl_2$ . Les gouttes sont générées par « flow-focusing » directement à l'endroit où le fluide d'alginate et celui de  $CaCl_2$  se rencontrent (Figure 23). Néanmoins, les débits d'huile ne permettent pas toujours de générer des gouttes. Le mélange reste sous la forme d'un jet de gel avec des nœuds de différentes tailles. Cela signifie que, même si les

fluides utilisés sont de faible concentration, la viscosité augmente instantanément au moment du mélange et perturbe la formation des gouttes.

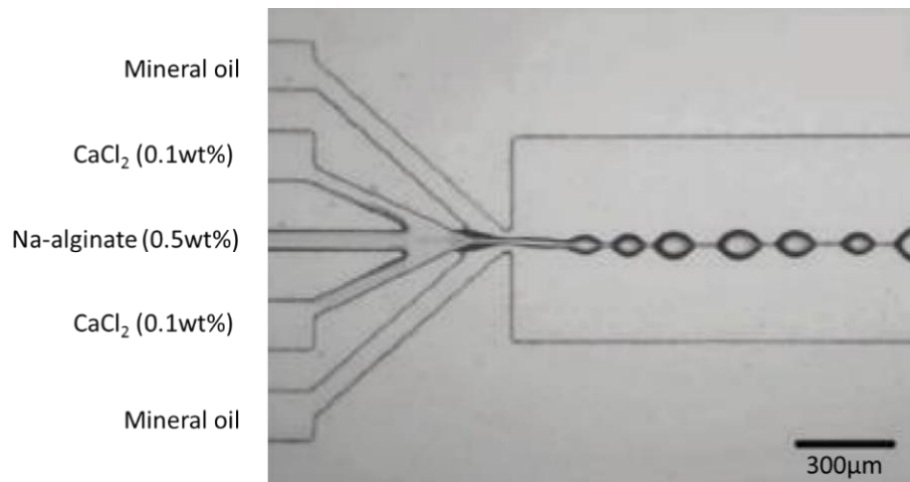


Figure 23. Génération de gouttes d'un mélange d'alginate et de CaCl<sub>2</sub> au milieu d'une huile minérale dans une puce microfluidique en PDMS (Zhang et al. 2006)

Ces travaux montrent que la gélification gêne la génération des gouttes. Il faut donc débiter la gélification après la génération des gouttes.

#### IV.1.1.2. Mélange après la génération de gouttes

Pour mélanger l'alginate et le cation après la génération des gouttes, Xu et al. ajoutent une entrée supplémentaire d'eau au moment du mélange, jouant le rôle de tampon entre les 2 solutions d'alginate et de cation, ce qui permet d'éviter le contact direct entre alginate et Ca<sup>2+</sup> dans le canal (Figure 24 (a)). Ce fluide est ensuite « pincé » par deux flux d'octanol par « flow-focusing », générant des gouttes d'alginate de calcium (Ca-alginate). Dans le canal en forme de serpent qui suit, la gélification a lieu transformant les gouttes en microparticules qui sont monodisperses (Figure 24 (b)).

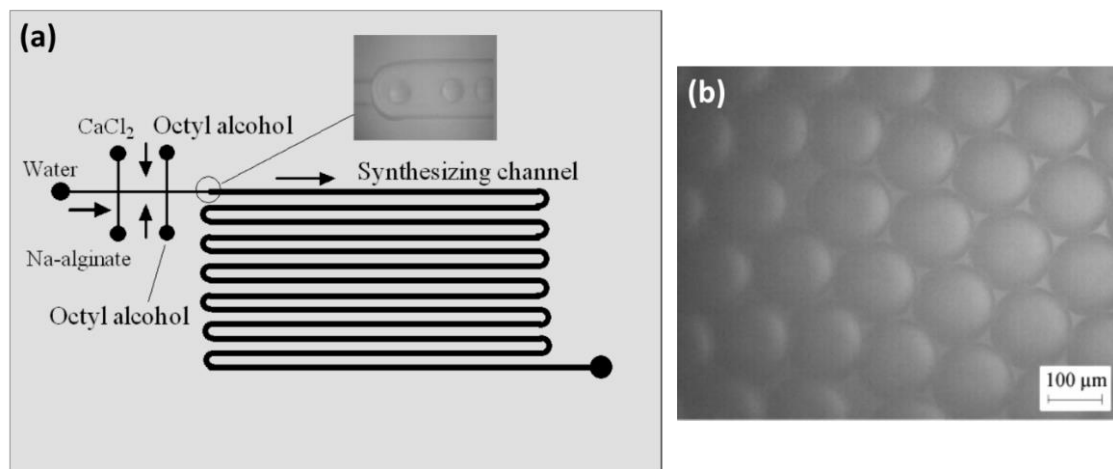


Figure 24. (a) Montage pour le mélange de l'alginate et du cation Ca<sup>2+</sup> dans une puce en polyméthacrylate de méthyle (PMMA). (b) Image au microscope optique de microparticules de Ca-alginate. (Xu et al. 2008)

Une autre méthode consiste à faire fusionner une goutte d'alginate et une goutte de  $\text{CaCl}_2$  (Liu et al. 2006). Dans une puce en PDMS (Figure 25 (a)), les gouttes d'alginate (Figure 25 (b)) et celles de  $\text{CaCl}_2$  (Figure 25 (c)) sont générées séparément dans de l'huile de soja par « flow-focusing ». Elles se rejoignent dans une jonction en T et deux chambres circulaires successives (Figure 25 (d, e)) permettent de les fusionner. Puis les gouttes du mélange gélifient dans le canal. En variant les débits et la géométrie des canaux, des microparticules de gel de différentes formes et tailles sont obtenues (Figure 25 (f)). Cependant, afin de garantir l'homogénéité de la composition des microparticules, la fusion des gouttes doit être effectuée de manière reproductible, ce qui demande beaucoup d'essais. Cette méthode est donc relativement compliquée à mettre en œuvre.

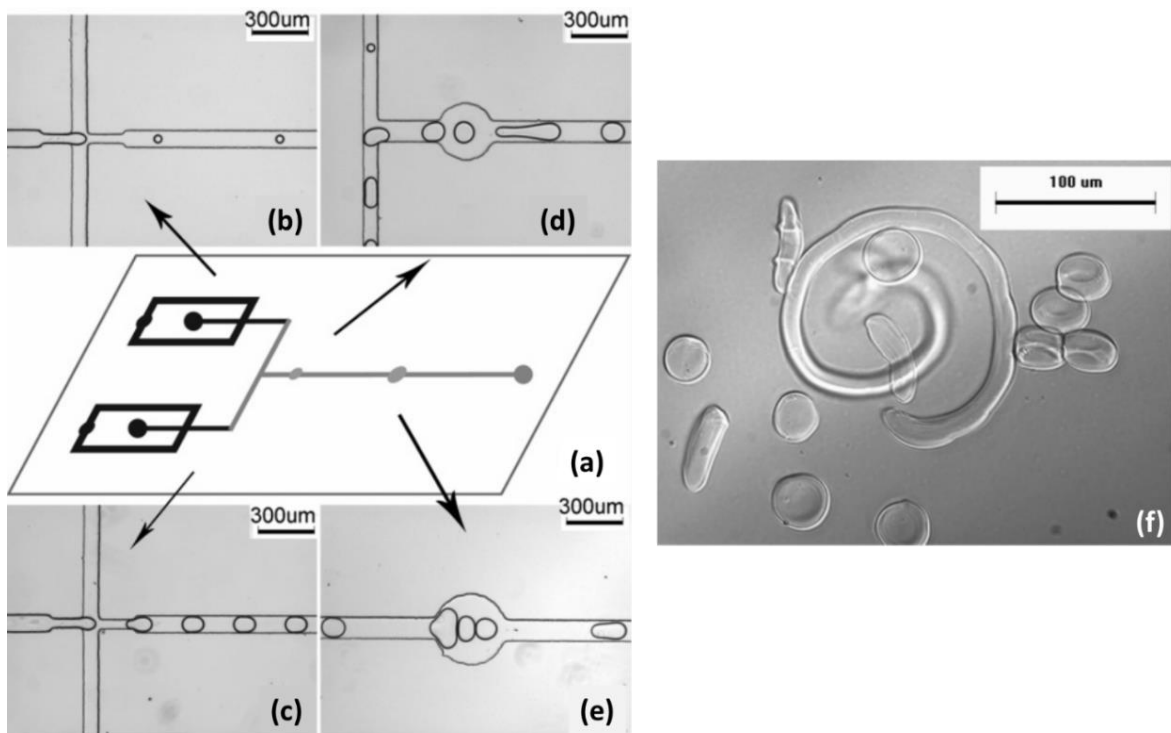


Figure 25. (a) Montage pour la génération de gouttes (b) d'alginate et (c) de  $\text{Ca}^{2+}$  dans une puce microfluidique en PDMS ; (d) et (e) mélange dans les deux chambres circulaires successives pour la fusion de gouttes ; (f) microparticules de Ca-alginate de différentes formes. (Liu et al. 2006)

Une méthode alternative de fusion consiste à faire rencontrer les gouttes d'alginate avec un flux de cation. La Figure 26 montre le montage pour envoyer un flux de solution aqueuse de  $\text{BaCl}_2$  dans des gouttes aqueuses d'alginate générées par « flow-focusing » en amont (Figure 26 (a)) (Trivedi et al. 2010). Comme l'énergie interfaciale entre l'huile et les phases aqueuses est importante, à chaque passage de gouttes, le flux de solution de  $\text{BaCl}_2$  préférera fusionner avec la goutte d'alginate. L'efficacité de la fusion est validée à l'aide d'un colorant (Figure 26 (b)).



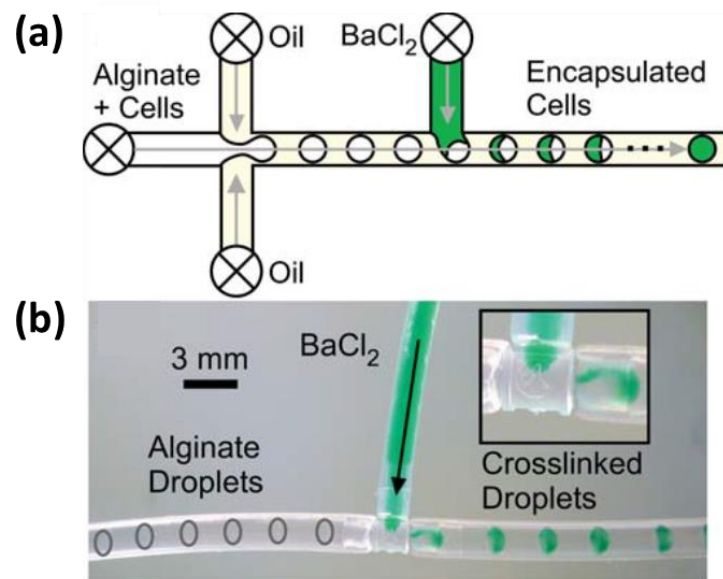


Figure 26. (a) Montage pour la génération de gouttes d'alginate dans de l'huile de silicone en utilisant des capillaires en Téflon. (b) Un flux de  $BaCl_2$  dans une jonction en T (Trivedi et al. 2010)

Le risque de cette méthode est la génération de gouttes de  $BaCl_2$  entre les gouttes d'alginate (Trivedi et al. 2010). C'est le cas lorsque l'huile est peu visqueuse ou lorsque l'énergie interfaciale entre l'huile et les phases aqueuses est faible.

Pour chaque méthode présentée, les gouttes du mélange (alginate + cation) gélifient rapidement, avant que la diffusion de cation soit homogène dans les microparticules (Utech et al. 2015). Ainsi la structure interne des microparticules ne doit pas être homogène. Pour ralentir la gélification, il faut que le cation soit libéré lentement dans les gouttes du mélange.

#### IV.1.2. Forme inactive du cation dans l'élément $X^{2+}Y^{2-}$

Zhang et al. utilisent du carbonate de calcium ( $CaCO_3$ ) dont le cation  $Ca^{2+}$  est libéré seulement en présence d'un pH acide (Figure 27 (a)) (Zhang et al. 2007). Ils dispersent du  $CaCO_3$  dans la solution d'alginate. Ce mélange aqueux est émulsifié par de l'huile de soja par « flow-focusing », donnant des gouttes d'alginate/ $CaCO_3$  (Figure 27 (b)). Comme l'huile contient de l'acide acétique, le pH diminue et les cations  $Ca^{2+}$  sont libérés du  $CaCO_3$ , déclenchant la gélification de l'alginate. Les microparticules de gel sont alors formées et collectées dans l'huile (Figure 27 (c)).

Cependant, ils observent que les microparticules se dissolvent dans l'eau. De plus les modules de Young mesurés sont faibles ( $E=3,9\pm 0,19kPa$ ). Ceci est dû à une gélification insuffisante dans le canal microfluidique. La gélification peut être renforcée en ajoutant du  $CaCO_3$ . Mais l'ajout de  $CaCO_3$  risque de produire des agrégats, ce qui cause des problèmes de colmatage du canal.

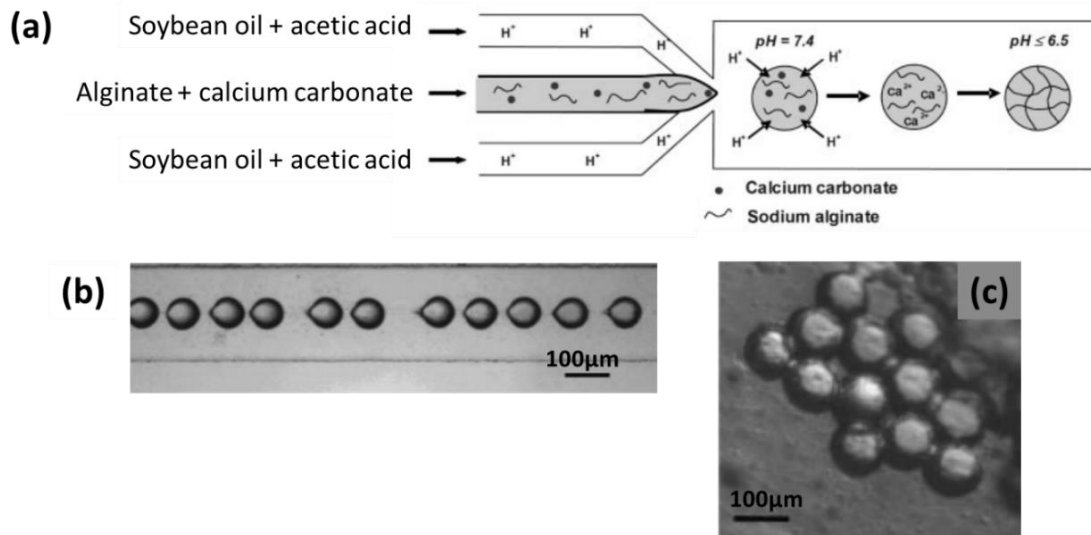


Figure 27. (a) Montage pour la génération de gouttes d'alginate avec du  $\text{CaCO}_3$  dans une huile de soja contenant de l'acide acétique. Image au microscope optique de (b) la génération de gouttes dans le canal et (c) des microparticules collectées dans l'huile. (Zhang et al. 2007)

Le même principe est appliqué à la préparation de microparticules encapsulant des cellules (Akbari and Pirbodaghi 2014). Puisque le contact mécanique avec  $\text{CaCO}_3$  réduit la viabilité cellulaire, dans la puce microfluidique (Figure 28 (a)), le fluide de cellules coule en coaxial avec celui de  $\text{CaCO}_3$  afin de limiter le temps de contact entre les cellules et le  $\text{CaCO}_3$  (Figure 28 (b)). L'huile de fluorocarbure contenant du tensioactif est ensuite ajoutée par « flow-focusing » pour générer des gouttes. Après la collection, l'acide acétique est ajouté pour réaliser la gélification « off-chip » (Figure 28 (c)). Dans ce cas-là, des agrégats de  $\text{CaCO}_3$  sont présents de manière non homogène dans le canal. Par conséquent, la quantité de calcium varie pour chaque microparticule, ce qui cause l'inhomogénéité en termes de la composition.

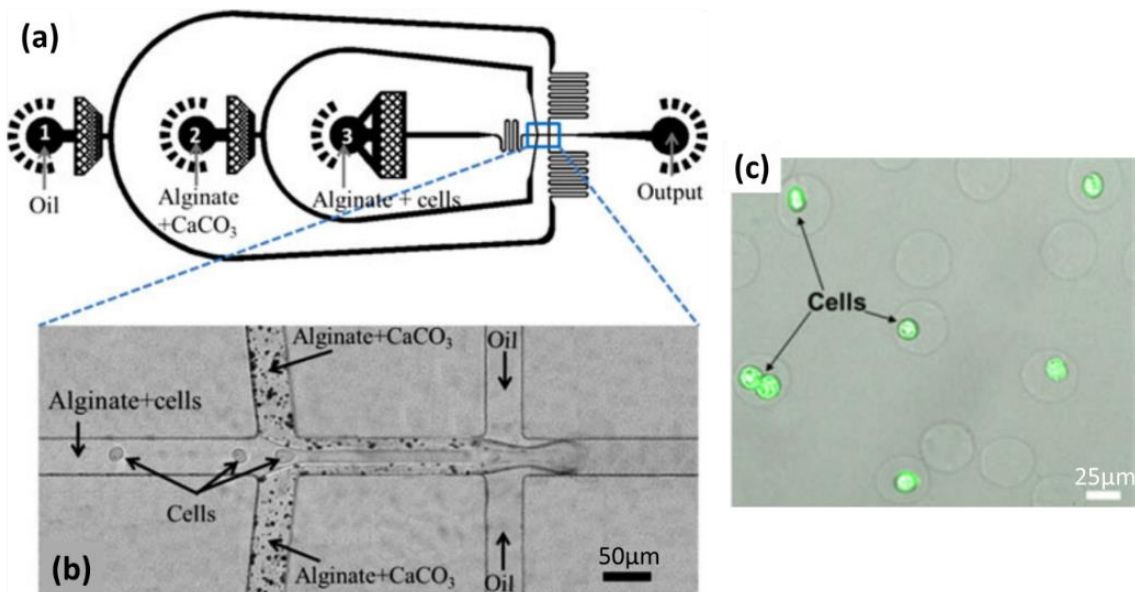


Figure 28. (a) Schéma de la puce microfluidique de PDMS pour la génération de gouttes d'alginate encapsulant les cellules. (b) Image microscopique de 2 jonctions dans la puce. (c) Microparticules de Ca-alginate avec les cellules encapsulées. (Akbari and Pirbodaghi 2014)

Afin de régler ce problème, Utech et al utilisent le Ca-EDTA, complexe de  $\text{Ca}^{2+}$  de l'EDTA (éthylènediaminetétraacétique) qui est soluble dans l'eau (solubilité relativement faible) comme source de  $\text{Ca}^{2+}$ . En pratique, le Ca-EDTA est d'abord dissous dans une solution d'alginate marqué par de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), pour être visualisé en microscopie de fluorescence. Ensuite, dans un dispositif microfluidique (Figure 29 (a)), les gouttes d'alginate/Ca-EDTA sont générées dans l'huile fluorée de carbone qui contient du tensioactif, par « flow-focusing » (Figure 29 (b)). L'acide acétique ajouté dans l'huile libère le  $\text{Ca}^{2+}$  du Ca-EDTA (Figure 29 (c)), conduisant à la gélification (Figure 29 (d)). Grâce à la solubilité de Ca-EDTA, la distribution de calcium est homogène dans les gouttes. Cela garantit l'uniformité de la composition ainsi que la structure interne (Figure 29 (e)).

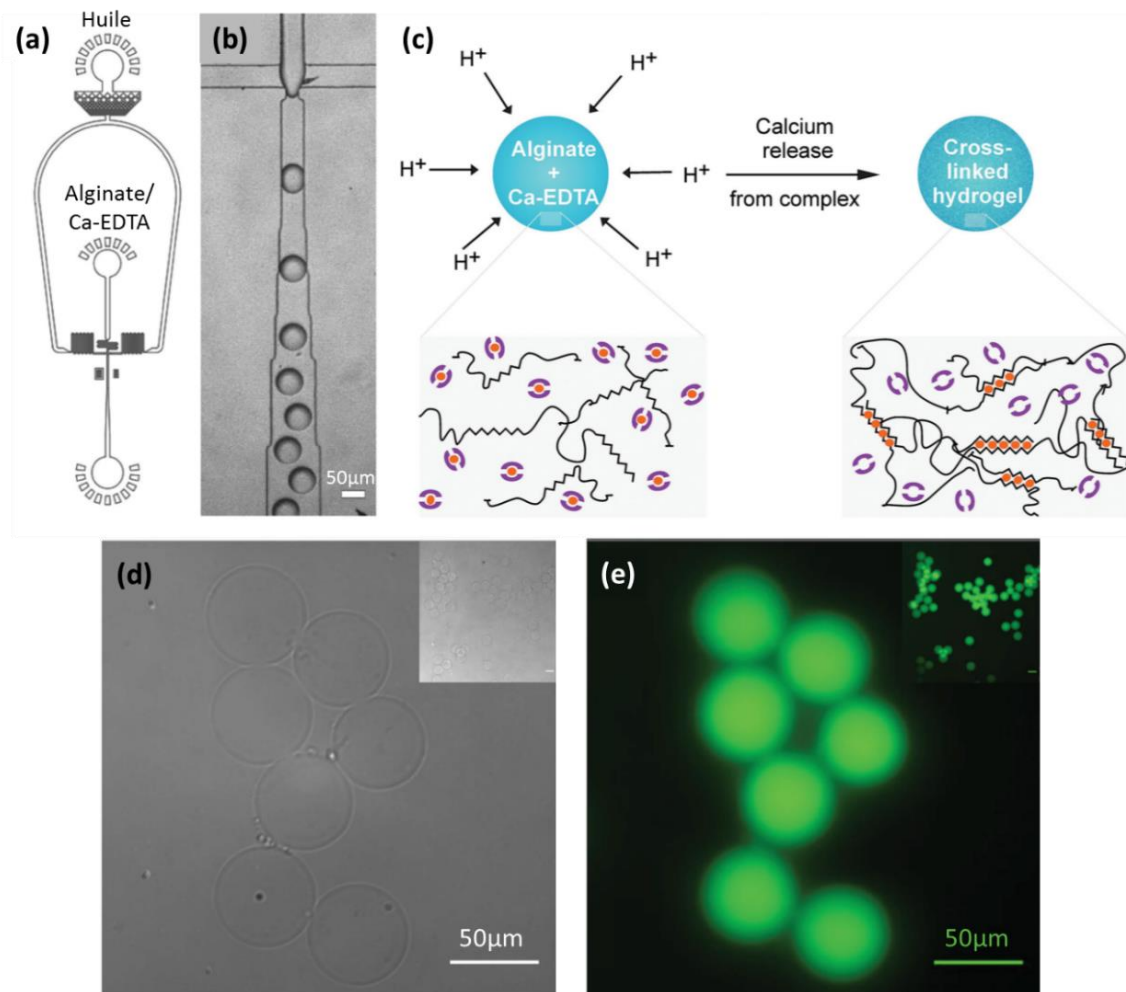


Figure 29. (a) Schéma du dispositif microfluidique pour la génération de gouttes (b) d'alginate/Ca-EDTA dans l'huile fluorée de carbone. (c) Illustration de la gélification grâce au changement de pH. (d) Image microscopique de microparticules de Ca-alginate. (e) Image fluorescente montrant la structure interne homogène des microparticules. (Utech et al. 2015)

Néanmoins, cette méthode est limitée par la solubilité de l'EDTA qui est quand même assez faible. De ce fait, la quantité de calcium dans les microparticules est toujours limitée, ce qui influence leurs propriétés mécaniques. Par ailleurs, après la gélification, une étape supplémentaire est nécessaire pour enlever l'EDTA.

Pour résumer, en gélification ionique interne, les propriétés des microparticules, comme l'homogénéité et les propriétés mécaniques, sont déterminées par les étapes de génération des gouttes. Pour la génération des gouttes de « alginate +  $X^{2+}$  », à cause de la gélification rapide, il est difficile de garantir la distribution homogène de  $X^{2+}$  et donc l'homogénéité du gel. Pour la génération des gouttes de « alginate + XY », qui permet d'obtenir des microparticules homogènes, un compromis est fait sur les propriétés mécaniques qui sont limitées à cause de la faible solubilité aqueuse de XY. Cette partie montre aussi un résultat intéressant pour la suite : on peut contrôler les propriétés mécaniques des microparticules d'alginate en contrôlant la concentration en cation.

## IV.2. Gélification ionique externe

Dans la gélification ionique externe, le cation divalent  $X^{2+}$  est introduit dans le solvant dans lequel les gouttes se trouvent lors de la génération ou lors de la collecte.

### IV.2.1. Cation $X^{2+}$ introduit lors de la génération des gouttes

Lors de la génération, les cations  $X^{2+}$  se trouvent dans l'huile et la gélification est réalisée par la diffusion des cations à l'intérieur des gouttes.

Zhang et al. utilisent le dispositif décrit pour la gélification interne dans la Figure 27 pour réaliser la gélification externe, avec un flux d'alginate et un flux d'huile de soja contenant de l'acétate de calcium (huile/ $Ca(CH_3COO)_2$ ) (Figure 30 (a)). Après la génération des gouttes d'alginate par « flow-focusing », les cations  $Ca^{2+}$  migrent de l'huile vers l'intérieur des gouttes et la gélification se fait le long du canal (Figure 30 (b)). Les auteurs remarquent que les microparticules qui sont collectées dans l'huile de soja (Figure 30 (c)) ont un module de Young plus élevé que celles obtenues par la gélification interne (Zhang et al. 2007).

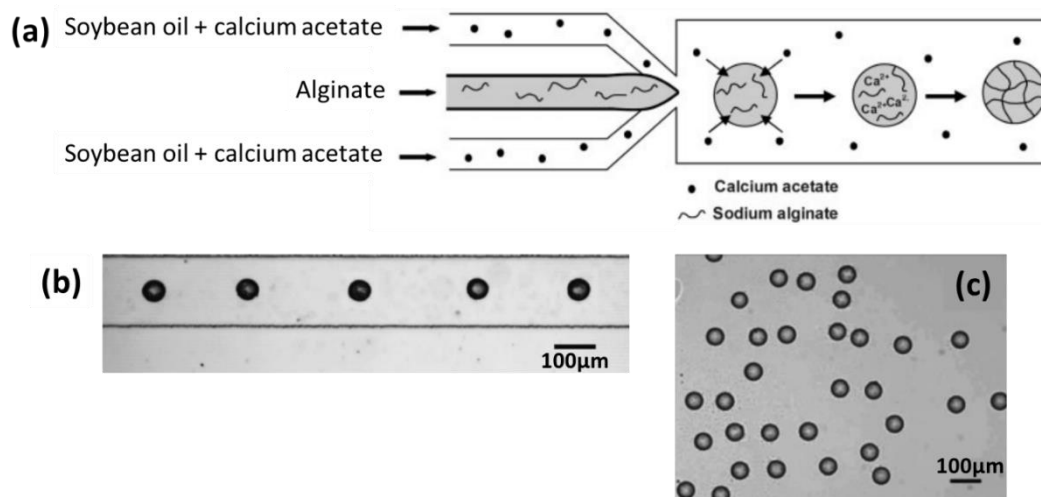


Figure 30. Gélification de gouttes d'alginate dans de l'huile de soja contenant de l'acétate de calcium : (a) schéma de la génération des gouttes d'alginate dans un flux d'huile de soja contenant de l'acétate de calcium ; Image au microscope optique (b) des gouttes au cours de la gélification dans le canal et (c) des microparticules collectées dans l'huile de soja. (Zhang et al. 2007)

#### IV.2.1. Cation $X^{2+}$ introduit lors de la collecte des gouttes

La gélification des microparticules faiblement gélifiées dans le dispositif microfluidique (« on-chip ») est aussi renforcée en les transférant dans une solution concentrée de sel de calcium, avec du  $\text{CaCl}_2$  par exemple (Zhang et al. 2007). Cette gélification se fait alors « off-chip », ce qui évite les risques de colmatage ou de collage à la paroi du canal, et donc de perturbation de l'écoulement (Utech et al. 2015).

Cette idée est appliquée par Hu et al. pour étudier la forme de microparticules en fonction des conditions de gélification. Les gouttes d'alginate sont générées dans du décanol par « flow-focusing » en utilisant des capillaires en verre (Figure 31 (A)). Puis elles sont envoyées dans un bain de gélification biphasique : une première phase de décanol avec du  $\text{CaCl}_2$  dissous se trouve au-dessus d'une seconde phase aqueuse d'acétate de baryum ( $\text{Ba}(\text{Ac})_2$ ). Les gouttes traversent d'abord la phase de  $\text{CaCl}_2$ /décanol, ce qui permet de pré-gélifier les gouttes d'alginate. Puis elles traversent la phase de  $(\text{Ba}(\text{Ac})_2)$  qui permet de renforcer la gélification.

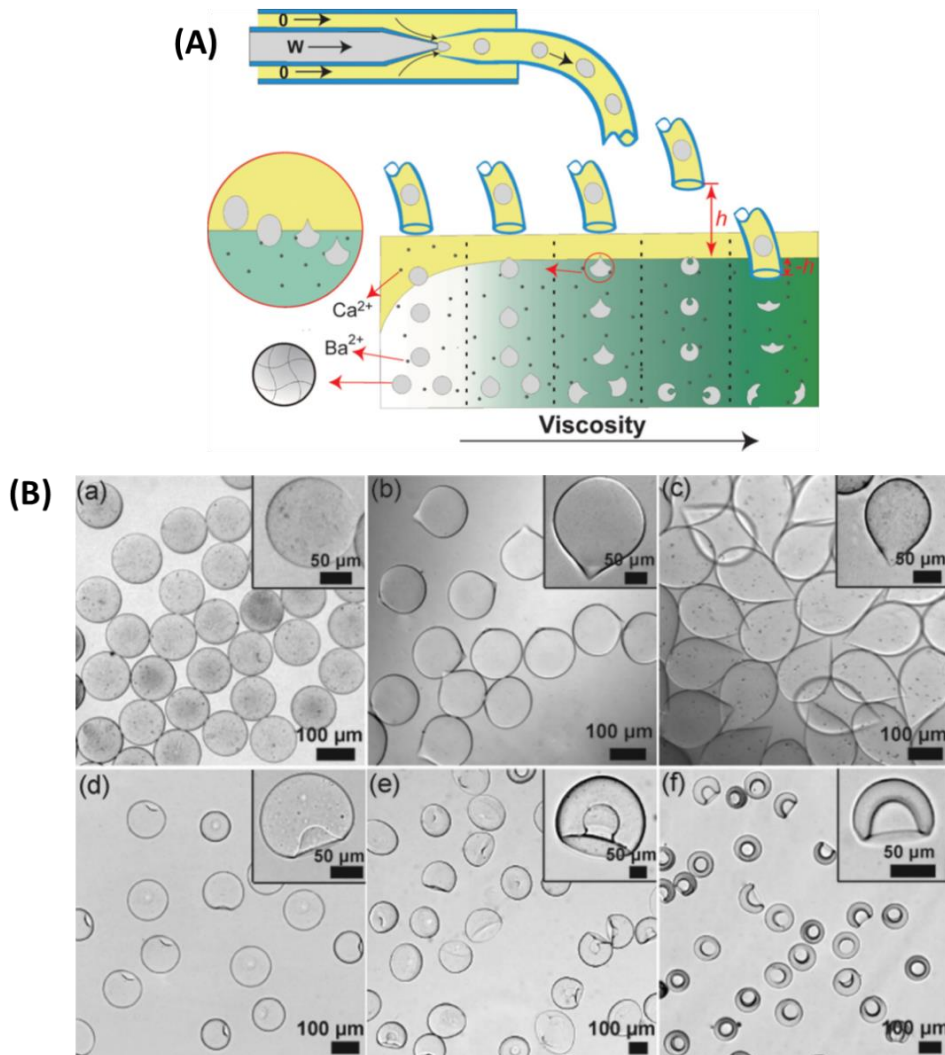


Figure 31. Méthode de collecte des microparticules dans un bain biphasique : (A) Schéma de la préparation des microparticules avec différentes formes en variant les conditions de gélification ; (B) Images au microscope optique des microparticules obtenues. (Hu et al. 2012)

Des microparticules avec des formes différentes sont obtenues (Figure 31 (B)) en variant les paramètres de gélification : la hauteur (h) entre le bout du capillaire et la première phase, l'énergie interfaciale entre la goutte et la phase de décanol et la viscosité de la phase aqueuse. Selon les auteurs, la forme dépend des forces auxquelles les gouttes sont soumises lorsqu'elles traversent l'interface dans le bain. La force due à l'énergie interfaciale permet de maintenir la forme sphérique des gouttes, alors que la force visqueuse produit une déformation. La forme finale résulte de la compétition entre ces deux forces.

Dans les travaux présentés ci-dessus, la phase continue de décanol étant immiscible avec la phase dispersée qui est aqueuse, il est facile de générer des gouttes. Cependant, leur taille n'est contrôlée que par la dimension des canaux et les débits. Pour mimer les GRs, les microparticules doivent être de diamètre inférieur à 10 $\mu$ m. Il faut alors utiliser des canaux très fins et/ou des débits très élevés de la phase continue. Due à la viscosité assez importante de la solution d'alginate, la résistance hydraulique est alors élevée dans les canaux, ce qui oblige à appliquer des pressions importantes pour générer les gouttes, provoquant des fuites (Akbari and Pirbodaghi 2014) (Utech et al. 2015). Afin d'éviter ces problèmes de fuites, la réduction de taille des gouttes doit se faire dans le capillaire juste après leur génération, par exemple par diffusion du solvant.

### **IV.3. Intégration de la diffusion de solvant**

Pour permettre la diffusion du solvant des gouttes dans la phase continue, celle-ci est choisie partiellement miscible avec l'eau. L'eau des gouttes est absorbée petit à petit par la phase continue, ce qui cause la contraction en taille des gouttes ainsi que l'augmentation de leur concentration en alginate. Cette technique présente deux avantages : 1) Afin de produire les microparticules extrêmement petites, on évite d'utiliser des canaux très fins avec une pression à appliquer très importante. 2) Même si la solution initiale est peu concentrée en polymère, les microparticules finales peuvent être très concentrées. Cela permet de produire des microparticules aux propriétés mécaniques performantes. Parmi les phases continues que l'on peut choisir pour avoir la diffusion du solvant, je présente les études réalisées avec l'acétate de méthyle et le carbonate de diméthyle.

#### **IV.3.1. Diffusion dans l'acétate de méthyle**

Sugaya et al. utilisent comme phase de collecte l'acétate de méthyle dans lequel la solubilité de l'eau est de 8wt%. Après la génération des gouttes par « flow-focusing » et la diffusion du solvant (Figure 32 (a)), les gouttes plus petites et plus concentrées rencontrent un écoulement parallèle de CaCl<sub>2</sub>. À cause de la diffusion, des cations Ca<sup>2+</sup> arrivent dans les gouttes d'alginate, déclenchant la gélification externe. Finalement des microparticules monodisperses de Ca-alginate inférieures à 20 $\mu$ m sont obtenues (Figure 32 (b)).

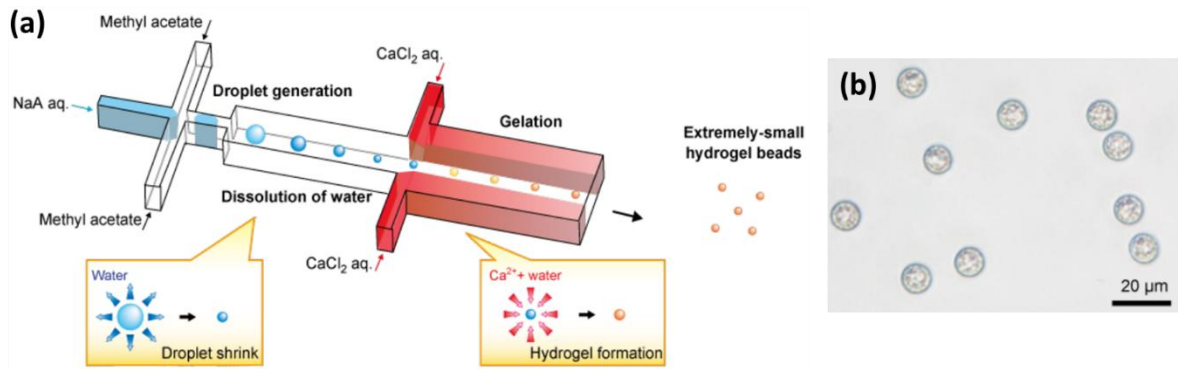


Figure 32. (a) Puce microfluidique en PDMS, dans laquelle se passe la génération de gouttes d'alginate dans un flux d'acétate de méthyl ainsi que leur contraction et leur gélification externe dans un flux de  $\text{CaCl}_2$ . (b) Image au microscope optique de microparticules de Ca-alginate collectées dans l'eau, après lavage. (Sugaya, Yamada, and Seki 2011)

Cependant, au cours de la contraction « on-chip », les particules ont tendance à se rapprocher de la paroi du canal (Figure 33), même si en amont les gouttes sont générées au milieu du flux. Les particules risquent alors de coller sur la paroi, perturbant l'écoulement. Il est donc nécessaire de bien contrôler les paramètres de contraction, comme le temps de séjour, afin de réaliser la diffusion de solvant souhaitée, sans déstabiliser le système.

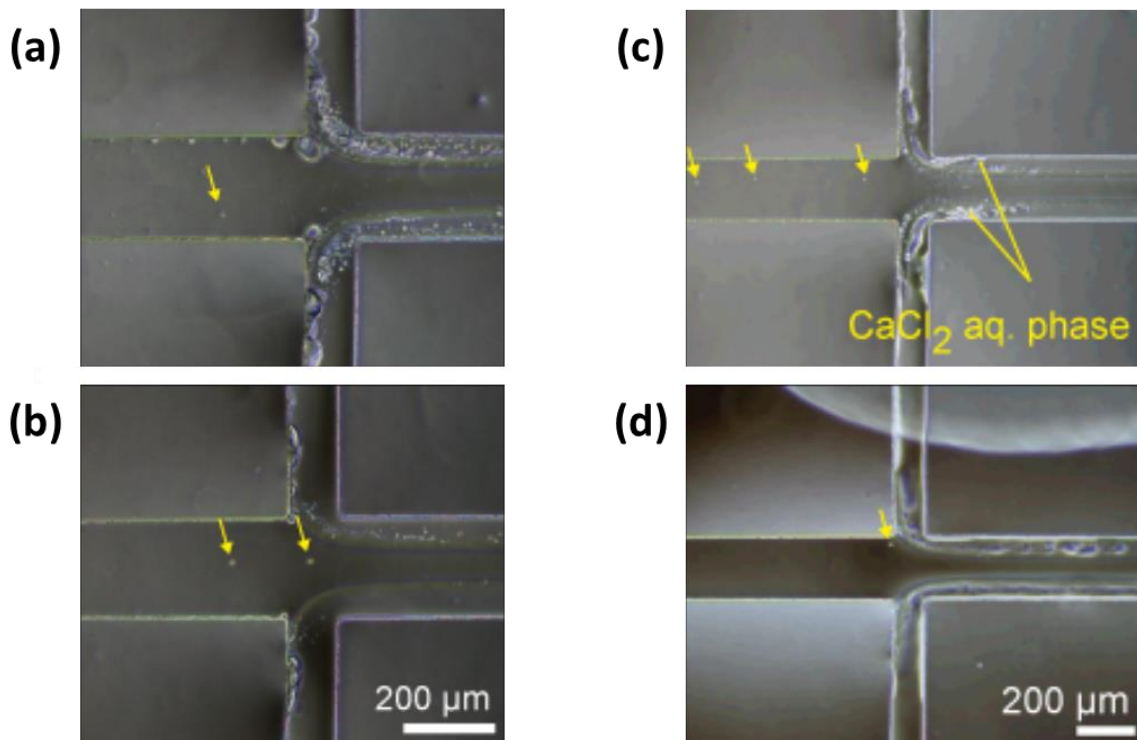


Figure 33. Images au microscope optique de la zone de gélification externe par la diffusion de  $\text{CaCl}_2$ . Comparaison de l'écoulement en appliquant différentes (a, b) concentrations d'alginate et (c, d) débits de l'alginate. Les flèches jaunes montrent les gouttes contractées d'alginate qui se sont collées à la paroi du canal. (Sugaya et al. 2011)

### IV.3.2. Diffusion dans le carbonate de diméthyle

Rondeau et Cooper-White utilisent comme phase continue le carbonate de diméthyle (DMC), dont la solubilité de l'eau est de 3wt%. Un flux d'alginate et un flux de  $\text{CaCl}_2$ , tous les deux peu concentrés, confluent et sont mélangés (Figure 34 (a)). Ce flux de phase aqueuse croise le flux de DMC par « flow-focusing », ce qui permet de former des gouttes de Ca-alginate. Comme expliqué précédemment, dû à la miscibilité partielle, la réduction de la taille des gouttes est observée tout au long du canal. Puis les gouttes sont collectées dans une solution concentrée de  $\text{CaCl}_2$  pour renforcer la gélification (Figure 34 (b)). La taille finale des microparticules est influencée par la diffusion du solvant et donc par les débits et les dimensions du canal (diamètre et longueur). Les auteurs arrivent à produire des microparticules avec un diamètre variant de 1 à 50  $\mu\text{m}$ .

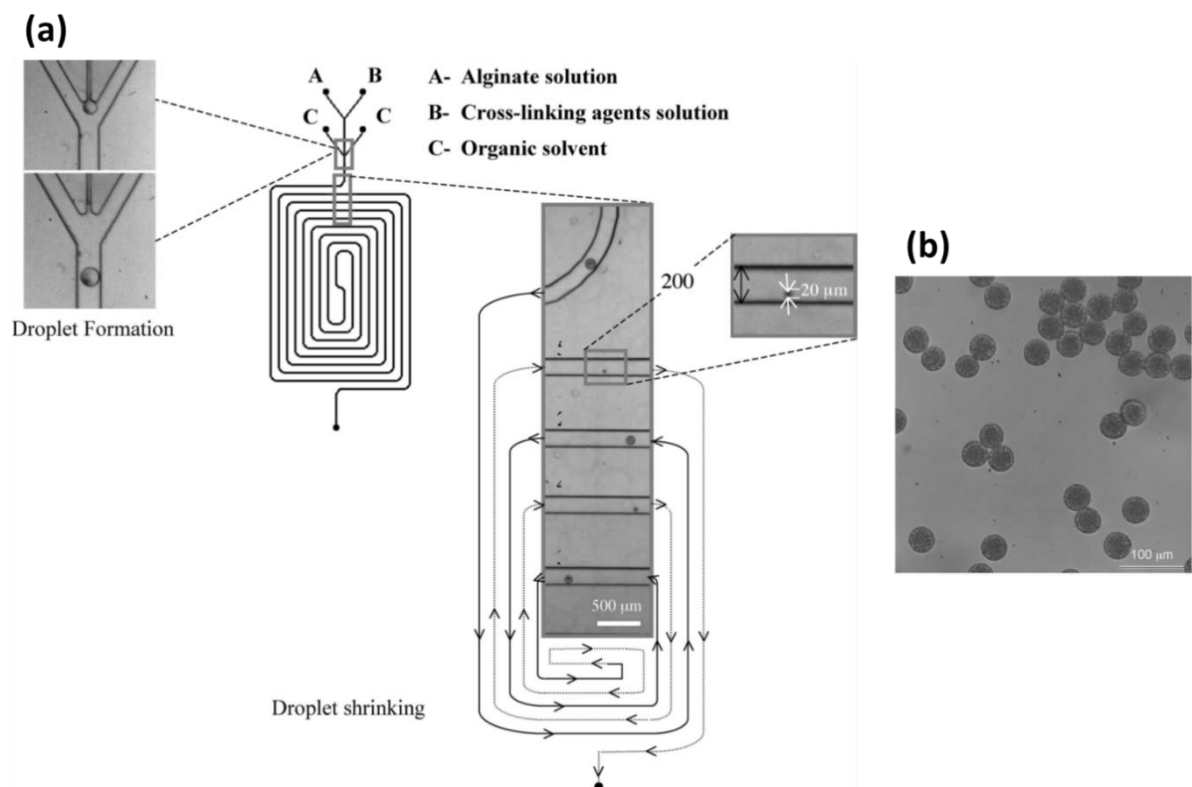


Figure 34. (a) Puce microfluidique en PDMS pour la génération et la contraction de gouttes de Ca-alginate dans du DMC. Les images au microscope optique des gouttes sont capturées à différents endroits tout le long du canal. (b) Image au microscope optique de microparticules de Ca-alginate. (Rondeau and Cooper-White 2008)

D'après cette étude bibliographique, la microfluidique à base de gouttes offre différentes méthodes pour préparer des microparticules de Ca-alginate. Dans ma thèse, j'ai appliqué les méthodes de gélification interne et externe. L'ajout de la diffusion de solvant permet de contracter les gouttes. Cela permet d'atteindre la taille des GRs tout en générant des gouttes facilement observables au microscope optique. Afin d'éviter l'utilisation de tensioactif, j'ai choisi la phase continue dans laquelle la phase dispersée a une faible solubilité, c'est-à-dire le DMC.



## B. Matériels et Méthodes

Durant ma thèse, la préparation des microparticules est principalement effectuée en utilisant le sel d'**alginate**. En parallèle, l'étude de l'**agarose** est aussi démarrée en tant qu'alternative. Les matériaux et les méthodes utilisés pour générer les gouttes et préparer les microparticules, ainsi que les méthodes de caractérisation des gouttes et des microparticules sont décrites dans ce chapitre.

## Chapitre I. Matériels

Je présente d'abord les matériaux chimiques utilisés durant ma thèse. Puis je montre les dispositifs employés pour effectuer les expériences.

### I.1. Matériaux chimiques

Les matériaux chimiques utilisés dans cette thèse concernent les composés et les solvants permettant de préparer les microparticules.

#### I.1.1. Composés chimiques

Les composés chimiques ont tous été dissouts dans l'eau et utilisés sans purification. Nous expliquons le choix de ces molécules et leur propriété.

##### I.1.1.1. Alginate de sodium

Comme expliqué dans la partie « A. Bibliographie » (Chapitre III.1.), l'hydrogel a été choisi comme le matériau de mimes de GRs, car ses propriétés mécaniques sont variables selon le taux de réticulation et/ou la teneur en eau. En réglant les paramètres de préparation, il est donc possible de reproduire des propriétés mécaniques proches de celles de GRs. En particulier, l'hydrogel d'alginate est le matériau principal dans mon étude, dû au fait que la gélification est facile à effectuer, notamment à travers la réticulation ionique par des cations divalents (A.III.5.4.2.). De plus, ce processus n'est pas influencé par la température, ce qui n'oblige pas un contrôle précis de la température d'expérience. Enfin, l'hydrogel d'alginate est aussi thermorésistant, ce qui facilite la conservation malgré des fluctuations de température de stockage.

L'alginate de sodium (Na-alginate) de référence I3G80 a été fourni par *Alliance Gums and Industries*. Sa pureté n'est pas donnée par le fournisseur. La solution de Na-alginate est préparée dans l'eau à température ambiante en utilisant un agitateur magnétique.

##### I.1.1.2. Chlorure de calcium

Parmi les cations divalents utilisés pour gélifier le Na-alginate, on a choisi le  $\text{Ca}^{2+}$  car on l'utilise sous la forme du chlorure de calcium ( $\text{CaCl}_2$ ), qui n'est pas toxique. Pendant la gélification,  $\text{Ca}^{2+}$  remplacent les cations  $\text{Na}^+$  du Na-alginate en formant des liaisons ioniques avec des chaînes d'alginate (A.III.5.4.2.). Cette réaction est simple et rapide à réaliser. Au final, on obtient de l'alginate de calcium (Ca-alginate) qui est un hydrogel d'alginate.

Le chlorure de calcium dihydraté ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) de référence 22 317.297 *Prolabo* de pureté  $\geq 98\%$  a été utilisé. La solution de  $\text{CaCl}_2$  est préparée dans l'eau à température ambiante en utilisant un agitateur magnétique.

### I.1.1.3. Agarose

L'hydrogel d'agarose est aussi utilisé en tant que matériau alternatif à l'hydrogel d'alginate. Contrairement à l'alginate, le réseau d'agarose est formé par des liaisons hydrogène. Par ailleurs, la gélification de l'agarose dépend de la température, ce qui nécessite un contrôle précis de ce paramètre (A.III.3.2.1.). Un système thermostaté (B.I.2.4.) a donc été conçu pour les expériences relatives à l'agarose.

L'agarose de référence A2929-25G a été fourni par *Sigma-Aldrich* avec une pureté de >90%. La solution d'agarose est préparée dans l'eau à 90°C en utilisant un agitateur magnétique.

### I.1.2. Solvants organiques

Pour générer et/ou collecter les gouttes d'alginate, des solvants organiques ont été utilisés dans ce travail. Ils sont présentés dans le Tableau 1 avec leurs propriétés physiques qui sont intéressantes pour cette étude. L'ordre dans le Tableau 1 va du solvant dans lequel l'eau est le plus soluble à celui où il est le moins soluble. (Barton and Haulait-Pirson 1984) (Stephenson and Stuart 1986). Tous les solvants sont anhydres et ont été achetés chez *Sigma-Aldrich*.

Tableau 1. Propriétés physiques des solvants organiques

Solvant organique	Solubilité de l'eau dans le solvant organique (wt% à 20°C)	Solubilité du solvant organique dans l'eau (wt% à 20°C)	Densité (g/cm <sup>3</sup> )	Viscosité dynamique (mPa·s)
Éthanol	miscible	miscible	0,79	1,2
Propan-1-ol	miscible	miscible	0,8	2,26
Acide acétique	miscible	miscible	1,05	1,22
Butan-1-ol	20	7,8	0,81	2,57
Octan-1-ol	4,5	0,04	0,83	7,3
Carbonate de diméthyle (DMC)	3	12,7	1,07	0,63
Carbonate de diéthyle (DEC)	0,89	1,9	0,98	0,75

## I.2. Dispositifs microfluidique à base de gouttes

La Figure 35 montre le dispositif microfluidique à base de gouttes avec l'ensemble des éléments nécessaire pour effectuer les expériences. Dans cette partie, la génération et la collecte des gouttes sont présentés en détail, ainsi que l'observation. Puis l'enceinte thermostatée utilisée dans le cas de l'agarose est décrite.

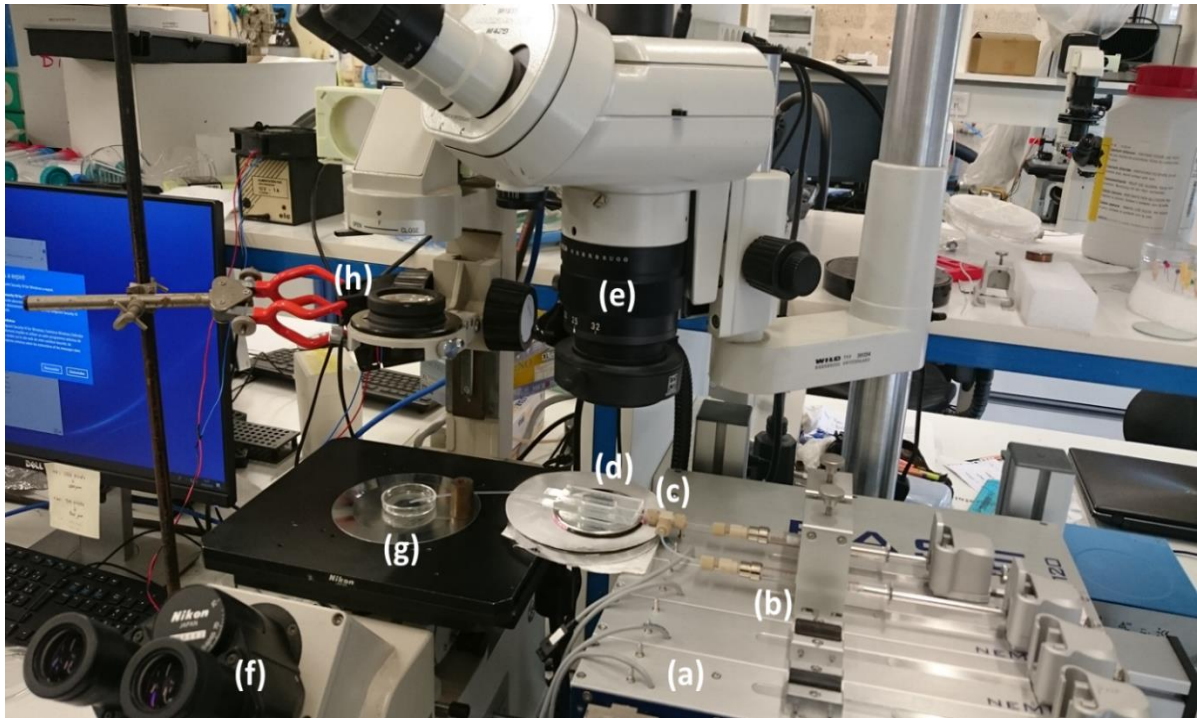


Figure 35. Montage microfluidique à base de gouttes avec : la génération des gouttes en utilisant (a) des pousse-seringues, (b) des seringues, (c) une jonction et des capillaires ; l'observation des microparticules par une optique binoculaire (e) en réflexion au niveau de la jonction avec (d) un système de « piscine » et un miroir en dessous et (f) en transmission ; la collecte des microparticules dans (g) un récipient en verre avec (h) un ventilateur pour les séparer à la sortie du capillaire.

### I.2.1. Génération de gouttes

La génération de gouttes est effectuée à partir de deux phases qui ne sont pas totalement miscibles. La phase dispersée contient les molécules à gélifier et la phase continue permet de générer les gouttes mais également de les contracter par la suite.

#### I.2.1.1. Pousse-seringues et seringues

Les pousse-seringues (*CETONI, Dosiermodul 14:1, NEM-B101-02 B*) (Figure 36 (a)), contrôlés par le logiciel *neMESYS* (Figure 36 (b)), permettent d'imposer des profils de débits précis pour la phase dispersée et la phase continue contenues dans les seringues (1mL, *ILS*).

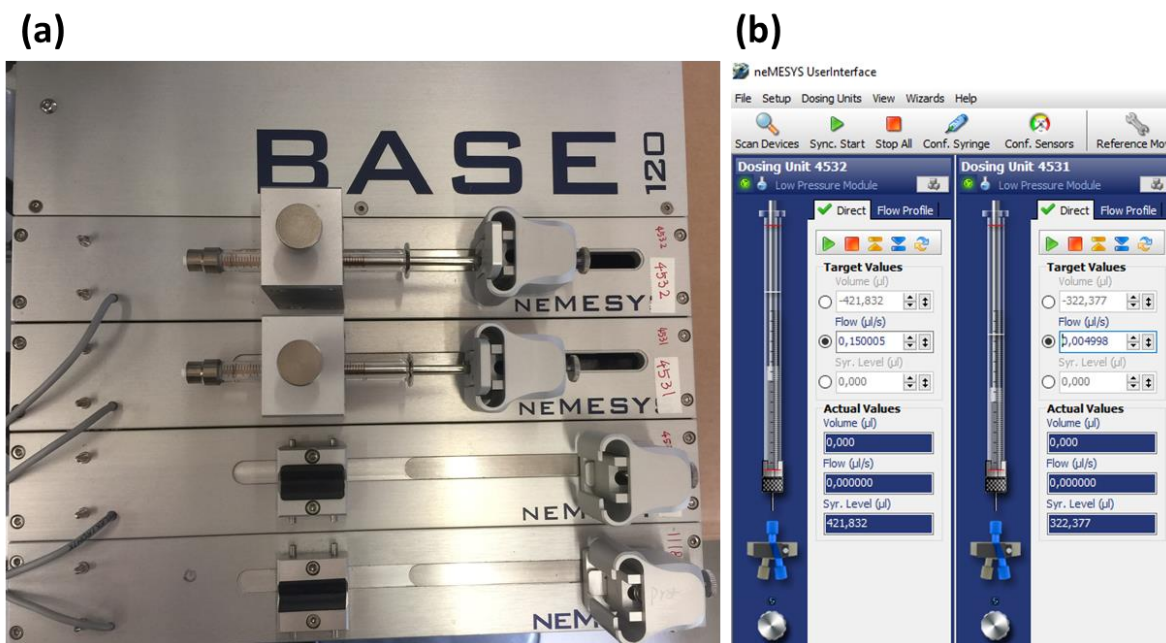


Figure 36. (a) Pousse-seringues et deux seringues. (b) Interface du logiciel *neMESYS*.

### I.2.1.2. Capillaires et jonctions

Deux types de capillaires (*IDEX, Health & Science*) (Figure 37 (a)) sont utilisés. Ils ont un même diamètre externe (« outside diameter », OD) mais différents diamètres internes (« inside diameter », ID) (Tableau 2).

Tableau 2. Matériaux et tailles des capillaires

Composition du capillaire	Diamètre externe (OD)	Diamètre interne (ID)
Perfluoroalkoxy (PFA)	1,59mm	500µm
Fluorinated ethylene propylene (FEP)		150µm

Les capillaires sont connectés par des jonctions et des joints de connexion (Figure 37 (b)) en polyétheréthercétone (PEEK) (*IDEX, Health & Science*) dont le diamètre interne est égal à celui des capillaires pour éviter toute fuite. Pour les jonctions, deux géométries, en T et en croix, sont utilisées selon les expériences.

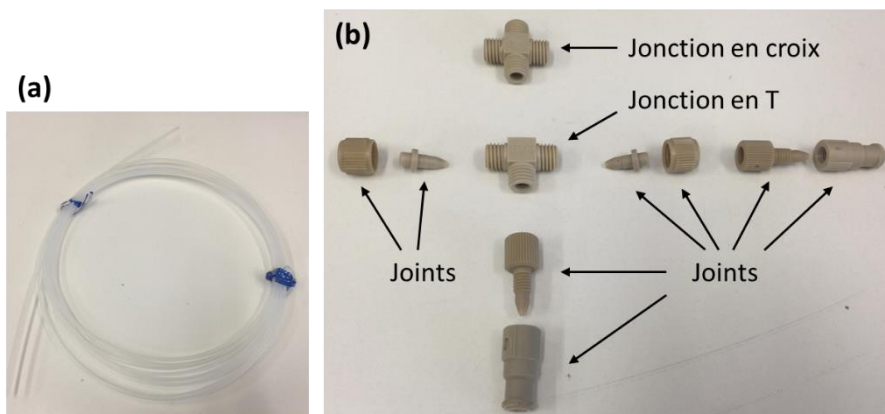


Figure 37. (a) Rouleau de capillaire. (b) Joints de connexion et jonctions en T et en croix.

### I.2.2. Collection de gouttes

A la fin du système, les gouttes sont collectées dans un récipient contenant une phase de collecte. Quand les gouttes sortent à l'extrémité du capillaire et entrent dans cette phase, la section d'écoulement augmente instantanément. Avec un débit (en  $\mu\text{L/s}$ ) constant, la vitesse (en  $\text{m/s}$ ) diminue vite. Ainsi à cet endroit, les gouttes se rapprochent les unes des autres et peuvent coalescer. Pour éviter cette coalescence, un petit ventilateur (*Ebmpapst 8412N/2GME*) (Figure 38) est disposé à côté du récipient (Figure 35 (h)). Le flux d'air permet de disperser les gouttes au moment où elles ralentissent et évite qu'elles s'accumulent à l'extrémité du capillaire. Selon nos expériences, cette technique est suffisante pour éviter la coalescence des gouttes.

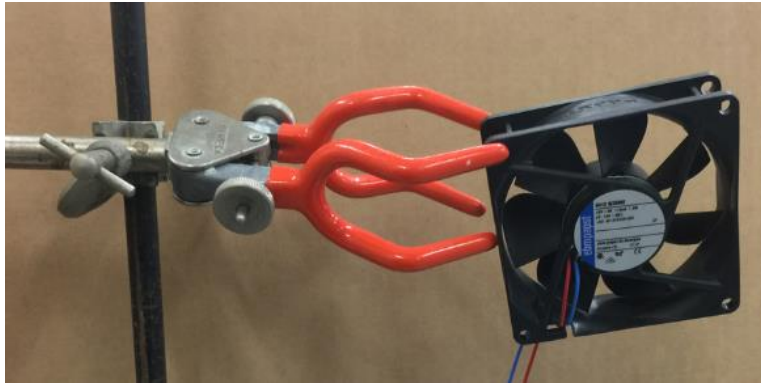


Figure 38. Ventilateur disposé à côté du récipient de collecte pour éviter la coalescence des gouttes à l'extrémité du capillaire.

### I.2.3. Observation

L'observation nécessite deux microscopes optiques et un système de « piscine ».

#### I.2.3.1. Microscopes optiques

Un microscope (*M420 Wild*, Figure 39 (a)), couplé avec une caméra (*DFK 33GP1300, Imaging Source*), est placé en amont proche de la jonction en T pour observer la génération des gouttes. Un microscope inversé en transmission (*Nikon Diaphot*, Figure 39 (b)), couplé avec une caméra (*DMK 23GM021, Imaging Source*), permet d'observer l'écoulement en aval ainsi que les microparticules collectées. La prise d'images est programmée avec le logiciel **IC Capture** (Figure 39 (c)).

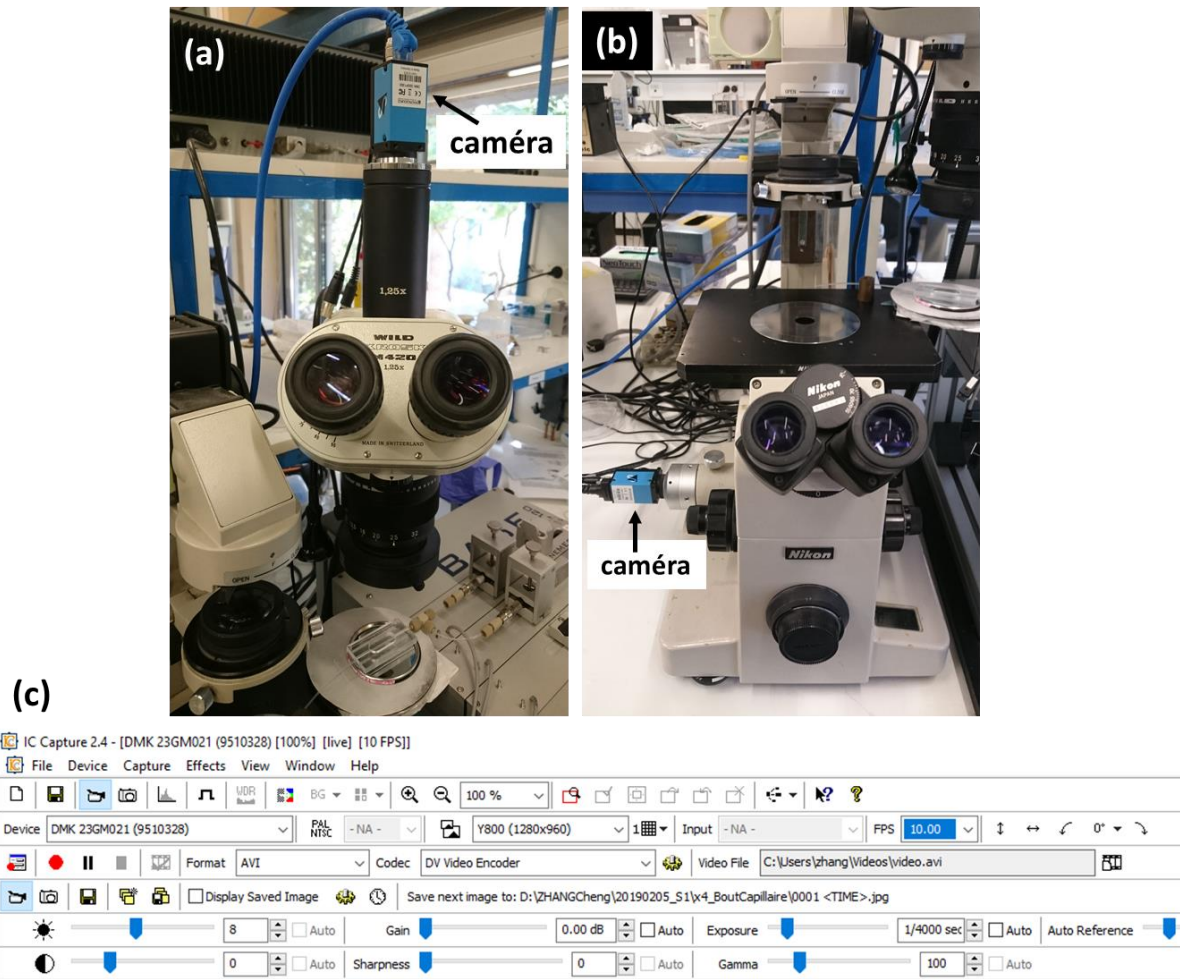


Figure 39. Microscopes optiques (a) en réflexion et (b) en transmission. (c) Interface du logiciel *IC Capture*.

### 1.2.3.2. Système de « piscine »

Lors de l'observation d'une goutte dans le capillaire, la lumière réfléchi par le miroir doit traverser de l'air, le matériau du capillaire et la goutte (Figure 40 d'avant (a)). Cependant, à cause de la différence de l'indice de réfraction ( $n$ ) entre l'air ( $n_{air}=1$  à 20°C) et le matériau du capillaire comme le FEP ( $n_{FEP}=1,344$  à 20°C), la déviation de la lumière est assez importante lors de la réfraction. Cela détériore la qualité de l'image comme on peut le voir sur la Figure 40 (a). Afin d'améliorer la prise d'image, un système de « piscine », système d'adaptation d'indice optique, est conçu (Figure 40 (b)) : une pièce présentant une fente large et un canal pour le passage du capillaire est fabriquée et collée sur une lame en verre. Ce système permet d'immerger le capillaire dans de l'eau ( $n_{eau}=1,335$  à 20°C) dont l'indice de réfraction est intermédiaire entre l'air et le FEP. Par conséquent, la lumière réfléchi dévie moins, ce qui améliore l'observation (Figure 40 (c)).

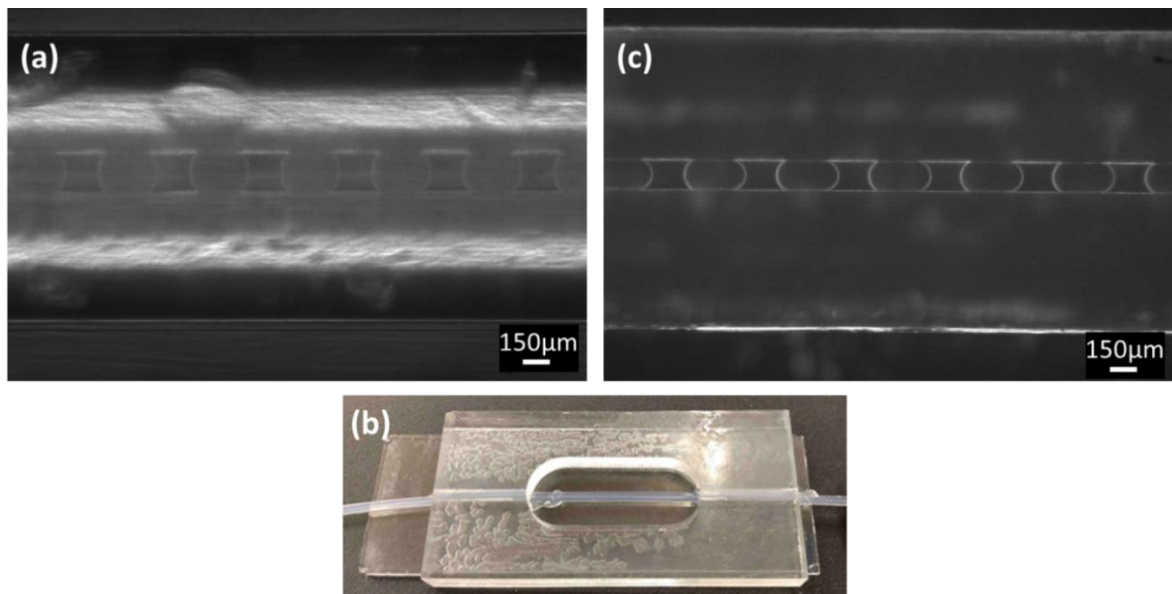


Figure 40. (a) Image au microscope optique des gouttes dans un capillaire d'ID 150µm, prise sans le système de « piscine ». (b) Photographie du système de « piscine » traversée par un capillaire. (c) Image au microscope optique de gouttes dans un capillaire d'ID 150µm, prise avec le système de « piscine ».

#### I.2.4. Système thermostaté

La préparation des microparticules d'agarose nécessite une enceinte thermostatée, réalisée par la société *ANACRISMAT*, qui comprend trois éléments (Figure 41 (a)) : un four ventilé, un capot transparent et une sonde de température. Les seringues, la jonction et les capillaires sont placés dans l'enceinte thermostatée (Figure 41 (b)). La température du four est réglée pour que la solution d'agarose soit liquide durant la génération des gouttes. Ensuite, le capillaire traverse une boîte où circule de l'eau issue d'un bain thermostaté (*TC-502, BROOKFIELD*) à une température contrôlée (de 2 à 36°C). Finalement, les microparticules sont collectées dans un récipient placé dans un monopuit thermostaté à 25°C avec des éléments Peltier et un circuit secondaire (bain thermostaté *F25MH, JUBALO*).

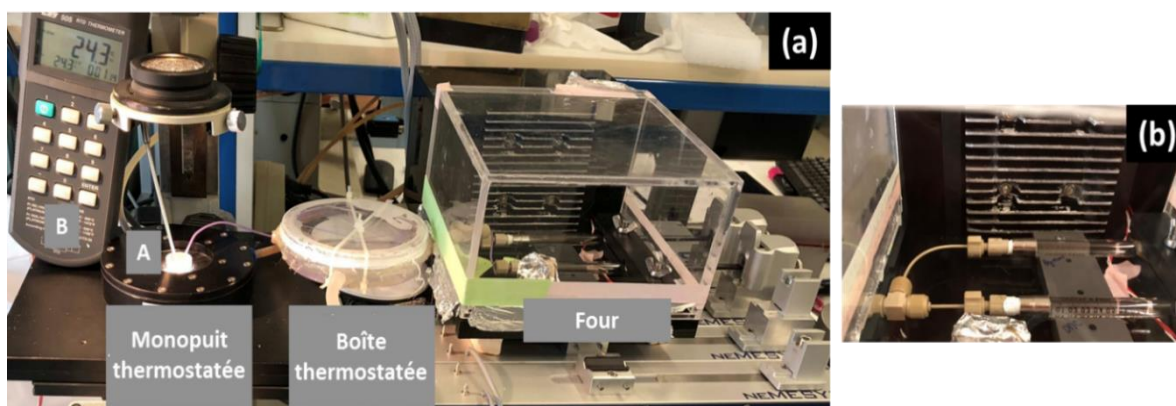


Figure 41. (a) Montage pour la génération de microparticules d'agarose (A : sonde thermique ; B : thermomètre). (b) Intérieur du four ventilé.



## Chapitre II. Méthodes

La préparation des microparticules est réalisée en deux étapes : 1) la génération des gouttes et 2) la collecte des microparticules. Le Figure 42 (a) montre le montage typique utilisé pour les expériences. Le schéma de la Figure 42 (b) montre la disposition des microscopes : un microscope en réflexion est mis au point A, juste après la jonction en T, pour observer les gouttes générées ; un microscope en transmission, placé à l'extrémité du capillaire (point B), sert à l'observation des gouttes sortant du système microfluidique ainsi que des microparticules finalement obtenues au fond de récipient (point C).

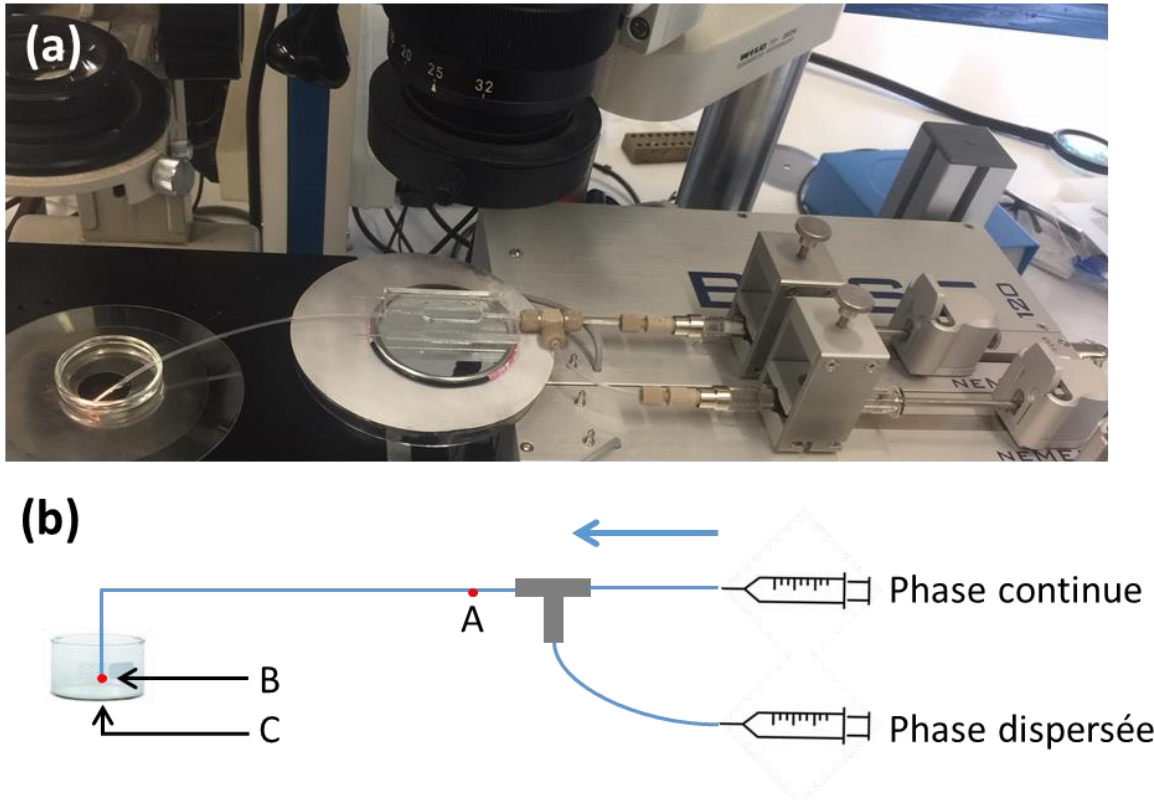


Figure 42. (a) Photographie et (b) schéma du montage. La flèche bleue montre le sens d'écoulement.

Pour préparer des microparticules de la taille des GRs, on pourrait partir de gouttes générées dans des capillaires de la même taille ( $\approx 10\mu\text{m}$ ). Cependant, la manipulation des capillaires d' $ID$   $10\mu\text{m}$  de diamètre et l'observation des gouttes à l'intérieur est très difficile. Par conséquent, j'ai choisi de générer les gouttes dans des capillaires d' $ID$   $150$  à  $500\mu\text{m}$  (Tableau 2). Et pour se rapprocher de la taille des GRs, les gouttes sont contractées par diffusion de solvant dans une phase extérieure (la phase continue), puis elles sont caractérisées sous formes de gouttes et de microparticules.

## II.1. Principe de la diffusion de solvant

La diffusion de solvant dans une phase extérieure à la goutte permet de réduire la taille des gouttes au cours de l'écoulement dans le capillaire et également lors de la collecte. La phase dispersée, qui est une phase aqueuse contenant la molécule à gélifier (Na-alginate ou Agarose), ne mouille pas la paroi du capillaire. Elle est émulsifiée dans une phase continue qui mouille la paroi du capillaire et dans laquelle l'eau est légèrement soluble, le DMC. Ainsi pendant l'écoulement, l'eau des gouttes diffuse dans le DMC jusqu'à atteindre la concentration 3%wt au maximum (Figure 43 (a)). On observe donc une contraction du volume et de la taille des gouttes le long du capillaire (Figure 43 (b)). Dans le cas du Na-alginate, comme la diffusion de l'alginate dans le DMC est négligeable (Rondeau and Cooper-White 2008), la perte d'eau dans chaque goutte conduit à une augmentation de la concentration d'alginate (en wt%).

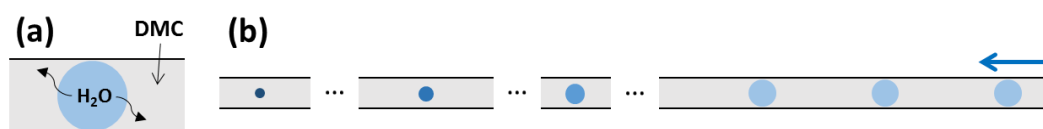


Figure 43. (a) Diffusion de l'eau dans la phase continue et (b) contraction des gouttes le long du capillaire. La flèche bleue montre le sens de l'écoulement.

On a appelé cette contraction *in situ* car elle se déroule dans le capillaire entre les points A et B de la Figure 42 (b). Et on a appelé contraction *ex situ*, celle qui se déroule lors de la collecte hors capillaire.

## II.2. Caractérisation des gouttes

### II.2.1. Mesure de la taille

Le logiciel *ImageJ* est utilisé pour la mesure de la taille des gouttes. Lorsque la goutte est sphérique, on caractérise sa taille par son diamètre. Pour cela, on délimite le contour de la goutte par un cercle et son diamètre est donné par le « Feret's Diameter » (Figure 44).

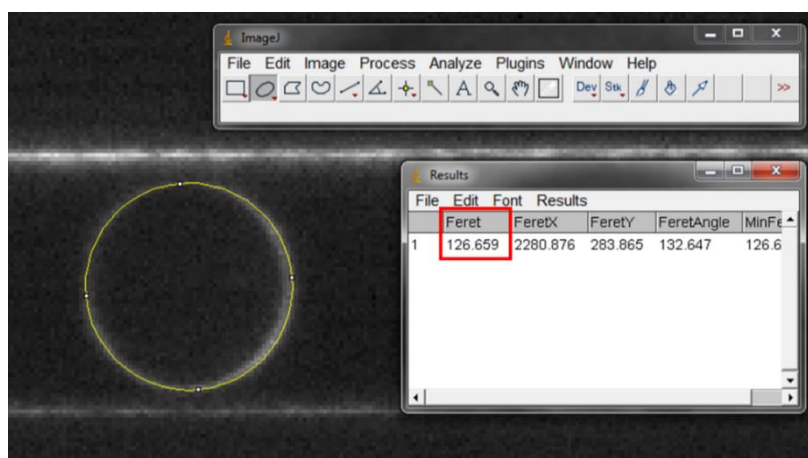


Figure 44. Mesure du diamètre par *ImageJ* d'une goutte sphérique, sélectionnée par un cercle jaune, avec la fenêtre de résultat affichant son diamètre en  $\mu\text{m}$  (encadré en rouge).

Parfois, les gouttes générées sont allongées car elles sont limitées sur un axe par le diamètre interne du capillaire. On les appelle des « *plugs* » (Figure 45). Dans ce cas, leur taille est caractérisée par la longueur ( $L_{goutte}$ ) et la largeur ( $D$ ) qui est le diamètre du capillaire. Avec *ImageJ*, on choisit le « Bounding Rectangle » comme le paramètre à mesurer. En encadrant la goutte par un rectangle, on obtient la dimension de cette goutte : dans le tableau de résultats (Figure 45), le « Width » et le « Height » correspondent à  $L_{goutte}$  et  $D$  respectivement.

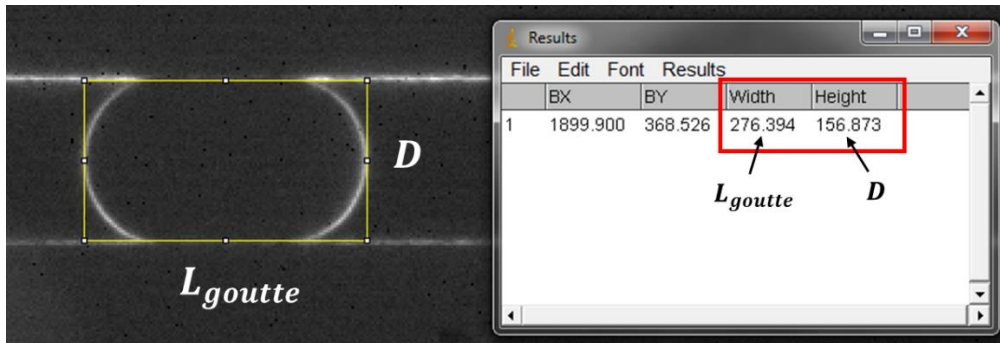


Figure 45. Mesure de la taille d'une goutte sous forme de plug avec *Image J*, sélectionnée par un rectangle jaune pour mesurer  $L_{goutte}$  et  $D$  affichés en  $\mu\text{m}$  (encadré en rouge).

Par ailleurs, à la sortie du capillaire toutes les gouttes auront une forme sphérique, même celles qui étaient sous la forme de plug dans le capillaire. Cela est dû au fait que les forces capillaires sont plus fortes que les forces visqueuses, ce qui conduit à la forme d'énergie minimal c'est-à-dire la sphère. Par conséquent, nous calculons le diamètre équivalent d'un plug ( $D_{goutte}$ ) (Equation 7), en supposant que celui-ci est constitué de deux semi-sphères à deux extrémités et d'un cylindre au milieu (Figure 46).

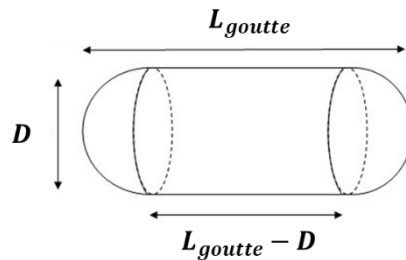


Figure 46. Illustration approximative d'un plug

$$V_{goutte} = \frac{4}{3} \times \pi \times \left(\frac{D}{2}\right)^3 + \pi \times \left(\frac{D}{2}\right)^2 \times (L_{goutte} - D)$$

Equation 5

$$V_{goutte} = \frac{4}{3} \times \pi \times \left(\frac{D_{goutte}}{2}\right)^3$$

Equation 6

$$D_{goutte} = \sqrt[3]{D^3 + \frac{3}{2} \times D^2 \times (L_{goutte} - D)}$$

Equation 7

## II.2.2. Mesure de l'énergie interfaciale

L'énergie interfaciale entre les phases continue et dispersée ( $\gamma_{CD}$ ) joue un rôle important dans la génération et la stabilisation des gouttes. En effet, on a vu dans la partie « A. Bibliographie » que  $\gamma_{CD}$  est un paramètre important pour caractériser les flux et les microgouttes.  $\gamma_{CD}$  intervient dans le calcul de la longueur capillaire ( $l_c$ ) et du nombre capillaire ( $Ca$ ) (Equation 3 et Equation 4). D'ailleurs ce dernier permet de définir le régime de génération des gouttes (Chapitre II.2.).

Pour la mesure de  $\gamma_{CD}$ , la méthode de la goutte pendante est appliquée en utilisant un tensiomètre (Dataphysics OCA 20) (Figure 47 (A)) dans une pièce thermostatée. On remplit d'abord une seringue (Figure 47 (B)) avec une des phases d'intérêt, ce qui permet de générer des gouttes dans une cuve contenant l'autre phase. La génération de gouttes est filmée avec une caméra (Figure 47 (A-a)) et le logiciel **SCA 20** permet de calculer  $\gamma_{CD}$  à partir de la forme de goutte juste avant son détachement.

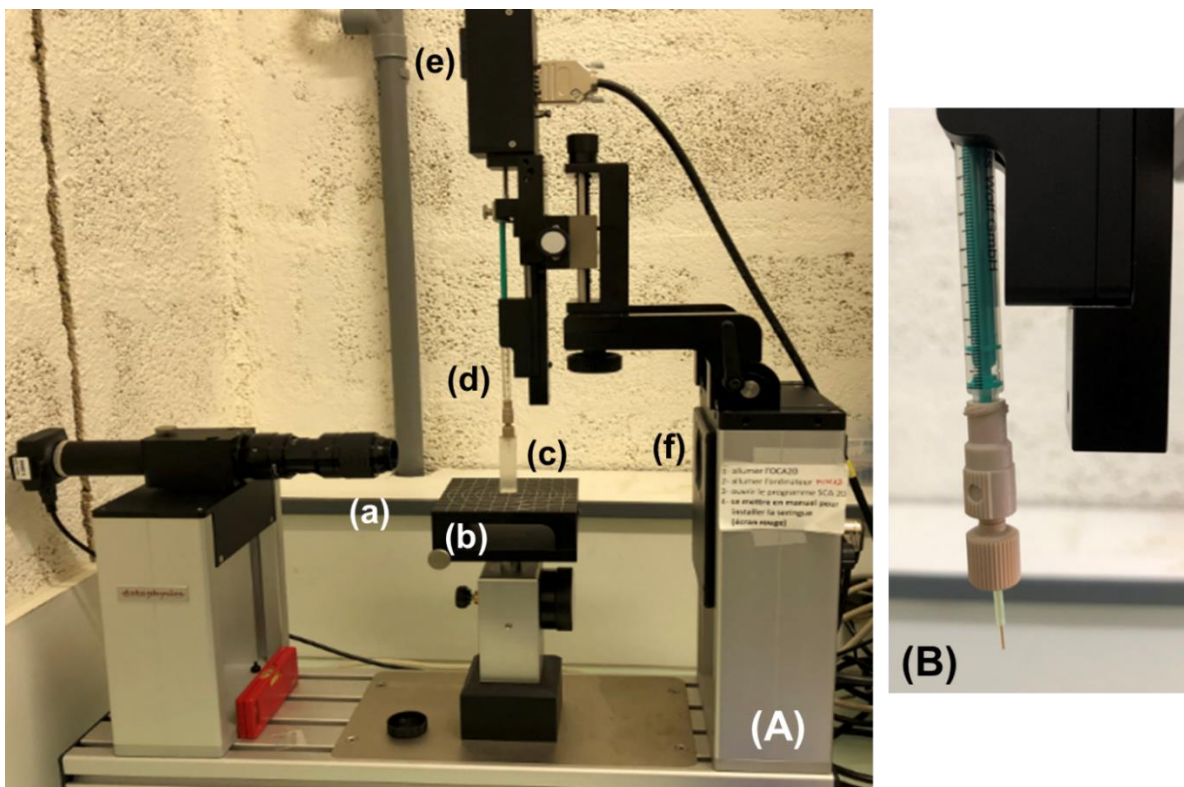


Figure 47. (A) Photographie du tensiomètre (Dataphysics OCA 20) avec (a) caméra, (b) support, (c) cuve, (d) seringue, (e) poussoir et (f) éclairage uniforme. (B) Photographie de la seringue avec un capillaire à son extrémité.

Comme indiqué dans la Figure 48 (a), au point M de coordonnées  $(x, y)$  à la surface d'une goutte pendante, la pression à l'intérieur ( $P_{in}$ ) et celle à l'extérieur ( $P_{ext}$ ) sont calculées d'après le principe de l'hydrostatique (Equation 8 et Equation 9).

$$P_{in}(y) = P_{in}(0) - \rho_{in} \times g \times y$$

Equation 8

$$P_{ext}(y) = P_{ext}(0) - \rho_{ext} \times g \times y$$

Equation 9

Avec  $\rho_{in}$  et  $\rho_{ext}$  les masses volumiques (en kg/m<sup>3</sup>) respectivement du liquide de la goutte et de l'environnement,  $g$  l'accélération gravitationnelle (en m/s<sup>2</sup>) et  $\gamma$  l'énergie interfaciale (en N/m) entre le liquide de la goutte et l'environnement.

Avant le détachement, à l'équilibre entre la force de gravité et la force capillaire, la différence entre  $P_{in}$  et  $P_{ext}$  peut être définie par l'équation Laplace-Young (Equation 10).

$$P_{in}(y) - P_{ext}(y) = \gamma \times \left( \frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right)$$

Equation 10

Avec  $R_1$  et  $R_2$  (en m) les rayons de courbure principaux. Il faut savoir qu'à l'apex,  $y=0$  et  $R_1=R_2=R_0$ .

En combinant les 3 équations, on obtient l'Equation 11.

$$\gamma \times \left( \frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) = \gamma \frac{2}{R_0} - \Delta\rho \times g \times y$$

Equation 11

Avec  $\Delta\rho$  la différence entre  $\rho_{in}$  et  $\rho_{ext}$ .

Ensuite la forme de la goutte peut être décrite en utilisant l'abscisse curviligne  $s$  à partir de l'apex O ainsi que l'angle  $\phi$  (Figure 48 (a)). Par conséquent, l'équation (4) peut être transformée en plusieurs équations paramétriques (Gassin, 2014). Avec le contour de goutte extrait du logiciel, un ajustement est réalisé par le logiciel afin de résoudre les équations et calculer  $\gamma$ .

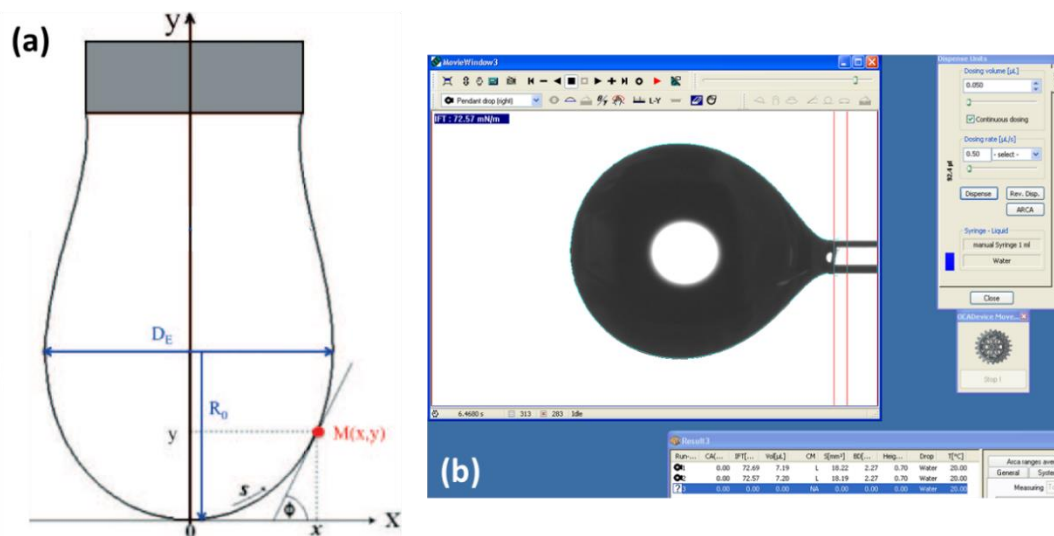


Figure 48. (a) Goutte pendante décrite par (Gassin, 2014) :  $D_E$  diamètre maximum de la goutte ;  $R_0$  rayon de courbure à l'apex O. (b) Interface du logiciel SCA 20 pendant la calibration du tensiomètre en mesurant l'énergie interfaciale d'une goutte d'eau dans l'air.

## II.3. Caractérisation de microparticules

La taille des microparticules est mesurée sur les images avec le logiciel *ImageJ* comme dans la partie II.2.1. De plus, la forme et les propriétés mécaniques des microparticules sont également caractérisées.

### II.3.1. Forme

Le microscope électronique à balayage du laboratoire (MEB, *JEOL JSM-6340F*) (Figure 49) est utilisé pour observer la forme des microparticules sèches. Le MEB permet d'observer des objets avec des grossissements importants : de 25x à 2000x en mode *Low Magnification* ; de 500x à 650000x en mode *Haute Résolution*. En effet, la résolution est de 2,5nm à 1kV et jusqu'à 1,2nm à 15kV.

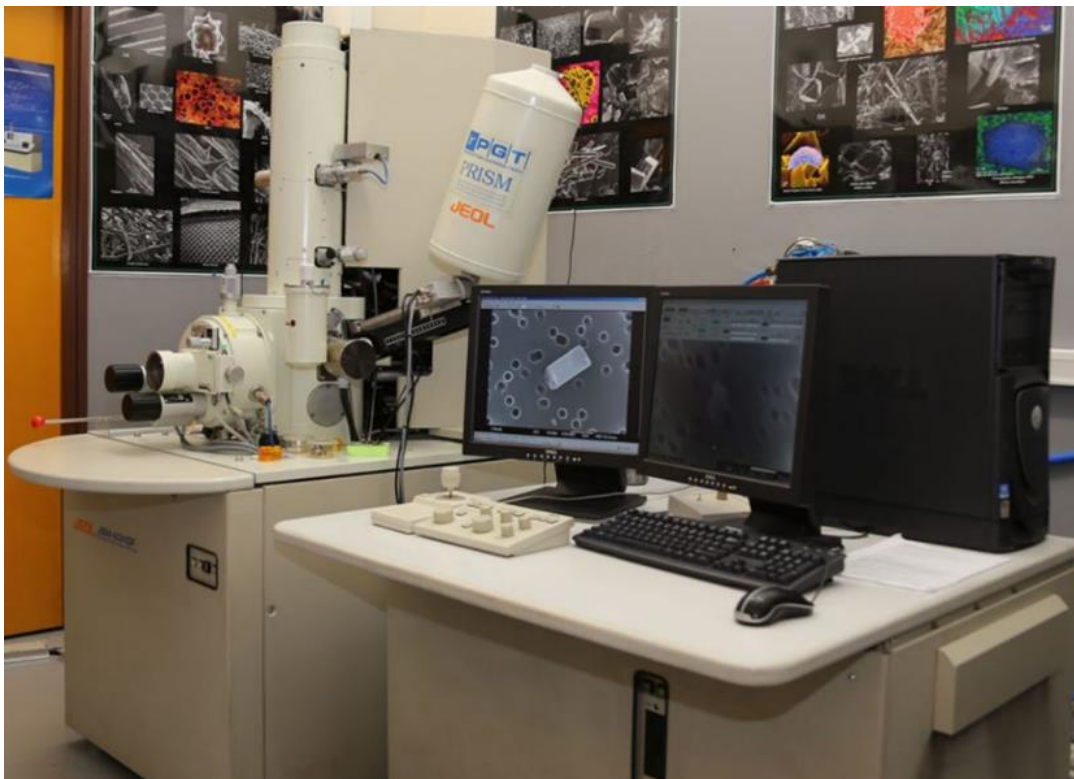


Figure 49. Microscope électronique à balayage du laboratoire (MEB, *JEOL JSM-6340F*)

La Figure 50 montre la préparation d'un échantillon avant l'observation au MEB. Dans un premier temps, on colle un morceau d'adhésif en carbone sur un porte-échantillon métallique. Puis on tamponne délicatement le fond du récipient contenant les microparticules sèches avec le porte échantillon, pour les fixer sur l'adhésif en carbone. Pour l'observation au MEB, nous avons évité de pulvériser une couche d'or sur la surface comme fait classiquement sur les échantillons organiques. En effet, même avec une couche fine d'or, l'observation de la surface des microparticules est gênée. Par conséquent, on dispose le porte échantillon avec les microparticules collées sur l'adhésif directement dans la chambre vide du MEB. Pour l'observation de la forme, les électrons sont envoyés avec une faible tension de 1kV.

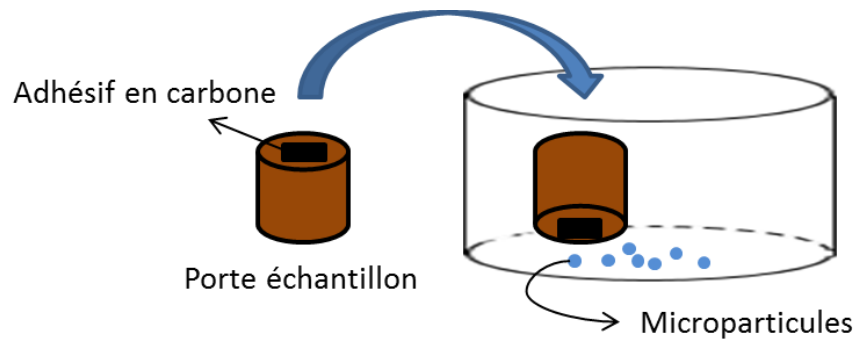


Figure 50. Schéma de la préparation d'un échantillon pour l'observation au MEB

### II.3.2. Propriétés mécaniques

Les propriétés mécaniques des microparticules sont données de façon qualitative en les manipulant avec une micro-pince, puis de façon plus quantitative par microscope à force atomique (AFM).

#### II.3.2.1. Mesure qualitative par micro-pince

La micro-pince acquise au laboratoire (FT-G 102 Force Sensing Microgrippers, *FemtoTools*) (Figure 51 (a)) dans le cadre de ce projet est constituée de deux « bras ». Pour saisir l'objet et le comprimer, le bras gauche est mobile grâce à la tension d'entrée ( $V_p$ ) qui peut être variée sur une gamme de 0-170V. La micro-pince est montée sur un système de positionnement à 6 dimensions, 3 mouvements de translation et 3 de rotation (Figure 51 (b)). Le bras droit quant à lui comprend un capteur de force qui mesure la contrainte ressentie jusqu'à 250 $\mu$ N, lorsque l'on saisit un objet, par la tension de signal ( $V_s$ ). Sur le montage, un microscope optique avec un grossissement de x10 permet d'observer la saisie de l'objet et sa compression avec le bras gauche ou le glissement de celui-ci si l'objet est difficile à comprimer.

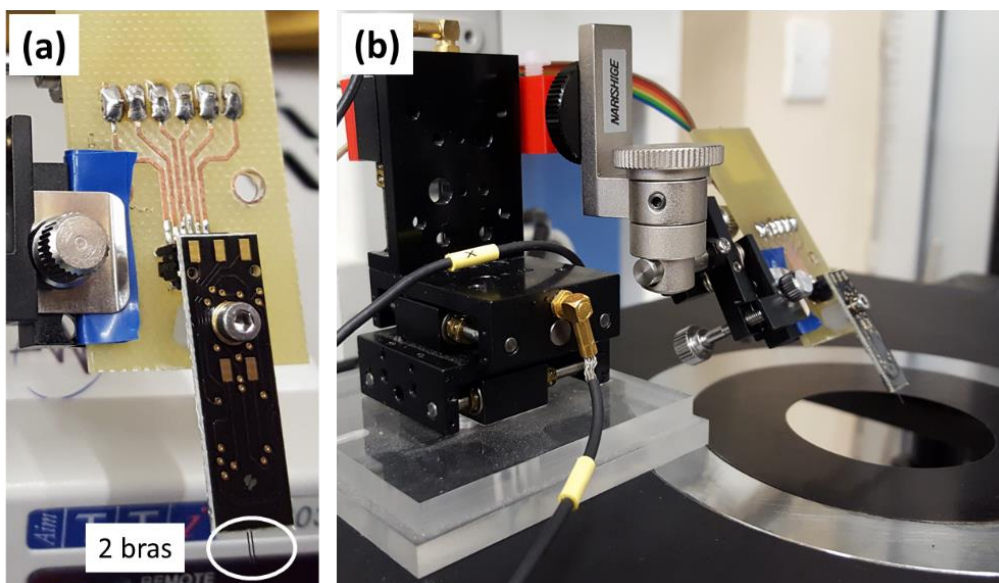


Figure 51. Montage du système de micro-pince : (a) les deux bras de la micro-pince ; (b) le dispositif avec le système de déplacement à 6 dimensions et le microscope optique.

Le protocole pour caractériser les propriétés mécaniques des microparticules consiste à d'abord disposer les deux bras de la micro-pince autour d'une microparticule donnée (Figure 52 (a)). La valeur de  $V_s$  mesurée « à vide » est notée  $V_0$ . Puis le bras gauche est déplacé en variant  $V_p$  jusqu'à saisir la microparticule sans pincement (Figure 52 (b)). La nouvelle valeur de  $V_s$  est mesurée. Si la microparticule est compressible, on peut mesurer sa réaction à la compression en variant  $V_p$ . Ainsi, la relation entre  $(V_s - V_0)$  et  $V_p$  combinée à l'observation optique donne accès à la réaction des microparticules à la compression. On a alors qualitativement la rigidité de la microparticule. La manipulation de la micro-pince peut être réalisée à l'air ou en liquide.

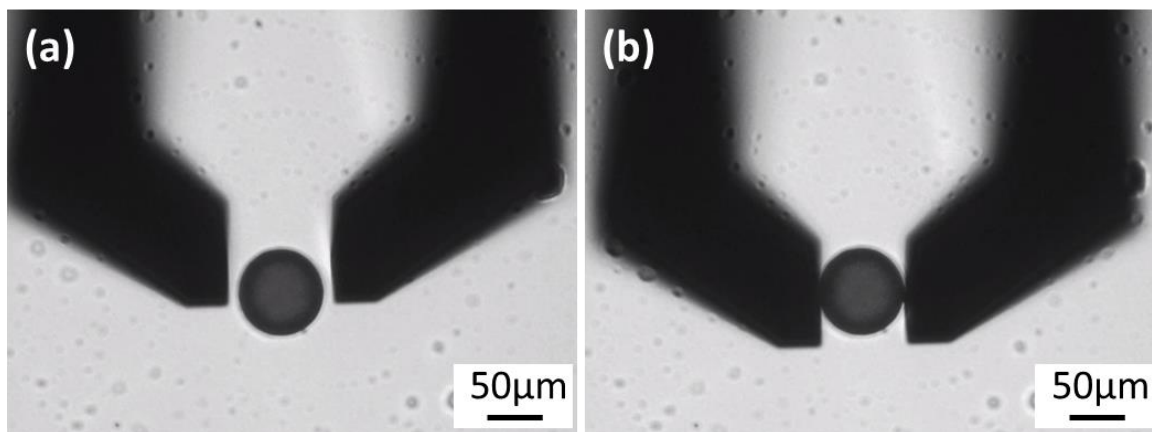


Figure 52. Une microparticule manipulée par la micro-pince pendant (a) l'approche et (b) le contact avec une force contrôlée.

### II.3.2.2. Mesure du module de Young par Microscopie à Force Atomique (AFM)

Les mesures du module de Young ( $E$ ) par Microscopie à Force Atomique (AFM) ont été réalisées au Laboratoire Adhésion and Inflammation (LAI), INSERM U1067 CNRS UMR 7333 avec Leda Lacaria (Doctorante) et Felix Rico (Maître de conférences). Nous avons utilisé l'AFM (JPK, Bruker, Santa Barbara, CA, USA) sur lequel est monté un cantilever, MLCT-Bio-DC(C) (Bruker, Santa Barbara, CA, USA), qui est en forme de V avec une sonde pyramidale (Figure 53 (a)). La constante de raideur du cantilever est de 0,01N/m. On mesure la réaction de la microparticule lorsqu'on l'indente avec la sonde. Les courbes de forces lors de l'approche du cantilever et de son retrait permettent de déterminer la profondeur d'indentation et le module de Young de la microparticule.

Les mesures sont réalisées en liquide, dans du DMC pour les microparticules de Na-alginate car elles sont solubles dans l'eau, et dans de l'eau pour les microparticules de Ca-alginate. Tout ceci est contenu dans des boîtes de Pétri et aucun traitement n'a été réalisé pour fixer les microparticules au fond des boîtes. Une observation par un microscope optique est couplée à l'AFM. Toutes les mesures sont effectuées avec la force à 0,4nN, la vitesse à 2μm/s et en partant d'une hauteur en  $z$  de 1μm. Les points de mesure suivent une grille 8x8 placée au centre de la surface de la microparticule (Figure 53 (b)), avec une distance entre deux points de 2,5μm. La courbe de force en chaque point est répétée 5 fois.



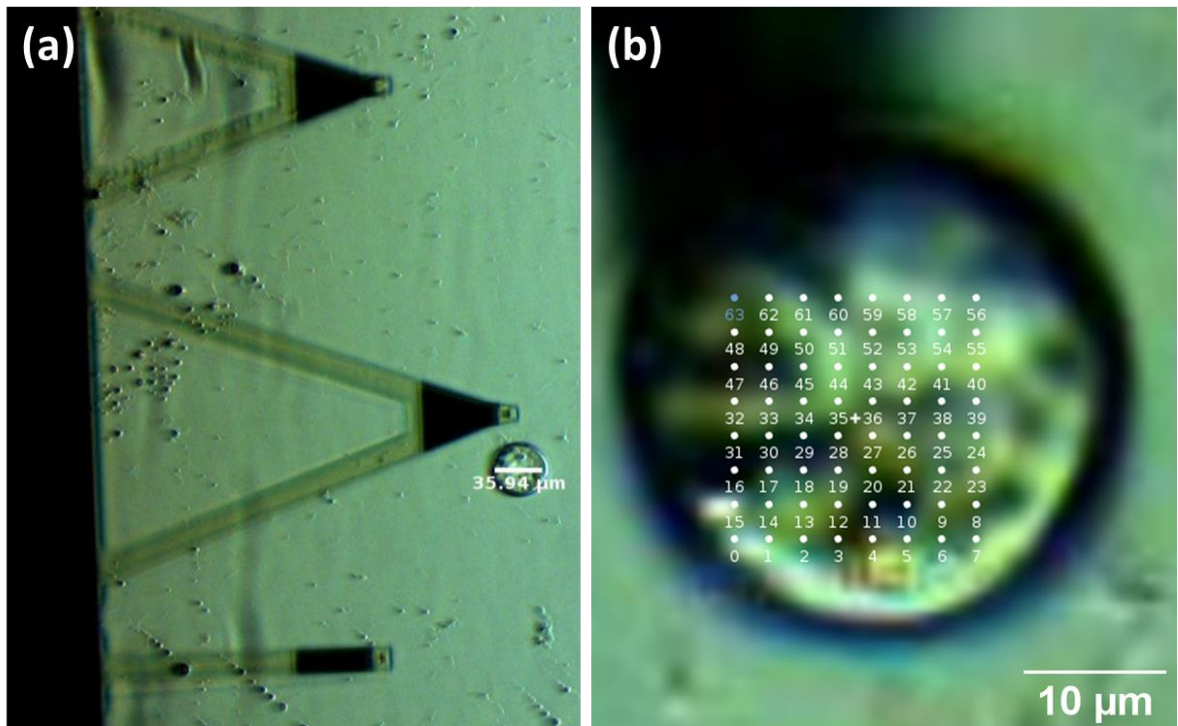


Figure 53. (a) Cantilever utilisé pour la mesure de force par l'AFM et microparticule adsorbée sur la surface de la boîte de Pétri. (b) Grille appliquée sur une microparticule pour l'acquisition des courbes de force en 8x8 points sur la surface, avec une distance entre deux points de 2,5μm.

## C. Résultats et Discussions

Dans cette partie, je décris les résultats obtenus lors des études sur la préparation des microparticules à base d'alginate par une méthode microfluidique. J'explique d'abord la préparation des **microparticules de Na-alginate** et le contrôle de leur taille et de leur concentration (Chapitre I), puis celles de **Ca-alginate** (Chapitre II). Ensuite, je montre la caractérisation de **la forme et des propriétés mécaniques** de ces deux types de microparticules (Chapitre III). Par ailleurs, les **mesures ultrasonores** sont effectuées avec les microparticules de Ca-alginate au Laboratoire de Mécanique et d'Acoustique (LMA), pour montrer la faisabilité des mesures ultrasonores (Chapitre IV). Afin d'améliorer la préparation des microparticules, je présente des méthodes alternatives portant sur les modifications possibles de la **phase organique** ou du matériau d'hydrogel en préparant des **microparticules d'agarose** (Chapitre V).

## Chapitre I. Préparation de microparticules de Na-alginate

Dans cette thèse, la préparation de microparticules de Ca-alginate se fait en deux étapes afin d'éviter les problèmes de colmatage dû à une gélification rapide dans les capillaires (A.IV.1.1.) et de coalescence (sans l'utilisation de tensioactifs). Ce chapitre décrit la première étape de préparation des microparticules de Na-alginate avant la gélification avec du  $\text{CaCl}_2$ . Pour cela, le montage microfluidique de la Figure 35 (B.I.2.) permet de générer des gouttes de Na-alginate dans du DMC. Puis les gouttes se contractent *in situ* dans le capillaire dû à la solubilité partielle de l'eau dans le DMC (B.II.1.). Enfin, les gouttes sont collectées dans du DMC ce qui déclenche une contraction *ex situ*, transformant les gouttes en microparticules de Na-alginate. Les contractions *in situ* et *ex situ* sont discutées consécutivement.

### I.1. Génération des gouttes

La génération des gouttes de Na-alginate dans les capillaires nécessite une étude hydrodynamique pour contrôler leur forme et leur taille au niveau de la jonction en T (observation en A sur la Figure 54).

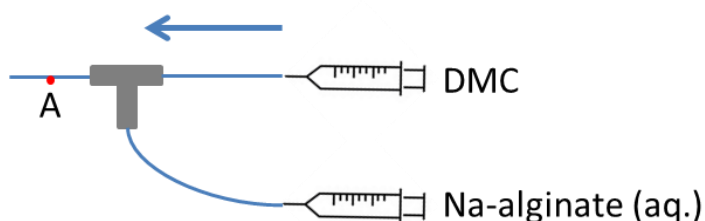


Figure 54. Schéma du montage pour l'étude de la génération des gouttes, en géométrie « cross-flow » (A.II.1.3.) et avec une observation en A par un microscope en réflexion.

Dans la bibliographie (A.II.2.2.), nous avons vu que la formation des gouttes dépendait fortement du nombre capillaire ( $Ca$ ), qui est calculé à partir de l'énergie interfaciale ( $\gamma_{DMC/alginate}$ ) entre la phase continue de DMC et la phase dispersée de solution d'alginate (Equation 3). La mesure de  $\gamma_{DMC/alginate}$  pour différentes concentrations en Na-alginate est réalisée avec la méthode de la goutte pendante (B.II.2.2.). D'après le Tableau 3,  $\gamma_{DMC/alginate}$  est de 4,94mN/m et le Na-alginate n'a pas d'effet tensioactif. Ce résultat est cohérent avec la littérature (Rondeau and Cooper-White 2008). Basée sur  $\gamma_{DMC/alginate}$ , la longueur capillaire ( $l_c$ ) est de  $2,7 \pm 0,1$  mm (selon l'Equation 3 (A.II.2.1.2.)).

Tableau 3. Energie interfaciale entre le DMC et la solution de Na-alginate

Phase 1	Phase 2	Énergie interfaciale (mN/m)
DMC	Eau	$5,05 \pm 0,04$
DMC	Na-alginate 0,6wt%	$4,94 \pm 0,02$
DMC	Na-alginate 0,2wt%	$4,94 \pm 0,03$
DMC	Na-alginate 0,06wt%	$4,94 \pm 0,02$

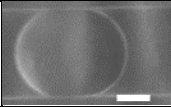
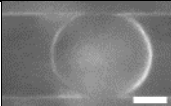
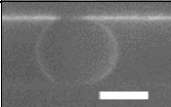
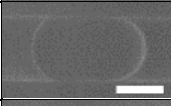
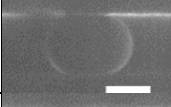
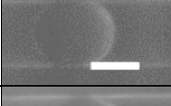

Les diamètres ( $D$ ) des capillaires utilisés sont d'abord de 500 $\mu\text{m}$  pour montrer la faisabilité de la génération des gouttes de Na-alginate dans un flux de DMC ; puis de 150  $\mu\text{m}$  pour se rapprocher de la taille des globules rouges (GRs), tout en conservant la facilité de manipulation des capillaires. Dans les 2 cas, la valeur de  $l_c$  est bien supérieure au diamètre des capillaires, ce qui confirme que les effets capillaires sont plus importants que les effets de gravité dans le capillaire. Pour le calcul de  $Ca$ , on se base sur la viscosité dynamique du DMC ( $\mu_{DMC}=0,63\text{mPa}\cdot\text{s}$ ) et sur sa vitesse moyenne  $v_{DMC}$ . Comme le régime d'écoulement en microfluidique est en général laminaire (A.II.2.1.1.), les vitesses moyennes du flux d'alginate ( $v_{alginate}$ ) et de DMC ( $v_{DMC}$ ) sont calculées à partir des débits d'alginate ( $Q_{alginate}$ ) et de DMC ( $Q_{DMC}$ ) à partir des Equations 12, comme nous l'avons vu précédemment (A.II.2.1.1.) :

$$v_{alginate} = \frac{Q_{alginate}}{\pi(D/2)^2} \text{ et } v_{DMC} = \frac{Q_{DMC}}{\pi(D/2)^2}$$

Equations 12

Le Tableau 4 présente les conditions de génération des gouttes dans des capillaires de 500 et 150 $\mu\text{m}$  : les valeurs des vitesses d'alginate et de DMC, leur rapport ( $v_{alginate}/v_{DMC}$ ), leur somme ( $v_{total}$ ) et le calcul de  $Ca$ . Les résultats des expériences sont mis en évidence par une photo d'une goutte caractéristique prise après la jonction en T, par sa taille ( $L_{goutte}$ ) et le rapport ( $L_{goutte}/D$ ).

Tableau 4. Conditions de génération des gouttes dans des capillaires de 500 et 150 $\mu\text{m}$ , photos des gouttes et résultats des mesures de taille. Echelle sur les photos de 100 $\mu\text{m}$ .

$D$ ( $\mu\text{m}$ )	$Q_{DMC}$ ( $\mu\text{L/s}$ )	$Q_{alginate}$ ( $\mu\text{L/s}$ )	$v_{DMC}$ (mm/s)	$v_{alginate}$ (mm/s)	$\frac{v_{alginate}}{v_{DMC}}$	$v_{total}$ (mm/s)	$Ca$	Photos des gouttes	$L_{goutte}$ ( $\mu\text{m}$ )	$\frac{L_{goutte}}{D}$
500	1	0,02	5,1	0,1	0,02	5,2	0,0006		565	1,13
500	0,5	0,02	2,5	0,1	0,04	2,6	0,0003		549	1,10
150	0,6	0,3	34	17	0,5	51	0,0043		164	1,10
150	0,3	0,3	17	17	1	34	0,0022		235	1,57
150	0,3	0,2	17	11,3	0,67	28,3	0,0022		194	1,29
150	0,3	0,1	17	5,6	0,33	22,6	0,0022		162	1,08
150	0,2	0,005	11,3	0,3	0,025	11,6	0,0014		153	1,01

On observe qu'en général les gouttes générées sont sous forme de plug, c'est-à-dire avec  $L_{goutte}/D > 1$ . Ce résultat est cohérent avec le régime « squeezing » pour la génération des gouttes, ce qui correspond bien à  $Ca < 0,01$  (A.II.2.2.1.). Nous pouvons également comparer ces résultats aux études hydrodynamiques de formation de gouttes dans une jonction en T réalisées précédemment au laboratoire avec de l'éthanol et une huile fluorée comme phase dispersée et phase continue respectivement (Zhang et al. 2015). Même si les viscosités dynamiques et les énergies interfaciales mises en jeu sont très différentes, nous retrouvons les mêmes comportements :

- 1) A  $D=500\mu\text{m}$ ,  $L_{goutte}/D$  semble dépendre de  $v_{alginate}/v_{DMC}$  mais aussi de  $v_{total}$  et de  $Ca$  ;
- 2) A  $D=150\mu\text{m}$ , une relation linéaire entre  $L_{goutte}/D$  et  $v_{total}/Ca^{4/3}$  (Figure 55), ressemblant à celle obtenue pour les capillaires de 500 et 1000 $\mu\text{m}$  de diamètre par les auteurs (Zhang et al. 2015), permet de prédire la taille des gouttes suivant les débits appliqués.

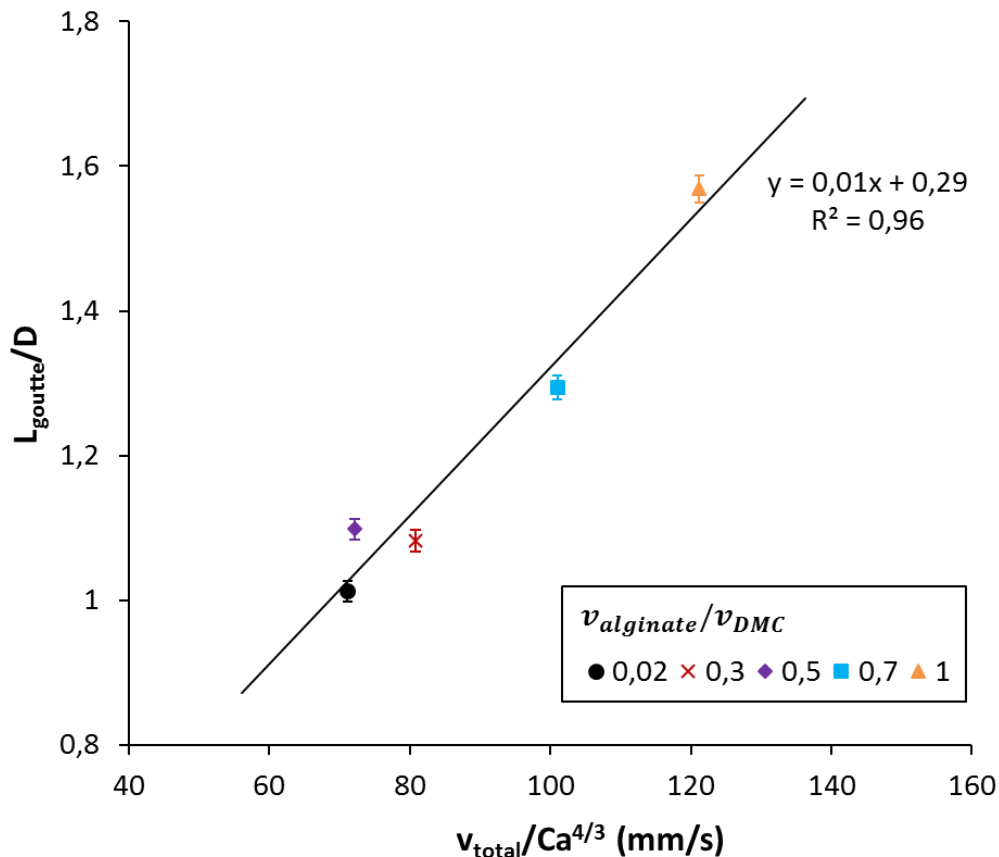
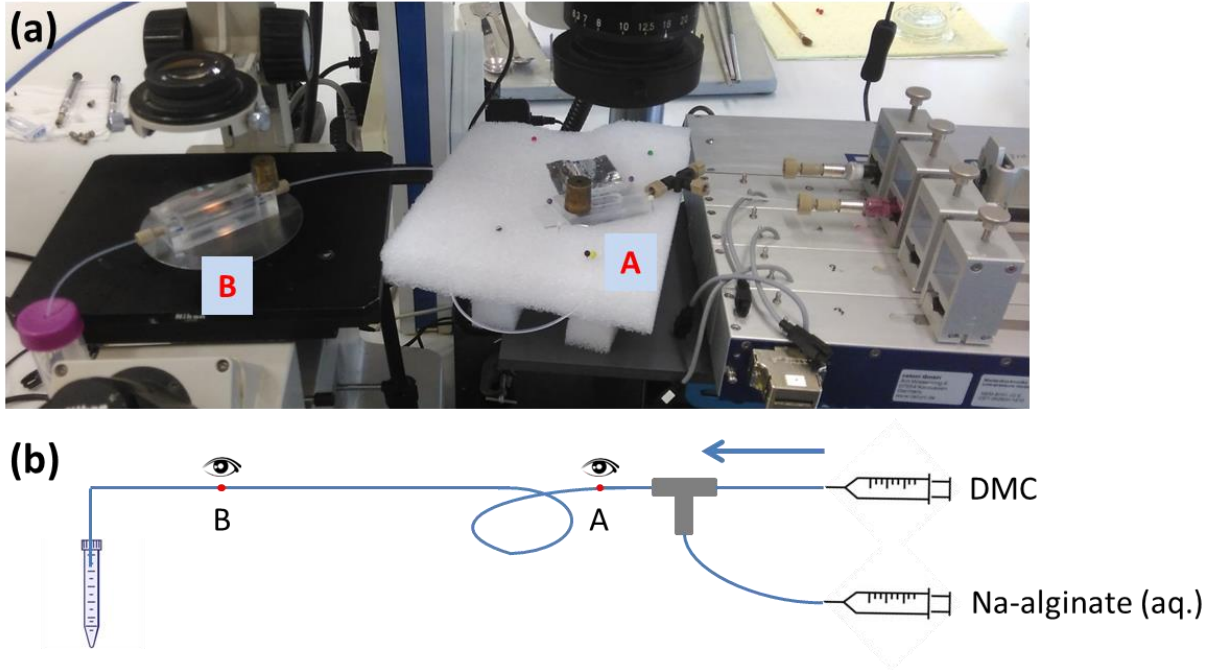


Figure 55. Tracé de  $L_{goutte}/D$  en fonction de  $v_{total}/Ca^{4/3}$  pour différents rapports de vitesses ( $v_{alginate}/v_{DMC}$ ) à partir d'expériences réalisées dans des capillaires de 150 $\mu\text{m}$  de diamètre. Les barres d'erreurs sont calculées pour chaque point.

## I.2. Contraction *in situ*

La contraction des gouttes, afin d'atteindre une taille proche de celle des GRs, est explorée avec une solution aqueuse de Na-alginate à faible concentration initiale ( $C_i=0,02\text{wt}\%$ ). Dû à la solubilité partielle de l'eau dans le DMC, l'eau de chaque goutte diffuse dans le DMC et les gouttes se contractent. J'appelle ce processus « contraction *in situ* » car il se passe à l'intérieur du capillaire. Avant de sortir du capillaire, les gouttes sont observées au point B avec un microscope en transmission. La contraction *in situ* est alors évaluée en comparant la taille des gouttes aux points A et B (Figure 56).



La vitesse des gouttes ( $v_{goutte}$ ) est calculée à partir du débit total ( $Q_{TOT}$ ) (Equation 13).

$$v_{goutte} = \frac{Q_{TOT}}{\pi(D/2)^2}$$

Equation 13

La longueur du capillaire entre A et B ( $L_{AB}$ ) et donc le temps de séjour des gouttes entre A et B ( $\tau_{AB}$ ) est variée.  $\tau_{AB}$  est calculé à partir de  $L_{AB}$  et de la vitesse des gouttes  $v_{goutte}$  (Equation 14).

$$\tau_{AB} = \frac{L_{AB}}{v_{goutte}}$$

Equation 14

Au point B, les gouttes deviennent sphériques. L'efficacité de la contraction *in situ* est quantifiée par le taux de réduction du volume entre A et B ( $TR_{AB}$ ) (Equation 15), représentant le taux de perte d'eau de la goutte vers le DMC. Pour calculer le volume des plugs (gouttes allongées), on utilise l'Equation 5 de la partie B.II.2.1.

$$TR_{AB} = \frac{V_A - V_B}{V_A} \times 100\%$$

Equation 15

### I.2.1. Contraction *in situ* des gouttes dans des capillaires de différents diamètres

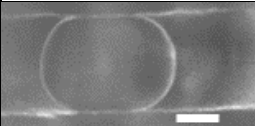
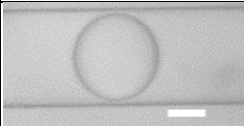
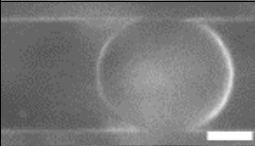
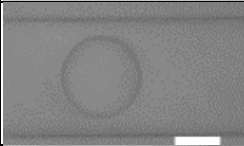
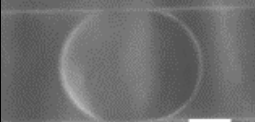
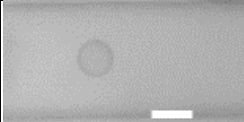
#### I.2.1.1. Dans les capillaires de 500 $\mu$ m de diamètre interne

Le Tableau 5 présente les résultats de contraction obtenus en variant  $L_{AB}$  et  $Q_{DMC}$  dans un capillaire de  $D=500\mu$ m :

- Entre les expériences 1 et 2, seul  $\tau_{AB}$  est augmenté à travers  $L_{AB}$ . On remarque alors que la contraction *in situ* augmente avec  $\tau_{AB}$ . Cela est sûrement dû au fait que l'on laisse plus de temps à l'eau pour diffuser dans le DMC.

- Entre les expériences 1 et 3,  $Q_{DMC}$  est multiplié par 2 avec  $Q_{alginate}$  fixe. On remarque alors que la contraction *in situ* augmente et ce malgré la réduction de  $\tau_{AB}$ . En effet, cela est dû au volume de DMC, donc à la distance inter-goutte  $L_d$ , séparant les gouttes qui est également multiplié par 2, ce qui permet une diffusion plus importante de l'eau des gouttes.

Tableau 5. Conditions de génération des gouttes et résultats d'expériences de contraction en utilisant les capillaires de  $D=500\mu$ m. Echelle 200 $\mu$ m ; gouttes d'alginate de  $C_i=0,02\text{wt}\%$ .

N°	$Q_{DMC}$ ( $\mu\text{L/s}$ )	$Q_{alginate}$ ( $\mu\text{L/s}$ )	$Q_{total}$ ( $\mu\text{L/s}$ )	Photos des gouttes (point A)	$L_{AB}$ (cm)	$\tau_{AB}$ (min)	Photos des gouttes (point B)	$TR_{AB}$ (%)
(1)	0,5	0,02	0,52		66	4,2		55
(2)	0,5	0,02	0,52		80	5		75
(3)	1	0,02	1,02		66	2,1		98

D'après ces expériences dans des capillaires de  $D=500\mu$ m,  $\tau_{AB}$  et  $Q_{DMC}$  contribuent à la contraction *in situ* des gouttes, avec un effet plus marqué pour  $Q_{DMC}$ .





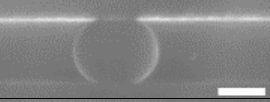

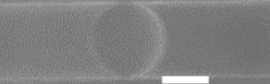
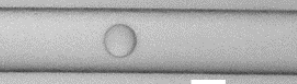
### I.2.1.2. Dans les capillaires de 150 $\mu$ m de diamètre interne

En se basant sur les résultats obtenus avec  $D=500\mu\text{m}$ , nous avons varié  $L_{AB}$  et  $Q_{DMC}$  dans un capillaire de  $D=150\mu\text{m}$ . Comme l'influence de  $Q_{DMC}$  dépend également du  $Q_{alginate}$  appliqué (qui est fixe dans le Tableau 5), nous avons appelé  $k$  le rapport  $Q_{DMC}/Q_{alginate}$ . Le Tableau 6 présente les résultats de contraction :

- Dans les expériences 1 à 3, malgré une multiplication par plus de 36 de  $\tau_{AB}$  et de plus de 6 de  $k$ , on ne remarque pas une contraction significative des gouttes.

- Dans l'expérience 4, par rapport à l'expérience 1,  $k$  est multiplié par 26,7 et on observe une contraction importante des gouttes, même si  $\tau_{AB}$  est bien plus faible que dans l'expérience 3.

Tableau 6. Conditions de génération des gouttes et résultats d'expériences de contraction en utilisant les capillaires de  $D=150\mu\text{m}$ . Echelle 100 $\mu\text{m}$  ; gouttes d'alginate de  $C_i=0,02\text{wt}\%$ .

N°	$Q_{DMC}$ ( $\mu\text{L/s}$ )	$Q_{alginate}$ ( $\mu\text{L/s}$ )	$k$	Photos des gouttes (point A)	$L_{AB}$ (cm)	$\tau_{AB}$ (min)	Photos des gouttes (point B)	$TR_{AB}$ (%)
(1)	0,3	0,2	1,5		64	0,4		0
(2)	0,3	0,1	3		288	2,1		5
(3)	0,01	0,001	10		55	14,7		14
(4)	0,2	0,005	40		25	0,4		76

Pour les deux diamètres de capillaire ( $D=500$  et  $150\mu\text{m}$ ) étudiés dans cette thèse, on peut déduire que  $\tau_{AB}$  peut influencer sur la contraction des gouttes, mais ce n'est pas le paramètre limitant. Par contre, l'influence importante de  $k$  semble montrer que le volume de DMC entre les gouttes est limitant, car le volume de DMC contrôle la quantité d'eau des gouttes qui peut diffuser pour provoquer leur contraction.

### I.2.2. Rôle de $k$ dans la contraction *in situ* des gouttes

Pour chaque goutte, l'eau diffuse à gauche et à droite dans le volume de DMC environnant (Figure 57 (a)), jusqu'à la saturation de 3wt% au maximum à 20°C (Tableau 1 de B.I.1.2.). Pour simplifier le calcul, on peut considérer que l'eau ne diffuse que dans un sens dans le DMC pour chaque goutte, par exemple à droite (Figure 57 (b)), ce qui donnera lieu à la même saturation.



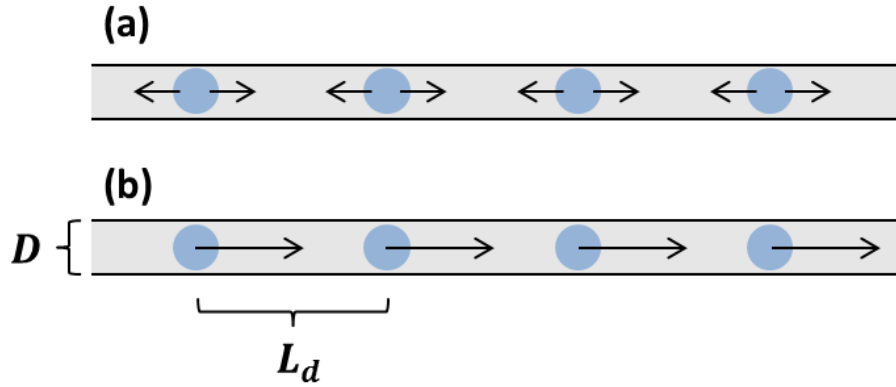


Figure 57. Schéma de la diffusion de l'eau (flèche) dans le DMC environnant (a) en réalité et (b) dans le cas simplifié.

On considère que l'espace entre les gouttes est un cylindre (en première approximation) dont la longueur  $L_d$  est la distance inter-goutte. Dans un capillaire de diamètre  $D$ , une évaluation du volume inter-goutte ( $V_d$ ) est obtenu par l'Equation 16.

$$V_d = L_d \times \pi (D/2)^2$$

Equation 16

A la fin de la diffusion de l'eau dans le DMC, le taux de réduction de la goutte ( $TR$ ) permet de calculer la masse d'eau qui est perdue par la goutte ( $m_{eau\ perdue}$ ) (Equation 17). Pour cela, on considère que la diffusion de Na-alginate dans le DMC est négligeable (Rondeau and Cooper-White 2008).

$$m_{eau\ perdue} = \rho_{eau} \times (4/3)\pi(d_i/2)^3 \times TR$$

Equation 17

Avec  $\rho_{eau}$  la densité de l'eau et  $d_i$  le diamètre initial de la goutte lors de sa génération.

Comme la solubilité de l'eau dans le DMC est de 3wt% à saturation à 20°C (Tableau 1 de B.I.1.2.), la masse d'eau absorbée au maximum par le DMC ( $m_{eau\ max}$ ) est donnée par l'Equation 18.

$$m_{eau\ max} = \rho_{DMC} \times V_d \times 3\%$$

Equation 18

Avec  $\rho_{DMC}$  la densité du DMC.

A la saturation du DMC en eau, on attend un équilibre pour le diamètre de la goutte et une réduction maximale atteinte ( $TR_{max}$ ). On peut alors prédire  $TR_{max}$  par l'Equation 19 obtenue en égalisant les Equation 17 et Equation 18. Il faut noter que l'Equation 19 peut donner un  $TR_{max}$  supérieure à 100% si  $V_d$  est supérieur au volume de DMC nécessaire pour absorber toute l'eau de la goutte.

$$TR_{max}(\%) = \frac{\rho_{DMC} \times V_d \times 3}{\rho_{eau} \times \left(\frac{4}{3}\right) \pi \left(\frac{d_i}{2}\right)^3}$$

Equation 19

Dans le cas de gouttes générées avec une forme sphérique, on peut écrire  $d_i \approx D$  et on trouve que  $TR_{max}$  est proportionnelle au ratio  $L_d/d_i$  suivant l'Equation 20 :

$$TR_{max}(\%) \approx 4,8 \times (L_d/d_i)$$

Equation 20

Cette relation permet d'expliquer l'expérience 3 du Tableau 6 qui donne peu de contraction malgré un  $\tau_{AB}$  élevé ( $\tau_{AB}=14,7\text{min}$ ). Car dans cette expérience,  $k=10$  donne  $L_d/d_i \approx 10$  (Figure 58 (a)), et donc  $TR_{max} \approx 48\%$ . Ainsi à la saturation d'eau dans le DMC, le diamètre final de la goutte vaut 80% de  $d_i$ . Le changement de diamètre est alors imperceptible (Figure 58 (b)).

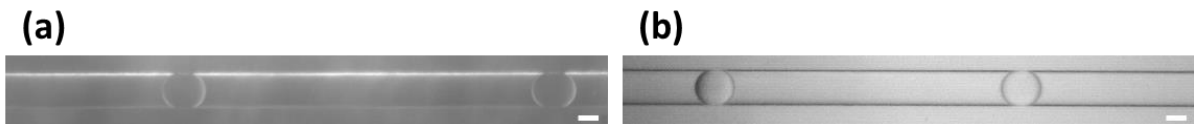


Figure 58. Image au microscope optique de gouttes obtenues avec  $k=10$  et  $\tau_{AB}=14,7\text{min}$  dans un capillaire de  $D=150\mu\text{m}$  : (a) au point A et (b) au point B. Echelle :  $100\mu\text{m}$ .

De même, l'expérience 4, réalisée avec  $k=40$ , permet d'atteindre  $L_d/d_i \approx 40$ , et donc  $TR_{max} \approx 192\%$ . La valeur de  $TR_{max}$  montre que le volume de DMC environnant de chaque goutte est supérieur à celui nécessaire pour absorber toute l'eau de la goutte. Ainsi, on observe une contraction de la goutte tout le long du capillaire jusqu'à  $TR=90\%$  (Figure 59).

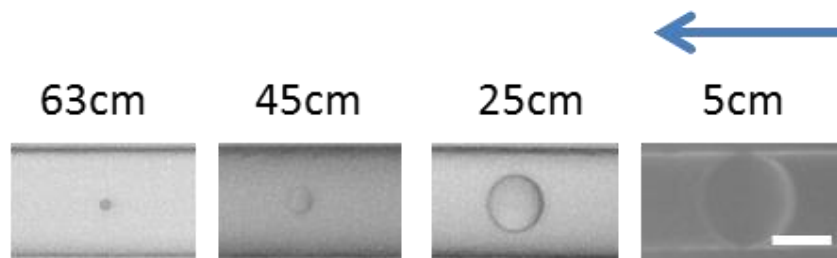


Figure 59. Image au microscope optique de gouttes obtenues avec  $k=40$  et dans un capillaire de  $D=150\mu\text{m}$  à différentes distances de la jonction en T. Echelle :  $100\mu\text{m}$ .

Nous avons donc montré que la contraction *in situ* des gouttes pouvait être contrôlée par le ratio  $L_d/d_i$ , qui dépend de  $k$ . Comme nous pouvons imposer une valeur élevée de  $k$  avec des valeurs de  $Q_{alginate}$  et de  $Q_{DMC}$  différentes, nous avons également étudié l'influence des débits totaux ( $Q_{TOT}$ ).

### I.2.3. Influence de $Q_{TOT}$ sur la contraction *in situ* des gouttes

Nous avons exploré l'influence de  $Q_{TOT}$  pour deux gammes de valeurs : relativement élevées de 0,4-0,9 $\mu\text{L/s}$  et relativement faibles de 0,011-0,06 $\mu\text{L/s}$ . Et nous avons varié  $k$  au maximum jusqu'à 10. La Figure 60 montre les photos des gouttes prises en A.

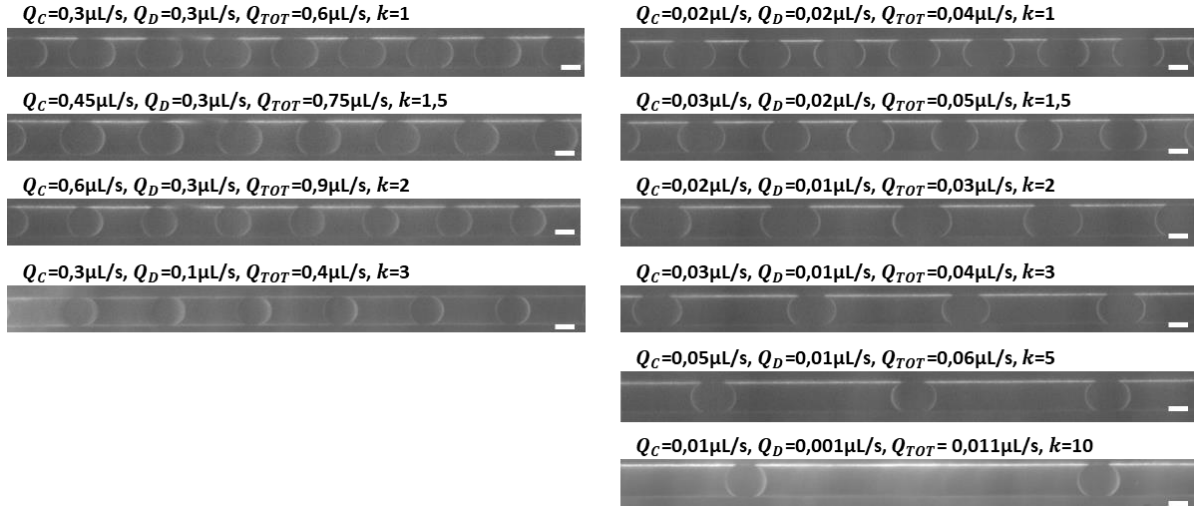


Figure 60. Images au microscope optique de gouttes d'eau générées dans du DMC dans deux gammes de  $Q_{TOT}$  et à différents  $k$  pour chaque  $Q_{TOT}$ , observées au point A du montage (Figure 56). Echelle : 100 $\mu\text{m}$ .

Le ratio  $L_d/d_i$ , calculé à partir des mesures de  $L_d$  et  $d_i$  sur les images, est tracé en fonction de  $k$  (Figure 61). Nous remarquons que dans la même catégorie de  $Q_{TOT}$ ,  $L_d/d_i$  augmente linéairement avec  $k$ . Et la pente croit lorsque  $Q_{TOT}$  diminue, ce qui montre qu'à  $Q_{TOT}$  faible,  $L_d/d_i$  est plus sensible à  $k$ . Ce résultat est cohérent avec la littérature (Zhang et al. 2015). Par ailleurs, d'après l'équation 12,  $L_d/d_i=20,8$  donne un  $TR_{max}$  de 100% et au-delà de cette valeur le DMC est toujours insaturé.

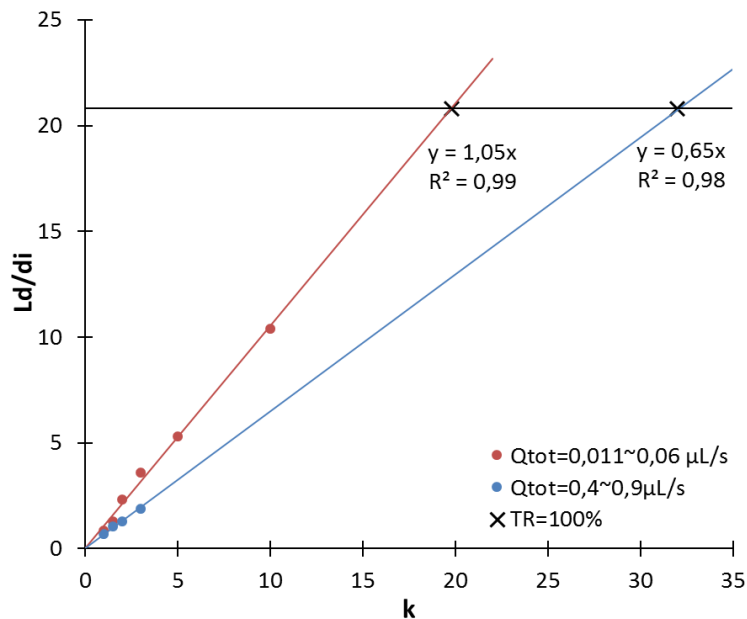


Figure 61.  $L_d/d_i$  en fonction de  $k$  pour des valeurs de  $Q_{TOT}$  faibles (en rouge) et élevées (en bleu), à partir des mesures sur les images de la Figure 60. La ligne noire représente  $L_d/d_i=20,8$  correspondant à  $TR_{max}$  de 100%. Les barres d'erreur sont dans la taille des symboles.

Cependant, comme le niveau de la contraction *in situ* est très élevé, les gouttes deviennent très petites par rapport à la taille du capillaire (Figure 62 (a)). Elles sont alors mobiles dans le capillaire et ont tendance à se rapprocher les unes des autres au cours de leurs parcours dans le capillaire (Figure 62 (b-d)). Elles peuvent également se rapprocher de la paroi (Figure 62 (e)), ce qui peut générer un colmatage du capillaire. Ce phénomène est aussi observé dans l'étude de Sugaya et al. sur la contraction *in situ* de gouttes de Na-alginate dans l'acétate de méthyle (A.IV.3.1.) (Sugaya et al. 2011).



Figure 62. Images au microscopes optique de gouttes observées vers l'extrémité du capillaire de  $D=150\mu\text{m}$  (à 63cm de la jonction en T) avec  $k=40$ . Echelle :  $100\mu\text{m}$ .

D'après les influences de  $\tau_{AB}$ , de  $k$  et de  $Q_{TOT}$ , que nous avons mis en évidence, nous pouvons jouer sur ces 3 paramètres pour aboutir à un compromis entre la taille des gouttes en sortie de capillaire et leur isolement (gouttes indépendantes) le long du capillaire. Cependant, ce compromis nécessite une contraction supplémentaire à celle *in situ* pour atteindre une taille proche de celle des GRs, que nous réalisons *ex situ* lors de la collecte.

### **I.3. Collecte des gouttes et contraction *ex situ***

#### **I.3.1. Préparation des microparticules de Na-alginate**

Après la sortie des gouttes à l'extrémité du capillaire, elles sont collectées dans une boîte de Pétri contenant du DMC afin de poursuivre leur contraction. On parlera de la contraction *ex situ*. Pour les observer, le deuxième microscope en transmission a été déplacé vers l'extrémité du capillaire (Figure 63). Ainsi on se focalise sur la sortie des gouttes dans le DMC au point B. On peut évaluer la coalescence des gouttes en sortie par l'homogénéité de leur taille et de leur fréquence. Un ventilateur permet de souffler de l'air et éviter la coalescence des gouttes (B.I.2.2.). Lorsque la contraction *ex situ* est achevée, on les observe en faisant la mise au point du microscope sur le fond de la boîte de Pétri, au point C.

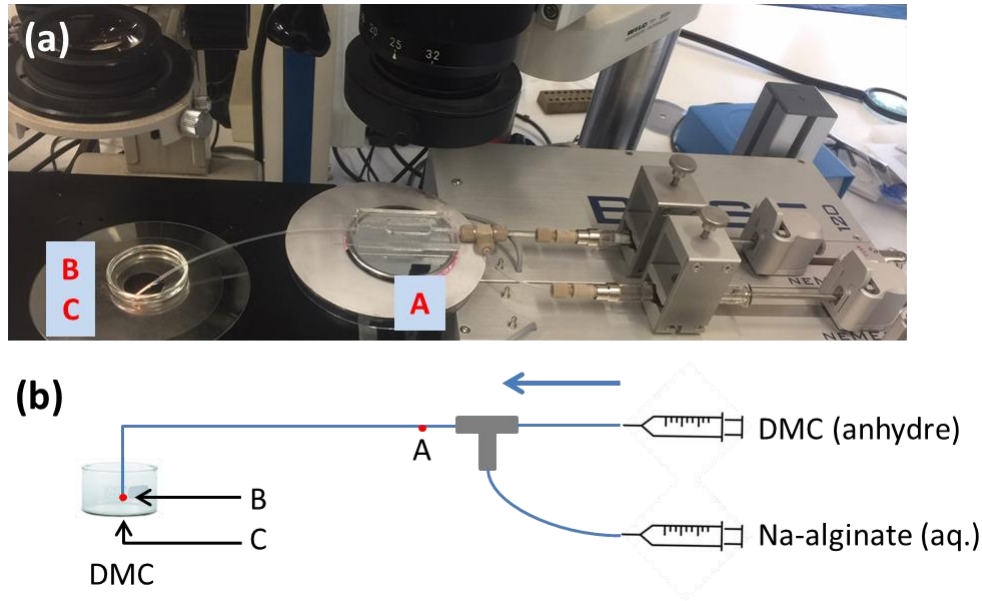


Figure 63. Photographie (a) et schéma (b) du montage pour l'observation des gouttes lors de (A) la génération des gouttes dans un capillaire de  $D=150\mu\text{m}$  ; (B) leur sortie après la contraction *in situ* et (C) après leur contraction *ex situ* dans le DMC.

La Figure 64 montre un exemple des observations au point A, B et C respectivement. Dans cette expérience, les gouttes générées ont un diamètre initial ( $d_i$ ) d'environ  $118\mu\text{m}$  (point A). Après la contraction *in situ*, leur diamètre se réduit à  $83\mu\text{m}$  à l'extrémité du capillaire (point B), et donc  $TR_{AB}=65\%$ . Enfin la contraction *ex situ* après la collecte transforme les gouttes en **microparticules de Na-alginate** dont le diamètre final ( $d_f$ ) est de  $11,7\mu\text{m}$  (point C). Ainsi, on montre la faisabilité de notre système microfluidique pour la préparation de microparticules avec un diamètre d'une dizaine de  $\mu\text{m}$ , à partir de la génération des gouttes avec un diamètre d'une centaine de  $\mu\text{m}$ .

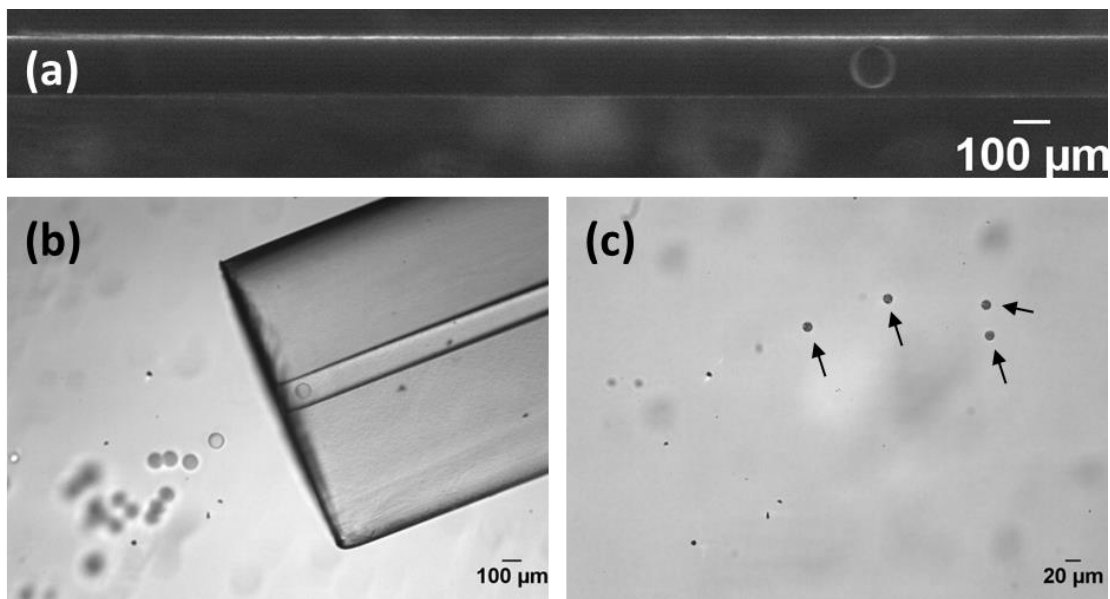


Figure 64. Images au microscope optique de gouttes de Na-alginate observées avec le montage de la Figure 63: (a) au point A ; (b) au point B et (c) au fond de la boîte de Pétri au point C. Conditions de préparation :  $C_i=0,06\text{wt}\%$ ,  $Q_{DMC}=0,3\mu\text{L/s}$  et  $Q_{alginate}=0,01\mu\text{L/s}$ .

Nous avons vérifié la robustesse de la méthode microfluidique en mesurant le diamètre final ( $d_f$ ) de 2386 microparticules préparées avec des conditions expérimentales données ( $C_i = 0,25\text{wt}\%$ ,  $Q_{DMC} = 0,15\mu\text{L/s}$  et  $Q_{alginate} = 0,005\mu\text{L/s}$ ,  $L_{AB} = 20\text{cm}$ ). Les microparticules sont produites avec une fréquence de 2 microparticules/s. L'histogramme de la Figure 65 montre que la distribution de  $d_f$  suit une loi normale centrée autour d'une taille de  $27,5\mu\text{m}$  avec un écart type de  $0,5\mu\text{m}$ .

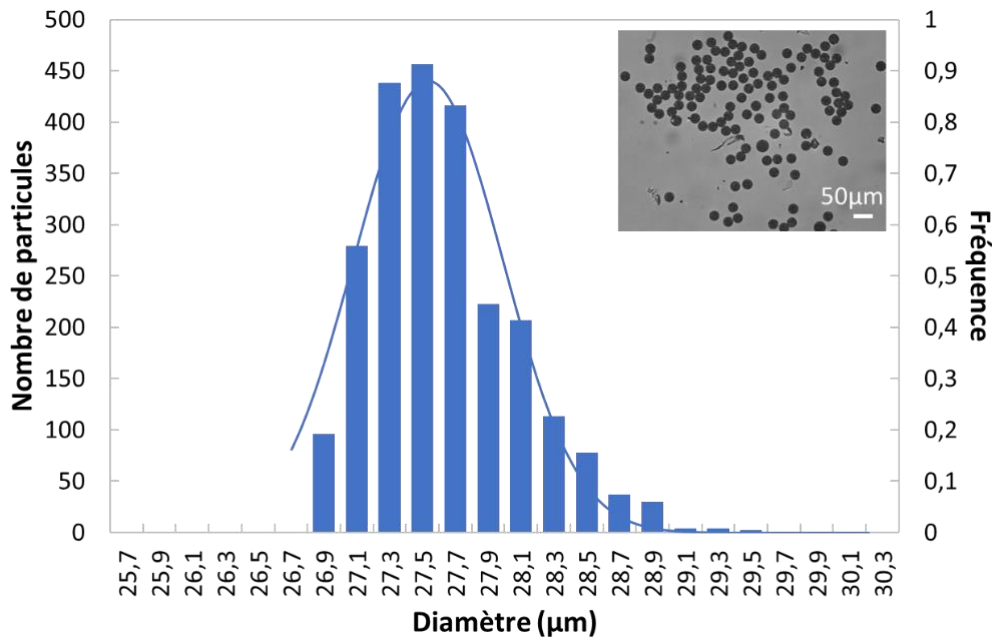


Figure 65. Distribution de  $d_f$  des microparticules de Na-alginate. La courbe présente l'ajustement Gaussien centré sur  $d_f=27,5\pm 0,5\mu\text{m}$ . Conditions de préparation :  $C_i=0,25\text{wt}\%$ ,  $Q_{DMC}=0,15\mu\text{L/s}$  et  $Q_{alginate}=0,005\mu\text{L/s}$  et  $L_{AB}=20\text{cm}$ .

La méthode microfluidique développée permet donc de préparer des microparticules de Na-alginate de taille monodisperse, et ceci sans utilisation de tensioactif. De plus, en réduisant la taille des gouttes à travers la diffusion de solvant, nous augmentons la concentration des microparticules. Pour la suite, notre objectif est de contrôler leur diamètre final ( $d_f$ ) et leur concentration finale ( $C_f$ ) afin de répondre aux propriétés attendues pour mimer les GRs.

### 1.3.2. Contrôle du diamètre final ( $d_f$ ) des microparticules de Na-alginate

Les expériences sont réalisées en variant le diamètre initial des gouttes ( $d_i$ ) et la concentration initiale de Na-alginate ( $C_i$ ). Pour cela, la gamme de  $d_i$  est de  $110\text{-}220\mu\text{m}$  et elle est réglée par les débits. Quant à  $C_i$ , la gamme est de  $0,006\text{-}1\text{wt}\%$  et elle est simplement contrôlée par les quantités d'alginate et d'eau utilisées pour la préparation des solutions d'alginate de sodium. Il est à noter que nous nous plaçons dans les conditions optimales de  $\tau_{AB}$ ,  $k$  et  $Q_{TOT}$  dans le but de collecter les gouttes sans coalescence après la contraction *in situ*, sachant que la contraction se poursuit *ex situ* dans du DMC. La Figure 66 (a) montre les résultats obtenus en variant  $d_i$  pour chaque  $C_i$ . Chaque point est basé sur au moins 50 mesures de  $d_i$  et de  $d_f$  respectivement. Nous notons que  $d_f$  augmente avec  $d_i$  et  $C_i$ .

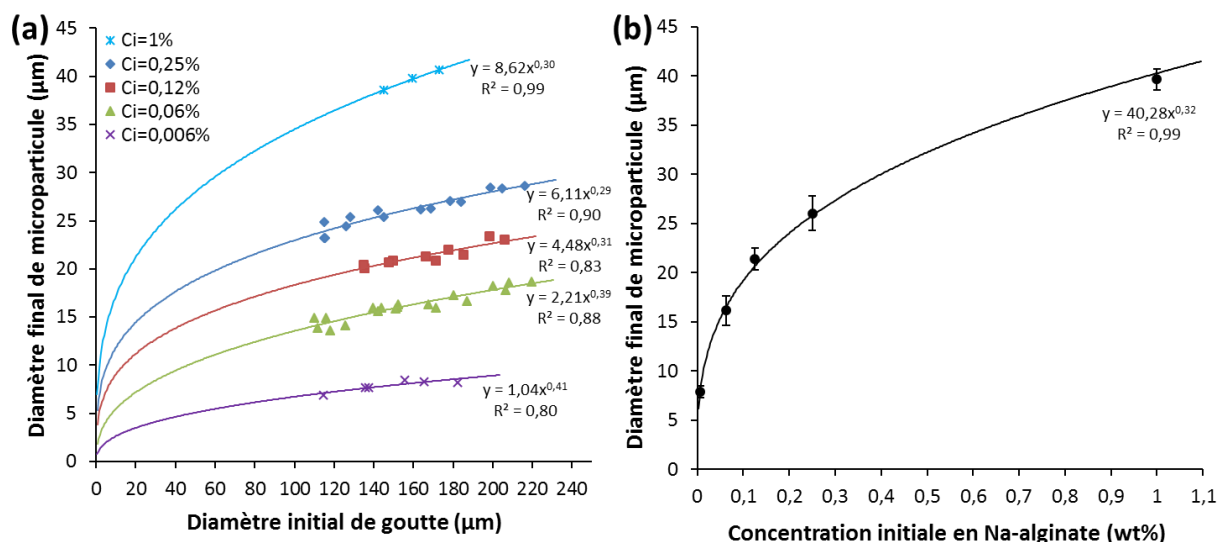


Figure 66. Représentation de (a)  $d_f$  en fonction de  $d_i$  pour différentes concentrations initiales de Na-alginate ( $C_i$ ), avec les barres d'erreur de  $d_i$  et de  $d_f$  dans la taille des symboles ; (b)  $\bar{d}_f$  (moyenne de  $d_f$ ) en fonction de  $C_i$ , avec les barres d'erreur représentées pour chaque point.

Nous comparons nos résultats avec la préparation de microparticules de poly(styrène sulfonate) de sodium (NaPSS) par la méthode d'injection (Figure 67 (a)) par Yang et al. A l'aide d'un transducteur piézoélectrique, une solution de NaPSS est injectée goutte à goutte dans un bain contenant du butan-1-ol. Le principe de la formation des microparticules est similaire à celui de notre étude. En effet l'eau des gouttes de NaPSS est partiellement soluble dans le butan-1-ol, ce qui transforme les gouttes en microparticules. Ils retrouvent alors une croissance de  $d_f$  avec  $d_i$  et avec la concentration en NaPSS (Figure 67 (b)).

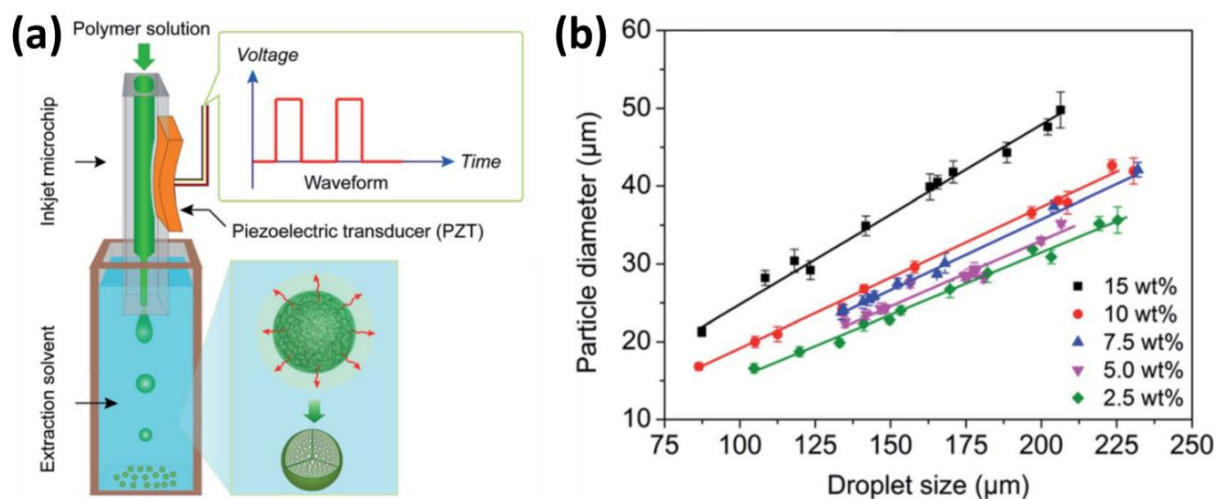


Figure 67. (a) Schéma de la préparation de microparticules de NaPSS par l'injection de gouttes dans un bain de butan-1-ol ; (b) Diamètre de microparticules de NaPSS en fonction du diamètre des gouttes générées à différentes concentrations initiales. (Yang et al. 2015)

Dans notre étude, pour chaque  $C_i$ , la courbe de  $d_f$  en fonction de  $d_i$  peut être décrite avec une loi de puissance de la forme  $y = Ax^B$ . Cette loi d'ajustement est la plus cohérente car elle satisfait la condition initiale à  $d_i = 0, d_f = 0$ . On remarque que la constante  $A$  augmente avec  $C_i$  et l'exposant  $B$  est autour de 0,3-0,4. Comme  $d_f$  varie peu dans les gammes de  $d_i$  explorées, on peut définir une valeur moyenne  $\overline{d_f}$  pour chaque  $C_i$ . La Figure 66 (b) montre que  $\overline{d_f}$  en fonction de  $C_i$  suit également une loi de puissance qui satisfait la condition initiale à  $C_i = 0, d_f = 0$ . En effet, cette condition est importante car une goutte qui ne contient pas de Na-alginate va évidemment se contracter complètement dans le bain de DMC (*ex situ*). En pratique, cette loi de puissance peut être utilisée pour prédire  $C_i$  qui permettra d'aboutir à une valeur de  $d_f$  souhaitée. Ainsi, nous obtenons des microparticules de Na-alginate avec  $d_f = 7,7 \pm 0,3 \mu\text{m}$  (Figure 68) en utilisant au départ une solution très diluée de Na-alginate ( $C_i = 0,006 \text{wt}\%$ ). Il est donc possible de produire des microparticules de taille reproductible proche de celles des GRs par notre méthode microfluidique.

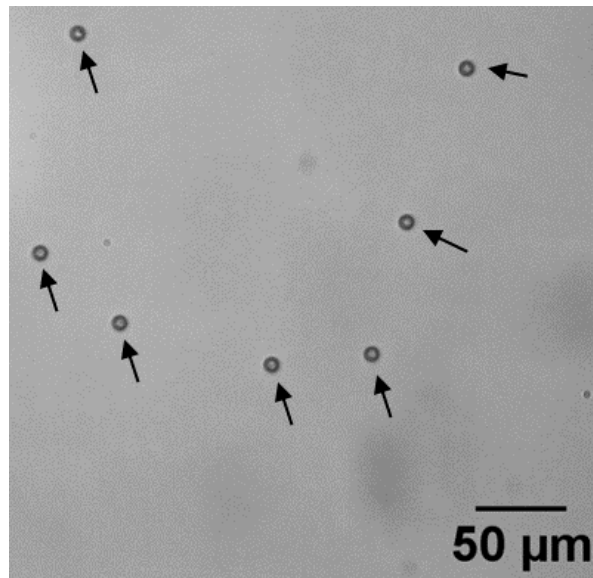


Figure 68. Image au microscope optique de microparticules de Na-alginate ( $d_f = 7,7 \pm 0,3 \mu\text{m}$ , 50 microparticules mesurées). Conditions de la génération de gouttes :  $C_i = 0,006 \text{wt}\%$ ,  $Q_{DMC} = 0,15 \mu\text{L/s}$  et  $Q_{alginate} = 0,005 \mu\text{L/s}$ .

### 1.3.3. Contrôle de la concentration finale ( $C_f$ ) des microparticules de Na-alginate

La connaissance de la concentration finale de Na-alginate ( $C_f$ , en wt%) dans les microparticules de Na-alginate peut être importante pour l'étape de gélification et pour comprendre leurs propriétés. Après la diffusion de l'eau, en connaissant  $C_i$  et  $d_f$ , j'ai établi une équation permettant de calculer  $C_f$ . D'une part, la masse initiale de Na-alginate ( $m_{i,alg}$ ) est calculé à partir de la masse initiale de la goutte ( $m_{i,goutte}$ ) et de  $C_i$  (en wt%) (Equation 21). Pour cela,  $m_{i,goutte}$  est obtenue avec la densité ( $\rho_{i,goutte}$ ) et le volume de la goutte ( $V_{i,goutte}$ ).

$$m_{i,alg} = m_{i,goutte} \times C_i = \rho_{i,goutte} \times V_{i,goutte} \times C_i$$

Equation 21



D'autre part, dans la microparticule de Na-alginate, la masse finale de Na-alginate ( $m_{f,alg}$ ) est calculée de la même manière avec l'Equation 22. Pour déterminer la masse finale de la particule ( $m_{f,particule}$ ), on suppose que, dans le processus de la diffusion de solvant, la diffusion de Na-alginate d'une goutte dans le DMC est négligeable, ce qui est confirmé dans la littérature (Rondeau and Cooper-White 2008). On peut alors considérer que la perte de masse, lors de la transformation d'une goutte en une microparticule, est due essentiellement à la perte d'eau.

$$m_{f,alg} = m_{f,particule} \times C_f = [m_{i,goutte} - \rho_{eau} \times (V_{i,goutte} - V_{f,particule})] \times C_f$$

Equation 22

Pour simplifier, on peut supposer dans cette étude que  $\rho_{i,goutte} \approx \rho_{eau}$  car les solutions de Na-alginate que l'on utilise sont toujours diluées ( $C_i \leq 1\text{wt}\%$ ). De plus, comme la masse de Na-alginate est constante, on égalise les Equation 21 et Equation 22 et on trouve l'Equation 23 pour calculer  $C_f$ .

$$C_f = C_i \times (V_{i,goutte}/V_{f,particule}) = C_i \times (d_i/d_f)^3$$

Equation 23

Avec les données de la Figure 66,  $C_f$  est calculée et tracée en fonction de  $d_i$  pour les différentes valeurs de  $C_i$  (Figure 69).

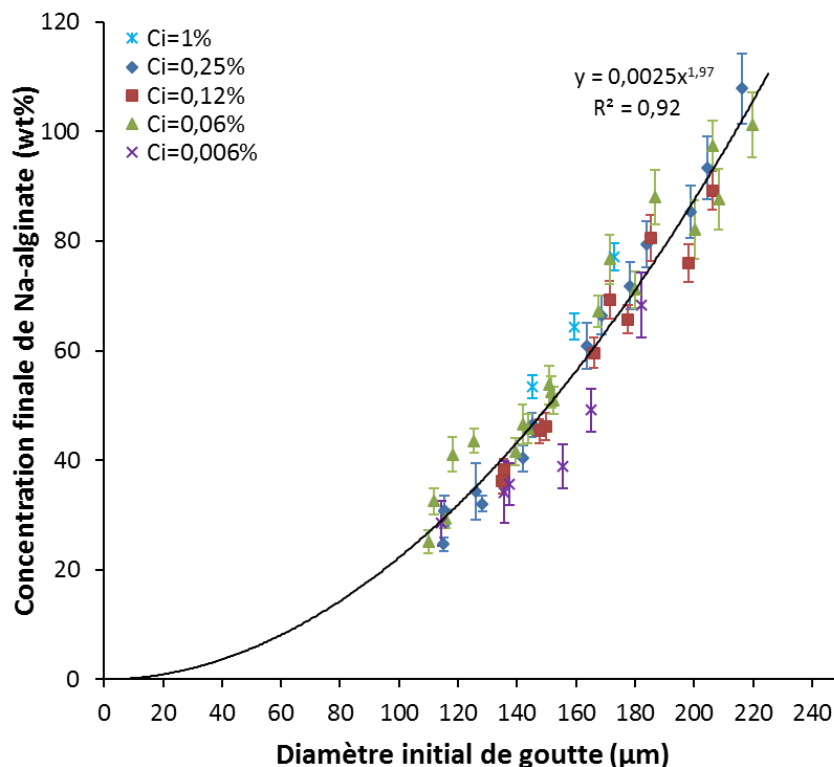


Figure 69. Concentration finale en Na-alginate des microparticules ( $C_f$ ) en fonction du diamètre initial des gouttes ( $d_i$ ), préparées à différentes concentrations initiales de Na-alginate ( $C_i$ ). Les barres d'erreur sont représentées pour chaque point.

On remarque que  $C_f$  varie de 20 à 100wt% et augmente avec  $d_i$ . Par contre, l'effet de  $C_i$  sur  $C_f$  n'est pas significatif. En effet, tous les points se trouvent autour d'une loi de puissance, en cohérence avec la Figure 66 (a), ce qui montre que l'on peut contrôler  $C_f$  à partir de  $d_i$ .

Pour conclure, dans ce chapitre, nous présentons une méthode microfluidique pour la préparation des microparticules de Na-alginate. La première étape consiste à générer dans un capillaire des gouttes de Na-alginate, dans un flux de DMC dans lequel l'eau est partiellement miscible. La taille initiale des gouttes est contrôlée par les débits de la phase continue de DMC et de la phase dispersée de Na-alginate. Ensuite, les gouttes de Na-alginate subissent une contraction *in situ* tout le long du capillaire dû au DMC. On trouve que cette contraction est influencée par la distance inter-goutte qui est contrôlée par le ratio des débits et le débit total. En collectant les gouttes dans le DMC, la contraction se poursuit *ex situ*, produisant des microparticules de Na-alginate qui deviennent très concentrées et dont la taille se rapproche de celles des GRs. La taille finale est notamment liée à la concentration initiale, et la concentration finale est principalement influencée par la taille initiale des gouttes.

Cependant, dans le cadre du projet ANR **CUMBA**, ces microparticules ne sont pas adaptées sous leur forme Na-alginate. En effet, pour les mesures ultrasonores qui seront effectuées en milieu aqueux (au LMA), leur défaut est leur solubilité dans l'eau. Et pour les mesures optiques (à l'IRPHE) qui demandent des microparticules transparentes, leur défaut est leur opacité au microscope optique.

## Chapitre II. Préparation de microparticules de Ca-alginate

Suite à l'étude menée au Chapitre I, nous savons préparer des microparticules de Na-alginate monodisperses, sans utiliser de tensioactifs, avec une taille contrôlée proche de celles des GRs (Figure 68). Cependant malgré l'aspect solide des microparticules, elles ne sont pas gélifiées, ce qui les rend solubles dans l'eau. Nous ne pouvons donc pas les disperser en solution aqueuse pour les utiliser comme mimes de GRs dans la phase de calibration de l'outil ultrasonore du projet ANR. Nous avons donc étudié dans une seconde étape la réticulation ionique de l'alginate avec des cations de calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) afin d'obtenir des microparticules de Ca-alginate insoluble dans l'eau. Le calcium est introduit, sous la forme d'une solution de sel de chlorure de calcium ( $\text{CaCl}_2$ ) (B.I.1.1.2.), soit dans le capillaire de  $150\mu\text{m}$ , soit dans le bain de collecte. On parle alors de « Gélification *in situ* » et de « Gélification *ex situ* » respectivement.

### II.1. Gélification *in situ*

Pour la gélification *in situ*, on peut générer les gouttes dans du DMC soit en injectant un pré-mélange de solution de Na-alginate et de solution de  $\text{CaCl}_2$  dans une entrée d'une jonction en T, soit en mélangeant les 2 solutions par deux entrées d'une jonction en croix (B.I.2.1.2.).

#### II.1.1. Par injection du mélange de Na-alginate et de $\text{CaCl}_2$ dans une jonction en T

Dans un premier temps, les solutions de Na-alginate et de  $\text{CaCl}_2$  sont préparées séparément, à des concentrations identiques de 0,12wt%. Ensuite on les mélange avec un ratio en masse de 50/50, ce qui donne une solution de Ca-alginate dont la concentration en alginate est donc 0,06wt%. Cette solution est injectée par une des entrées d'une jonction en T en tant que phase dispersée, et du DMC est injecté en tant que phase continue dans l'autre entrée. Le montage utilisé (Figure 70) ressemble à celui présenté auparavant pour la préparation de microparticules de Na-alginate (Figure 63 (b)). Les gouttes de Ca-alginate sont d'abord observées au point A, puis après la contraction *in situ* dans le DMC, au point B à l'extrémité du capillaire. Enfin elles sont collectées dans un bain de DMC et la contraction *ex situ* est observée au point C au fond de la boîte de Pétri.

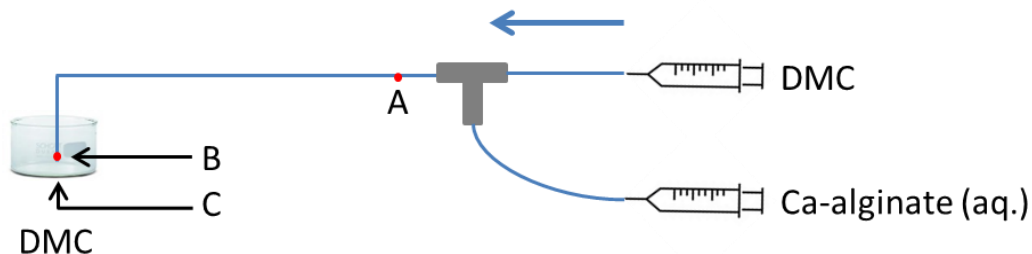


Figure 70. Schéma du montage de la gélification *in situ* en injectant le mélange de Na-alginate et de  $\text{CaCl}_2$  dans une jonction en T.

D'après l'observation au point A, les gouttes apparaissent régulières en taille et en fréquence au début. Cependant, de temps en temps l'écoulement devient saccadé et la taille des gouttes varie. En effet, malgré les faibles concentrations utilisées, il semble que le mélange de Na-alginate et de  $\text{CaCl}_2$  est déjà sous forme de gel dans la seringue, mais sûrement de façon inhomogène. Au point B, les gouttes sont légèrement contractées et au point C, la contraction *ex situ* transforme les gouttes en microparticules de Ca-alginate. Cependant leur taille est inhomogène suite aux perturbations subies lors de la génération des gouttes. La pré-gélification avant la génération des gouttes doit donc être évitée, ce qui est cohérent avec l'étude bibliographique (A.IV.1.1.) (Trivedi et al. 2010).

### II.1.2. Par le mélange de Na-alginate et $\text{CaCl}_2$ dans une jonction en croix

Les solutions de Na-alginate et de  $\text{CaCl}_2$  sont injectées séparément dans deux entrées et le DMC dans une troisième entrée d'une jonction en croix (Figure 71). Le mélange de Na-alginate et  $\text{CaCl}_2$  se fait dans la jonction et les gouttes du mélange sont directement générées dans le DMC. Puis la gélification débute dans chaque goutte.

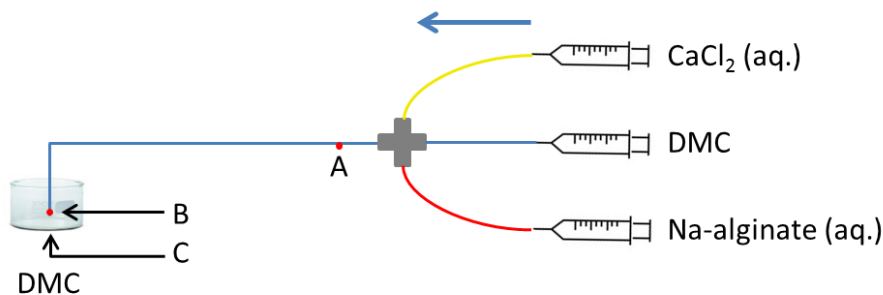


Figure 71. Schéma du montage de gélification *in situ* en mélangeant le Na-alginate et le  $\text{CaCl}_2$  après injection dans deux entrées d'une jonction en croix.

Un montage similaire a été appliqué par Zhang et al. pour générer des gouttes par « flow-focusing » (A.IV.1.1.) en injectant du  $\text{CaCl}_2$  (0,1wt%), du Na-alginate (0,5wt%) et de l'huile minérale. Cependant, ils n'ont pas réussi à générer des gouttes car un jet de gel se forme avec des « nœuds ». Selon eux, le mélange entre Na-alginate et  $\text{CaCl}_2$  entraîne aussitôt une gélification, ce qui augmente la viscosité de la phase aqueuse et perturbe la génération de gouttes. Pour prévenir ce phénomène, nous utilisons des solutions beaucoup moins concentrées :  $C_{\text{Na-alginate}}=0,006\text{wt}\%$  et  $C_{\text{CaCl}_2}=0,002\text{wt}\%$ . Afin de vérifier l'efficacité du mélange ainsi que l'homogénéité des gouttes, nous avons coloré les solutions en jaune et rouge, comme indiqué dans la Figure 71. Les solutions de  $\text{CaCl}_2$  et de Na-alginate sont injectées avec le même débit et nous varions la valeur de ce débit.

Sur la Figure 72, chaque expérience (représentée par un symbole) dépend du débit de DMC ( $Q_{\text{DMC}}$ ) qui entraîne les gouttes dans le capillaire, et du ratio  $k$  entre le débit de la phase continue et le débit de la phase dispersée  $Q_{\text{DMC}}/(Q_{\text{alginate}} + Q_{\text{CaCl}_2})$ . Les droites en pointillés correspondent aux 2 ratios de débits  $k$  délimitant les zones d'homogénéité de la génération des gouttes.

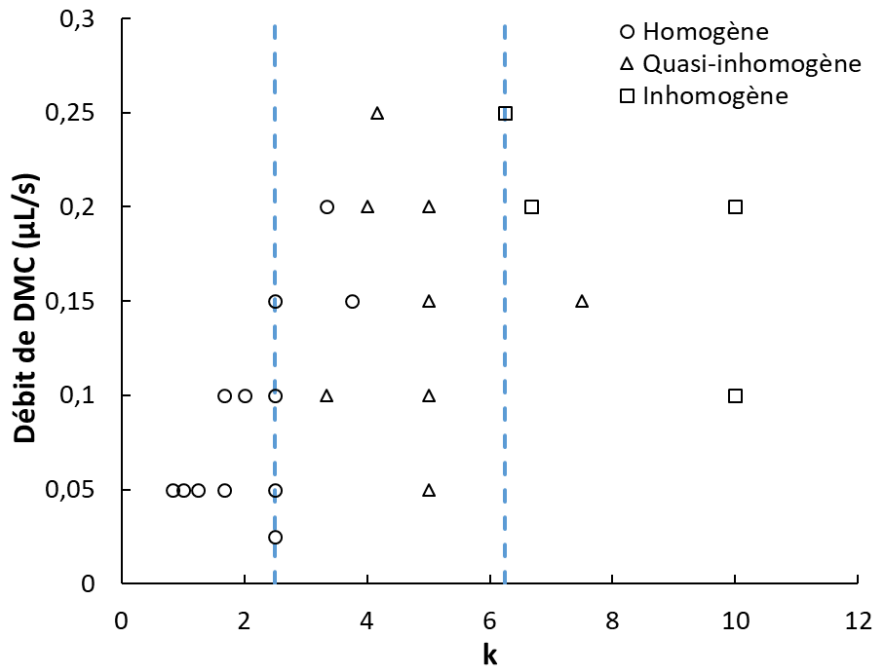


Figure 72. Homogénéité de la génération des gouttes en représentant  $Q_{DMC}$  en fonction de  $k$ . Les expériences sont effectuées avec une jonction en croix (Figure 71).

D'après les résultats de la Figure 72, les gouttes peuvent se trouver dans 3 situations :

- Pour  $k \leq 2,5$ , la génération de gouttes est homogène en termes de taille et de fréquence (Figure 73 (a)). Leur couleur orange (non visible sur la Figure 73 (a)) témoigne d'une concentration et donc d'un mélange également homogène.

- Lorsque  $k$  augmente ( $2,5 < k < 6,25$ ), les gouttes se forment d'abord régulièrement. Puis après quelques minutes, les gouttes présentent des tailles différentes. Je note donc cette situation comme « Quasi-inhomogène » (Figure 72).

- Enfin pour  $k \geq 6,25$ , les gouttes sont inhomogènes en taille et fréquence dès le début des expériences (Figure 73 (b)). Cette valeur de  $k$  élevée conduit à un cisaillement important des phases dispersées par le flux de DMC. On peut alors comprendre que la formation des gouttes soit perturbée.

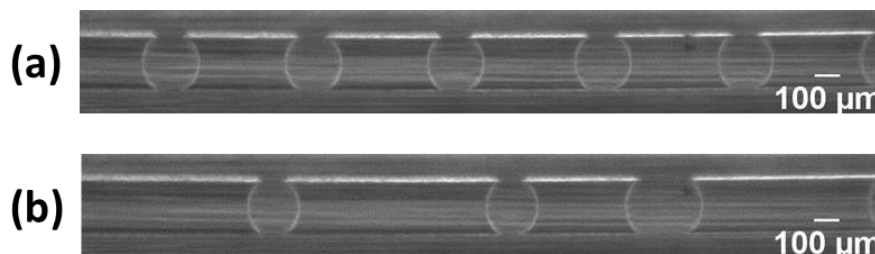


Figure 73. Gouttes générées avec une jonction en croix et observées dans le capillaire. Conditions de débits : (a)  $Q_{DMC} = 0,1 \mu\text{L/s}$  et  $Q_{alginate} = Q_{CaCl_2} = 0,02 \mu\text{L/s}$  ; (b)  $Q_{DMC} = 0,25 \mu\text{L/s}$  et  $Q_{alginate} = Q_{CaCl_2} = 0,02 \mu\text{L/s}$ .

Nous notons donc que les gouttes formées en mélangeant les solutions de Na-alginate et de  $\text{CaCl}_2$  dans la jonction en croix sont homogènes si  $k \leq 2,5$ . Cependant, l'observation des gouttes en B de la Figure 71 montre qu'elles coalescent à la sortie du capillaire. En effet, un faible  $k$  mène à des gouttes proches les unes des autres et comme elles subissent un ralentissement à la sortie du capillaire, elles coalescent plus facilement. Nous devons donc conserver  $k \leq 2,5$  afin d'atteindre une homogénéité en taille et en fréquence des gouttes mais nous devons également trouver un moyen pour éloigner d'avantage les gouttes dans le capillaire afin d'éviter leur coalescence.

### II.1.3. Par le mélange de Na-alginate et $\text{CaCl}_2$ dans une jonction en croix puis ajout de DMC dans une jonction en T

Nous conservons le ratio  $Q_{DMC}/(Q_{alginate} + Q_{CaCl_2})$  égal à 2,5 avec  $(Q_{alginate} + Q_{CaCl_2}) = 0,04 \mu\text{L/s}$  et  $Q_{DMC} = 0,1 \mu\text{L/s}$ . Et les gouttes se forment à travers une jonction en croix avec une taille et une fréquence homogène comme précédemment. Puis nous injectons du DMC avec un débit  $Q'_{DMC}$  par une jonction en T qui est ajoutée après celle en croix (Figure 74). L'objectif est d'espacer les gouttes après la jonction en T afin d'éviter la coalescence à l'extrémité du capillaire (au point B). Cependant, cet ajout de DMC ne doit pas perturber l'homogénéité des gouttes générées dans la jonction en croix en amont et ceci est observé au point A.

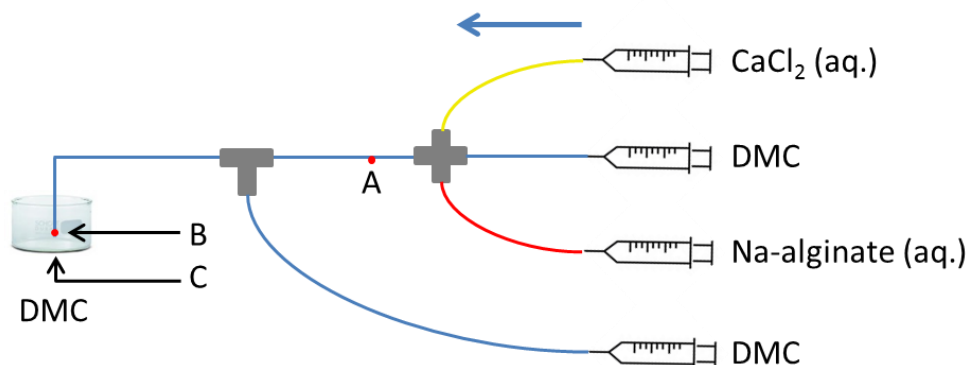


Figure 74. Schéma du montage de gélification *in situ* en mélangeant le Na-alginate et le  $\text{CaCl}_2$  après injection dans deux entrées d'une jonction en croix et en éloignant les gouttes par injection de DMC avec une seconde jonction en T.

Pour évaluer l'influence de  $Q'_{DMC}$  sur l'homogénéité des gouttes, nous varions  $Q'_{DMC}$  de 0 à  $2 \mu\text{L/s}$ . Quand  $Q'_{DMC} > 0,5 \mu\text{L/s}$  (Figure 75 (a)), les gouttes sont inhomogènes en taille et en fréquence au point A. Cela signifie que l'ajout d'un second flux de DMC dans la jonction en T perturbe la génération des gouttes dans la jonction en croix, ce qui est lié à la pression hydraulique exercée due à la valeur de  $Q'_{DMC}$  élevée. Alors que pour  $Q'_{DMC} \leq 0,5 \mu\text{L/s}$ , les gouttes au point A sont homogènes (Figure 75 (b)). De plus, elles sont plus espacées, selon l'observation au point B, ce qui permet d'éviter la coalescence à l'extrémité du capillaire lors de la collecte.

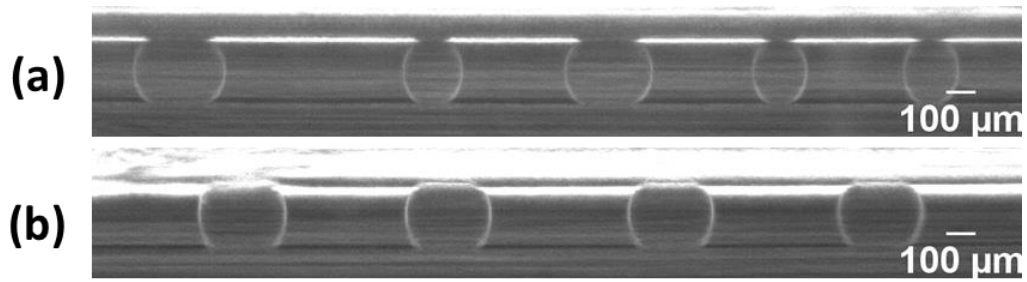


Figure 75. Gouttes générées avec une combinaison de jonctions en croix et en T et observées dans le capillaire au point A (Figure 74). Conditions de débits :  $Q_{DMC} = 0,1\mu\text{L/s}$ ,  $(Q_{alginate} + Q_{CaCl_2}) = 0,04\mu\text{L/s}$  et (a)  $Q'_{DMC} = 2\mu\text{L/s}$  ; (b)  $Q'_{DMC} = 0,5\mu\text{L/s}$ .

Enfin, pour  $Q'_{DMC} \leq 0,5$ , l'observation au fond de la boîte de Pétri au point C (Figure 76) montre qu'après les contractions *in situ* et *ex situ*, les microparticules de Ca-alginate obtenues sont toutes oranges foncées. Certaines sont sphériques et d'autres sont un peu déformées. D'après la littérature, la déformation est due à la compétition entre deux réactions : la gélification et l'extraction d'eau qui ont lieu en même temps (Marquis et al. 2014). Pour l'application des microparticules en tant que mimes des GRs, leur forme non sphérique n'est pas adaptée aux mesures ultrasonores. Pour cette raison, la méthode présentée ci-dessus doit être améliorée afin d'avoir une forme sphérique. Nous séparons donc les étapes de contraction et de gélification des gouttes.

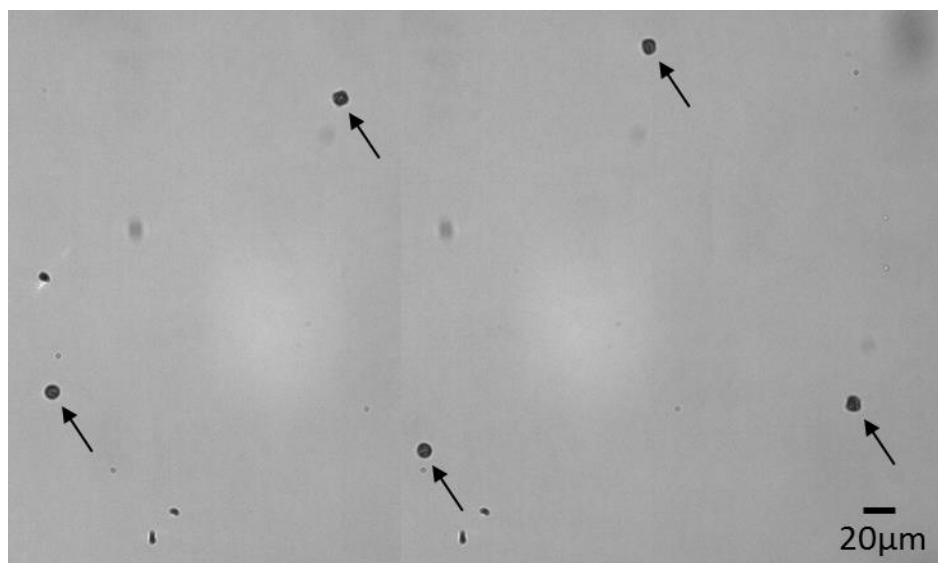


Figure 76. Microparticules de Ca-alginate préparées par gélification *in situ* avec une combinaison de jonctions en croix et en T. Conditions de débits :  $Q_{DMC} = 0,1\mu\text{L/s}$ ,  $(Q_{alginate} + Q_{CaCl_2}) = 0,04\mu\text{L/s}$  et  $Q'_{DMC} = 0,5\mu\text{L/s}$ .

## II.2. Gélification *ex situ*

Des gouttes de Na-alginate sont d'abord générées dans du DMC avec une jonction en T, puis une contraction *in situ* se déroule dans le capillaire comme nous l'avons vu dans la partie C.1.2. Ensuite on procède à la gélification en dehors du capillaire donc *ex situ*. L'agent de gélification est le  $\text{CaCl}_2$  et la différence entre les expériences présentées dans la suite est liée au moment où il est ajouté et au milieu dans lequel il se trouve.

### II.2.1. Ajout de $\text{CaCl}_2$ lors de la collection

Le  $\text{CaCl}_2$  peut être rajouté juste à la sortie du capillaire en collectant les gouttes dans une solution aqueuse de  $\text{CaCl}_2$  ou dans un mélange de DMC/ $\text{CaCl}_2$ .

#### II.2.1.1. Collection dans une solution aqueuse de $\text{CaCl}_2$

L'utilisation d'une solution aqueuse de  $\text{CaCl}_2$  ( $\text{CaCl}_2$  (aq.)) comme phase de collecte des gouttes (Figure 77) présente l'avantage de pouvoir varier considérablement la concentration en  $\text{CaCl}_2$  ( $C_{\text{CaCl}_2}$ ) car ce dernier est très soluble dans l'eau (jusqu'à 45wt% à 25°C).

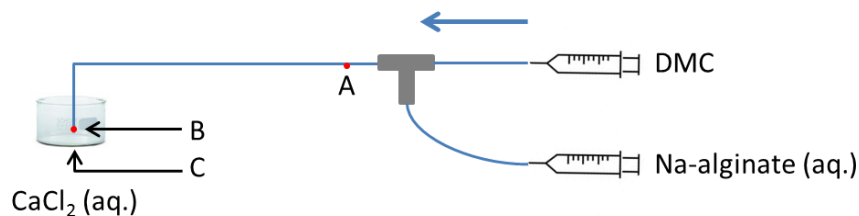


Figure 77. Schéma du montage pour effectuer la gélification *ex situ* lors de la collection dans une solution aqueuse de  $\text{CaCl}_2$ .

Les expériences sont effectuées avec une concentration en Na-alginate  $C_{\text{Na-alginate}}$  fixée à 0,06wt% et la distance entre les points A et B est de 25cm. Le débit de la phase continue ( $Q_{\text{DMC}}$ ) et la concentration en  $\text{CaCl}_2$  ( $C_{\text{CaCl}_2}$ ) sont variés (Tableau 7).

Tableau 7. Expériences de gélification *ex situ* lors de la collection dans  $\text{CaCl}_2$  (aq.) en variant  $Q_{\text{DMC}}$  et  $C_{\text{CaCl}_2}$  avec  $Q_{\text{alginate}}=0,005\mu\text{L/s}$

$Q_{\text{DMC}}$ ( $\mu\text{L/s}$ )	$C_{\text{CaCl}_2}$ (wt%)	Observation lors de la collection
0,15	0,1	Gouttes individuelles
0,2	0,1	Gouttes individuelles
0,15	0,5	Gouttes individuelles
0,15	1	Gouttes individuelles
0,15	2	Gouttes individuelles
0,15	3	Agglomération des gouttes
0,15	4	Agglomération et fusion des gouttes
0,15	5	Agglomération et fusion des gouttes
0,15	10	Agglomération et fusion des gouttes



De manière générale, le fait d'avoir plongé le capillaire dans une solution de  $\text{CaCl}_2$  n'a pas d'impact sur la génération des gouttes au point A et elles sont homogènes. Au point B situé à l'extrémité du capillaire, une grosse goutte de DMC se forme (Figure 78) dans la solution aqueuse de  $\text{CaCl}_2$ . Cela est dû à leur miscibilité partielle. Par conséquent, les gouttes de Na-alginate doivent traverser l'interface entre le DMC et la solution de  $\text{CaCl}_2$ .

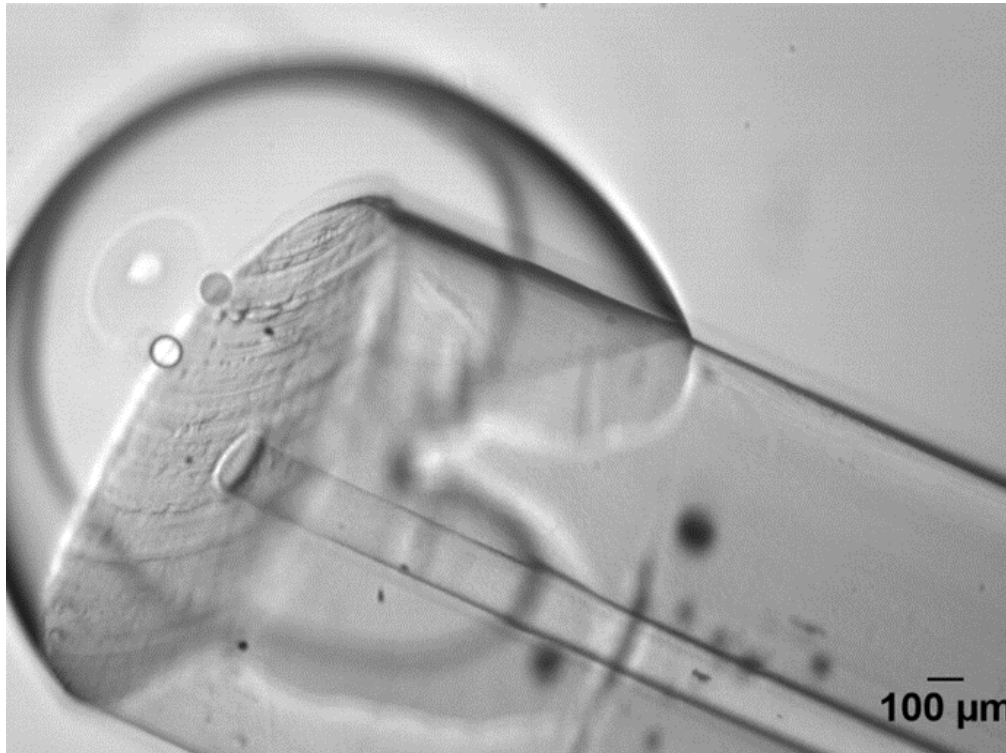


Figure 78. Exemple d'interface entre le DMC et la solution de  $\text{CaCl}_2$  créée à l'extrémité du capillaire (au point B) pour  $Q_{DMC}=0,15\mu\text{L/s}$ ,  $Q_{alginate}=0,005\mu\text{L/s}$  et  $C_{CaCl_2}=1\text{wt}\%$ .

De plus, les résultats du Tableau 7 montrent deux types de comportement des gouttes suivant la valeur de  $C_{CaCl_2}$ .

#### a) Comportement des gouttes pour $C_{CaCl_2}\leq 2\text{wt}\%$

On observe des gouttes individuelles au niveau de l'interface entre le DMC et la solution de  $\text{CaCl}_2$  seulement si  $C_{CaCl_2}\leq 2\text{wt}\%$ . Lorsque les gouttes traversent cette interface, elles sont déformées et les microparticules gélifiées au point C présentent une « tête » semi-sphérique et une « queue » élancée (Figure 79). De plus, les gouttes continuent à se contracter après avoir traversé l'interface et une fois dans la solution de  $\text{CaCl}_2$ . On le voit bien sur les gouttes observées pour la valeur de  $C_{CaCl_2}=1\text{wt}\%$  (Figure 79 (a)), dont le diamètre moyen diminue de  $87\mu\text{m}$  (au point B) à  $33\mu\text{m}$  (au point C). Cela est certainement lié à la différence de  $C_{CaCl_2}$  entre la goutte et la solution de collecte, conduisant à une pression osmotique, force motrice de la contraction. Donc l'eau diffuse de l'intérieur de la goutte vers la solution de collecte.

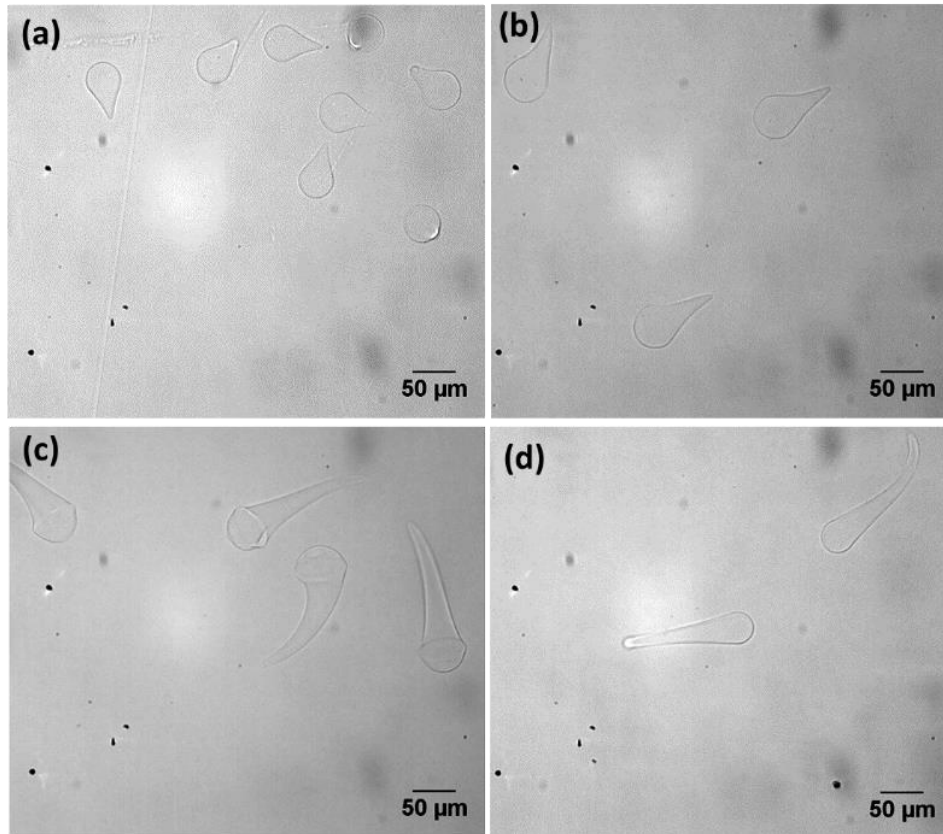


Figure 79. Microparticules observées dans une solution aqueuse de  $\text{CaCl}_2$  à des concentrations de (a) 1wt% ; (b) 0,5wt% ; (c-d) 0,1wt%. Conditions de génération des gouttes : (a-c)  $k = 30$  avec  $Q_{DMC} = 0,15\mu\text{L/s}$  et  $Q_{alginate} = 0,005\mu\text{L/s}$ ; (d)  $k = 40$  avec  $Q_{DMC} = 0,2\mu\text{L/s}$  et  $Q_{alginate} = 0,005\mu\text{L/s}$ .

L'influence de  $k$  ( $=Q_{DMC}/Q_{alginate}$ , pour une valeur de  $Q_{alginate}$  de  $0,005\mu\text{L/s}$ ) et de  $C_{\text{CaCl}_2}$  sur la formation des microparticules, est explorée :

- Pour un  $k$  donné (Figure 79 (a-c)), on observe une réduction de la contraction des gouttes après la collecte lorsque  $C_{\text{CaCl}_2}$  dans la solution de collecte diminue. Ceci est dû à la différence de pression osmotique quand la  $C_{\text{CaCl}_2}$  diminue, comme décrit précédemment. Ainsi la quantité d'eau qui diffuse de la goutte à la solution de  $\text{CaCl}_2$  diminue. De plus, on observe que la diminution de  $C_{\text{CaCl}_2}$  dans la solution de collecte engendre la prolongation de la « queue ». Selon l'étude de Hu et al., la forme des gouttes résulte des effets d'énergie interfaciale entre les gouttes et la solution de  $\text{CaCl}_2$  et de la force visqueuse (Hu et al. 2012). Comme ces deux paramètres varient avec  $C_{\text{CaCl}_2}$ , on comprend la modification de la forme finale des microparticules.

- Pour un  $C_{\text{CaCl}_2}$  donné (Figure 79 (c-d)), lorsque  $k$  utilisé pour la génération de gouttes augmente, la forme des microparticules est similaire, mais le volume diminue. Nous avons vu dans la partie C.I.2.2. que la contraction *in situ* augmente avec  $k$ . Ainsi entre les Figure 79 (c) et (d), la différence de taille vient de l'étape de génération des gouttes et de circulation dans le capillaire et elle n'est pas influencée par la gélification dans la solution de  $\text{CaCl}_2$ .

### b) Comportement des gouttes pour $C_{CaCl_2} \geq 3\%$

Pour  $C_{CaCl_2} \geq 3\%$  (Tableau 7), on observe que les gouttes collent à l'interface qui se forme en sortie de capillaire, puis elles s'agglomèrent et/ou fusionnent avec les suivantes avant de se détacher et de se déplacer dans la solution. Au point C, on observe soit un agglomérat de gouttes (Figure 80 (a)), soit le résultat de la fusion de plusieurs gouttes (Figure 80 (b)). La tendance à l'agglomération et/ou à la fusion augmente avec  $C_{CaCl_2}$ , et semble donc liée à la viscosité de la solution de collecte qui augmente aussi avec  $C_{CaCl_2}$ .

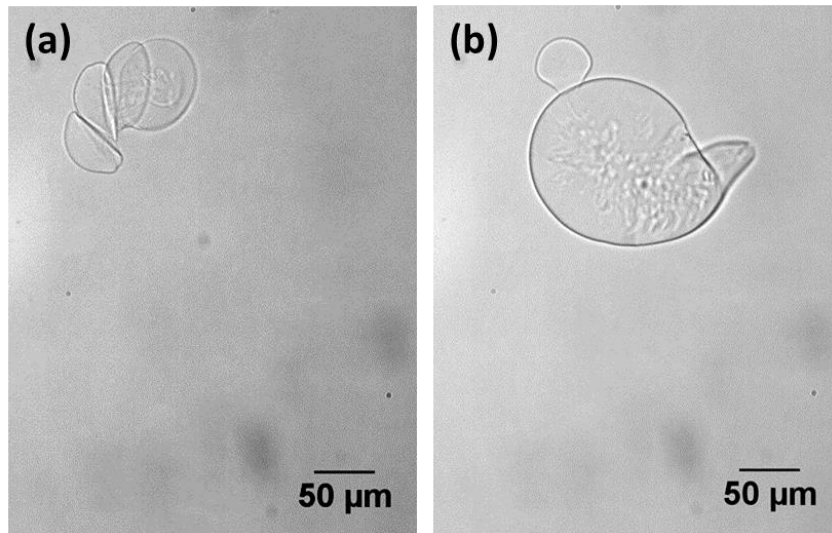


Figure 80. Microparticules dans  $CaCl_2$  (4wt%) formées suite à (a) l'agglomération et (b) la fusion de gouttes. La génération des gouttes est effectuée avec  $Q_{DMC} = 0,15\mu L/s$  et  $Q_{alginate} = 0,005\mu L/s$ .

D'une manière générale dans les expériences décrites ci-dessus, en plus de la déformation des gouttes dans la solution de collecte, leur trajet de la sortie du capillaire jusqu'à l'interface est aléatoire. Il est donc impossible de contrôler le temps de contact avec le DMC environnant la goutte lors de sa sortie du capillaire, et donc la diffusion du solvant. Ainsi il est difficile d'atteindre une homogénéité en taille et en concentration des microparticules. Il est donc préférable d'éviter l'interface entre le DMC du capillaire et la solution aqueuse de collecte. Pour cela, on peut collecter dans un solvant miscible avec le DMC.

#### II.2.1.2. Collection dans un mélange de DMC/ $CaCl_2$

Une solution aqueuse saturée en  $CaCl_2$  ( $C_{CaCl_2} \approx 45wt\%$  à  $25^\circ C$ ) est d'abord préparée, puis mélangée à une solution de DMC avec un ratio 1:2 (DMC/ $CaCl_2$ ) en masse. Pour garantir un bon mélange de la solution, on peut la chauffer. Cependant, comme le point d'ébullition du DMC est assez bas ( $90^\circ C$ ), il y a un risque de perte de DMC due à l'évaporation. Par conséquent, nous mélangeons les solutions en utilisant les ultrasons. Ainsi la solution aqueuse de  $CaCl_2$  diffuse dans le DMC dû à la solubilité partielle de l'eau dans le DMC. Après centrifugation, la phase organique de DMC saturée en  $CaCl_2$  (DMC/ $CaCl_2(aq.)$ ) est prélevée et utilisée pour la collection des gouttes à la sortie du capillaire (Figure 81).

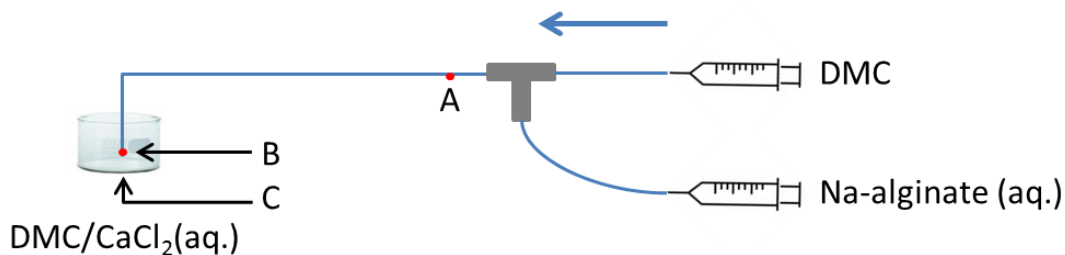


Figure 81. Schéma du montage pour effectuer la gélification *ex situ* en collectant dans une phase organique de DMC saturée en  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{DMC}/\text{CaCl}_2(\text{aq.})$ .

Dans ce cas, on n'observe pas d'interface à l'extrémité du capillaire (Figure 82) et les microparticules sont sphériques (Figure 83 (a) et (c)). De plus, comme la phase de collecte contient du  $\text{CaCl}_2$ , la gélification des microparticules de Na-alginate a lieu. L'efficacité de la gélification et donc de la transformation en microparticules de Ca-alginate est vérifiée car ces dernières ne se dissolvent plus dans l'eau. Par ailleurs, le taux de gélification est varié à travers le taux de  $\text{CaCl}_2$  dans le DMC en jouant sur le temps de mélange par ultrason (Figure 83).

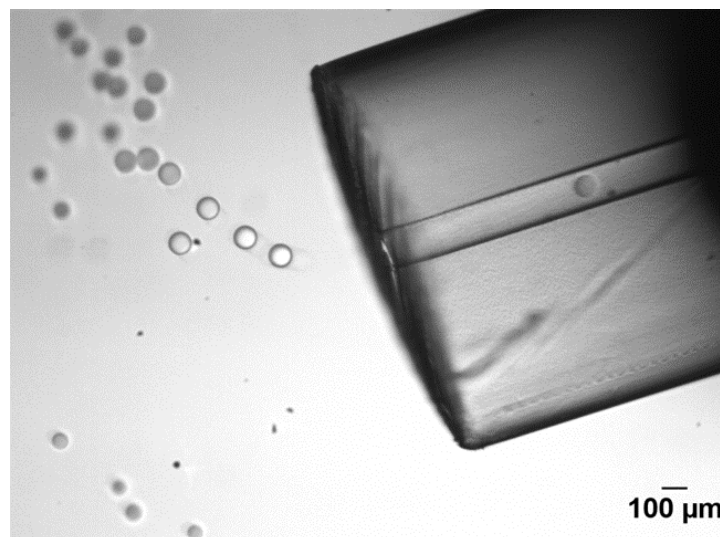


Figure 82. Sortie des microparticules de Na-alginate à l'extrémité du capillaire pendant la collection dans la phase organique de DMC saturée en  $\text{CaCl}_2$  ( $\text{DMC}/\text{CaCl}_2(\text{aq.})$ ).

Quand le mélange est effectué pendant 10min, les microparticules collectées se dissolvent dans l'eau (Figure 83 (a-b)). Il n'y a donc pas suffisamment de  $\text{CaCl}_2$  dans le DMC pour réaliser la gélification. En augmentant le temps de mélange jusqu'à 1h, les microparticules ont tendance à gonfler (Figure 83 (c-d)) et ne se dissolvent pas dans l'eau. Ceci est la preuve d'une gélification efficace grâce à une quantité suffisante de  $\text{CaCl}_2$  dans le DMC. Cependant, comme la solubilité de l'eau dans le DMC est de 3wt%, la valeur maximale de  $C_{\text{CaCl}_2}$  dans le DMC est au maximum de 1,35wt% ( $=3\% \times 45\%$ ), si on utilise une solution saturée en  $\text{CaCl}_2$  ( $\approx 45\text{wt}\%$  à  $25^\circ\text{C}$ ). Par conséquent, cette méthode ne permet pas d'augmenter dans une large gamme  $C_{\text{CaCl}_2}$  afin de varier le taux de gélification.

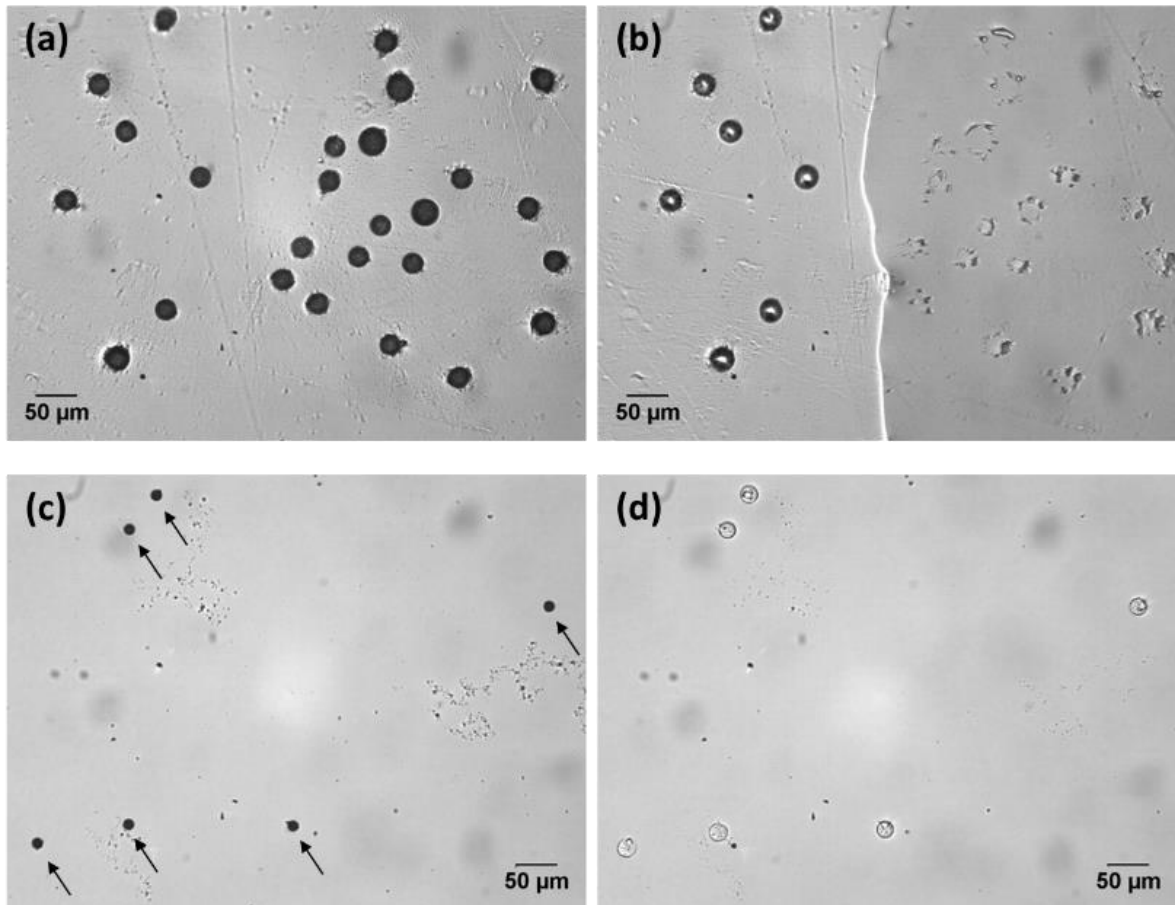


Figure 83. Microparticules de Ca-alginate séchées, après la collecte dans un mélange DMC/ $\text{CaCl}_2(\text{aq.})$  qui a été préalablement mélangé aux ultrasons pendant (a) 10min et (c) 1h. Observation de l'effet d'ajout d'eau : (b) sur les microparticules (a), et (d) sur les microparticules (c).

D'après les résultats de la collecte des microparticules dans du  $\text{CaCl}_2$  sous forme aqueuse ou dans un mélange organique (C.II.2.1), il est difficile de contrôler la taille et la concentration en alginate des microparticules de Ca-alginate obtenues, pour une application en tant que mimes homogènes et reproductibles de GRs.

### II.2.2. Gélification des microparticules après leur collection et leur séchage

Nous pouvons profiter des avantages de la collecte des microparticules dans du DMC et de la gélification dans une solution de  $\text{CaCl}_2$ , en faisant subir ces deux traitements séquentiellement aux microparticules de Na-alginate. Pour cela nous utilisons le dispositif de la Figure 84 et nous procédons en deux étapes : 1) Nous préparons d'abord des microparticules de Na-alginate que nous collectons dans du DMC. Nous laissons les microparticules se contracter jusqu'à évaporation totale du DMC. 2) Nous ajoutons une solution aqueuse de  $\text{CaCl}_2$  aux microparticules de Na-alginate séchées pour réaliser la gélification, les transformant en microparticules de Ca-alginate.

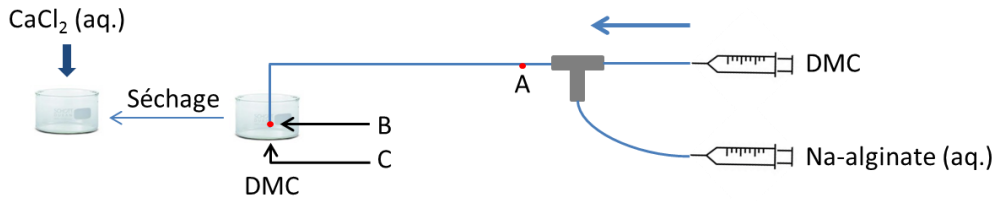


Figure 84. Schéma du montage pour la gélification *ex situ* en deux étapes : collection et séchage, puis gélification.

Différentes concentrations en  $\text{CaCl}_2$  ( $C_{\text{CaCl}_2}$ ), comprises entre 0,5wt% et 10wt%, sont testées. La Figure 85 montre le résultat d'un essai avec la solution de  $\text{CaCl}_2$  de 0,5wt%. Un gonflement est observé dès que la solution de  $\text{CaCl}_2$  est ajoutée. Le diamètre des microparticules augmente de  $28,7 \pm 0,3 \mu\text{m}$  à  $33,4 \pm 0,4 \mu\text{m}$ , basé sur 51 mesures avant et après ajout de la solution. Le Tableau 8 montre les résultats avec d'autres concentrations en  $\text{CaCl}_2$ .

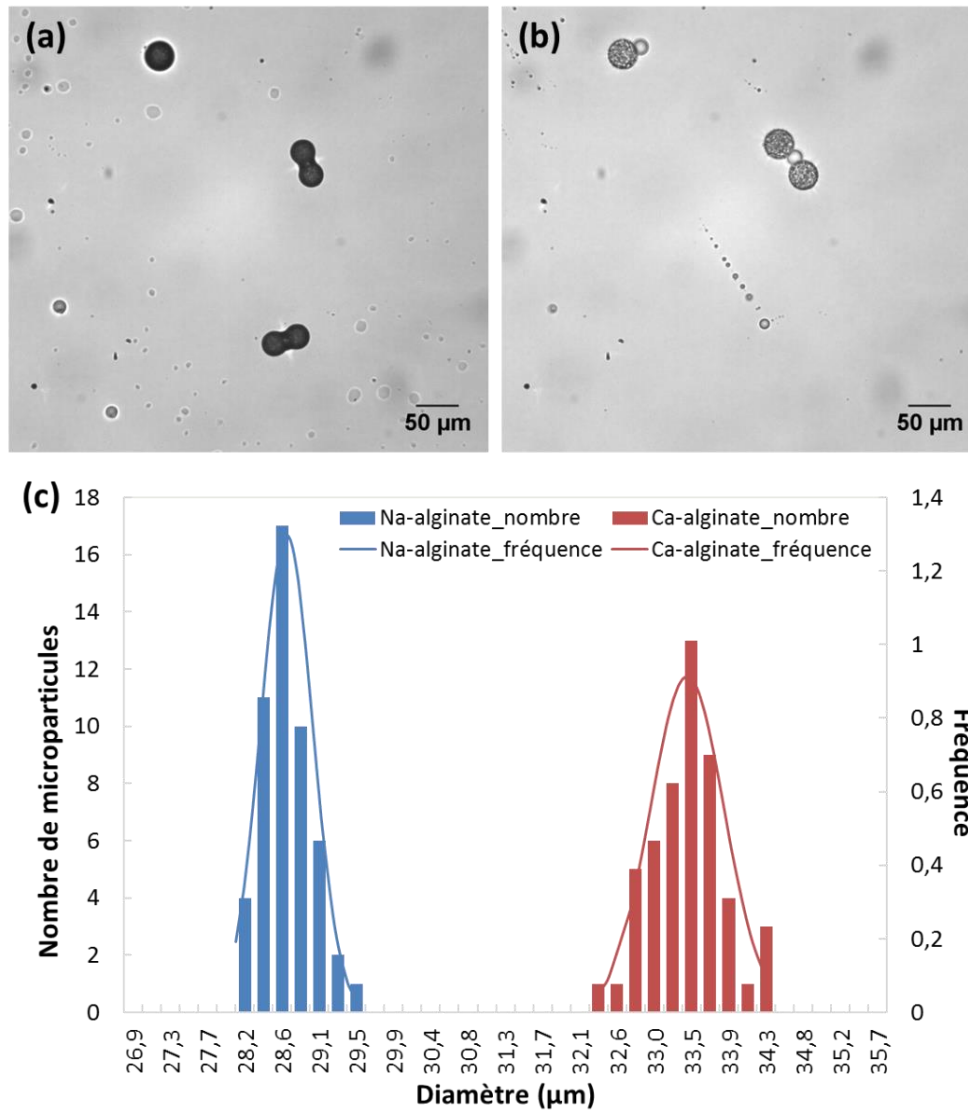
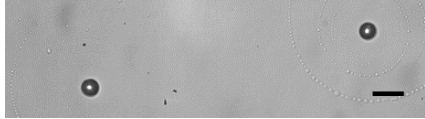
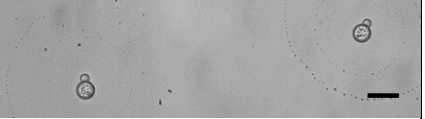
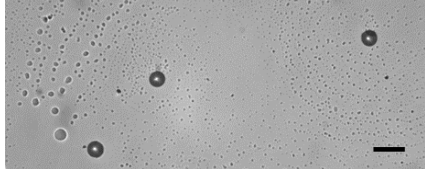
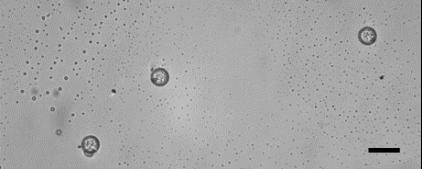
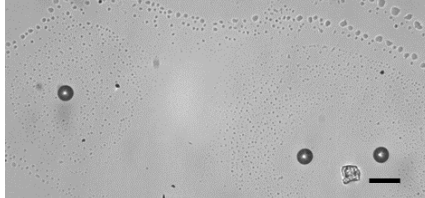
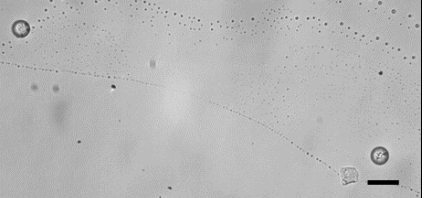


Figure 85. Microparticules (a) de Na-alginate après séchage et (b) de Ca-alginate dans  $\text{CaCl}_2$  (aq.). (c) Histogramme du diamètre des microparticules de Na-alginate et de Ca-alginate (51 mesures pour chacun), avec les courbes d'ajustement Gaussiennes. Conditions de préparation :  $C_i=0,25\text{wt}\%$ ,  $Q_{\text{DMC}}=0,05\mu\text{L/s}$ ,  $Q_{\text{alginate}}=0,01\mu\text{L/s}$  et  $C_{\text{CaCl}_2}=0,5\text{wt}\%$ .

Nous remarquons que les microparticules restent sphériques pendant la transformation de Na-alginate en Ca-alginate. De plus, selon le Tableau 8, le diamètre final des microparticules de Ca-alginate diminue légèrement avec  $C_{CaCl_2}$ . L'étude de l'effet de  $C_{CaCl_2}$  sera dans les perspectives.

Tableau 8. Observation des microparticules avant et après l'ajout de  $CaCl_2$  (aq.). Conditions de la génération des gouttes :  $C_i = 0,25\text{wt}\%$ ,  $Q_{DMC} = 0,15\mu\text{l/s}$  et  $Q_{alginate} = 0,003\mu\text{L/s}$ . Echelle :  $50\mu\text{m}$ . Le diamètre des microparticules avant l'ajout de  $CaCl_2$  est de  $23,5\pm 0,5\mu\text{m}$ .

$C_{CaCl_2}$ (wt%)	Avant l'ajout de $CaCl_2$ (aq.)	Après l'ajout de $CaCl_2$ (aq.)	Diamètre final ( $\mu\text{m}$ )
1			$30,1\pm 0,5$
5			$29,1\pm 0,5$
10			$28,6\pm 0,5$

Pour conclure, contrairement aux microparticules de Na-alginate qui sont solubles dans l'eau, leur gélification les transforme en microparticules de Ca-alginate insolubles. Ces dernières peuvent donc être utilisées dans un milieu aqueux pour les mesures ultrasonores. Cette méthode en deux étapes, de collecte et séchage puis de gélification, présente l'avantage d'une gélification efficace dans une large gamme de  $C_{CaCl_2}$  de 0-45wt% à  $25^\circ\text{C}$ .

## Chapitre III. Caractérisation des microparticules

Dans le chapitre précédent, nous avons défini une méthode de préparation de microparticules de Ca-alginate à partir de microparticules de Na-alginate collectées dans du DMC pour les contracter, puis séchées avant d'ajouter une solution de  $\text{CaCl}_2$  pour les gélifier. Dans ce chapitre, nous présentons la caractérisation de ces microparticules avant et après gélification afin de comprendre le comportement de l'alginate lors de la gélification et de les comparer aux globules rouges (GRs). La forme et la structure interne des microparticules de Na-alginate et de Ca-alginate sont observées par microscopie électronique à balayage (MEB). Les propriétés mécaniques sont caractérisées d'abord qualitativement avec une micro-pince, puis quantitativement en mesurant le module de Young par microscopie à force atomique (AFM).

### III.1. Forme des microparticules

La méthodologie utilisée pour observer les microparticules au MEB permet de les comparer avant et après gélification. Pour cela les microparticules de Na-alginate sont collectées dans du DMC, dans lequel nous les laissons se contracter. Puis nous les séchons et nous les récupérons sur un adhésif en carbone collé sur un porte échantillon métallique (B.II.3.1.). Elles sont alors placées dans la chambre sous vide du MEB pour observer leur forme. Après cette première observation, les microparticules de Na-alginate sont sorties du MEB et une goutte de  $\text{CaCl}_2$  est déposée dessus pour les faire gélifier (Figure 86).

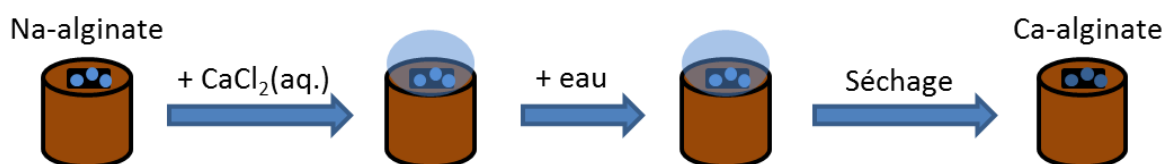


Figure 86. Schéma de la préparation d'un échantillon de microparticules de Ca-alginate pour observer sa forme par MEB

Nous laissons la gélification se faire pendant 2 jours, puis la goutte de  $\text{CaCl}_2$  est absorbée soigneusement avec du papier absorbant sans poussière. De l'eau est alors ajoutée 2 fois pour laver les microparticules de Ca-alginate formées de la possible présence de cristaux de  $\text{CaCl}_2$  liée à l'évaporation de l'eau. Enfin après avoir absorbé l'eau et séché à l'air, le porte échantillon est placé dans la chambre sous vide du MEB pour l'observation. Avec un grossissement relativement faible (x50), on observe un grand nombre de microparticules de Na-alginate sur le porte échantillon (Figure 87 (a)), qui semblent monodisperses. Les trous présents sur l'image correspondent aux pores de l'adhésif en carbone. On observe que l'apparence des microparticules de Na-alginate (Figure 87 (b)) et Ca-alginate (Figure 87 (d)) est identique à un grossissement x180. Par contre, avec un grossissement x2000, on voit que les microparticules de Na-alginate sont sphériques avec une surface lisse (Figure 87 (c)), alors que celles de Ca-alginate sont un peu déformées (Figure 87 (e)).



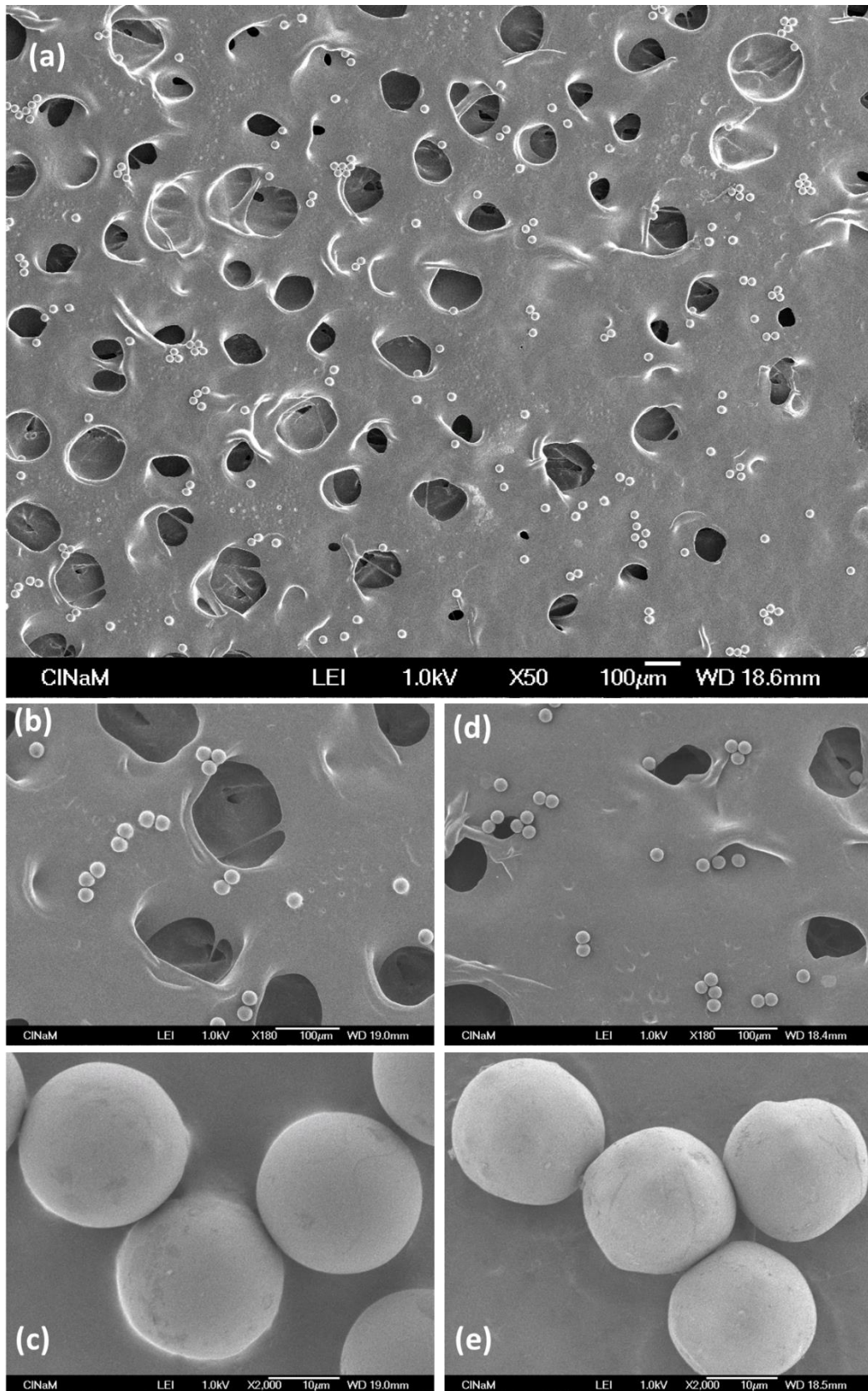


Figure 87. Observation au MEB de microparticules : (a-c) de Na-alginate et (d-e) de Ca-alginate. Conditions de préparation des microparticules de Na-alginate :  $C_i=0,25\text{wt}\%$ ,  $Q_{DMC}=0,15\mu\text{L/s}$  et  $Q_{alginate}=0,003\mu\text{L/s}$ . La gélification est réalisée avec une goutte de  $\text{CaCl}_2$  en solution aqueuse à 0,5wt%.

Le diamètre a été mesuré sur plus de 50 microparticules sur les images MEB et au microscope optique (Tableau 9). Nous notons que pour chaque type de microparticules, le diamètre mesuré au MEB est plus petit que celui mesuré au microscope optique. Cela est sûrement dû à la condition d'observation sous vide au MEB, qui accentue l'évaporation de l'eau. Cela peut également expliquer la déformation des microparticules de Ca-alginate observée au MEB (Figure 87 (e)).

Tableau 9. Comparaison du diamètre des microparticules de Na-alginate et de Ca-alginate observées au MEB et au microscope optique. Conditions de préparation :  $C_i=0,25\text{wt}\%$ ,  $Q_{DMC}=0,15\mu\text{L/s}$  et  $Q_{alginate}=0,003\mu\text{L/s}$  ; la gélification est réalisée avec du  $\text{CaCl}_2$  (0,5wt%)

Microscope	Grossissement	Diamètre de microparticules de Na-alginate ( $\mu\text{m}$ )	Diamètre de microparticules de Ca-alginate ( $\mu\text{m}$ )
MEB	x1000	23,0 $\pm$ 0,3	20,6 $\pm$ 0,6
Optique	x20	25,4 $\pm$ 0,3	34,3 $\pm$ 1,1

Les microparticules de Na-alginate présentent un diamètre plus grand que celles de Ca-alginate sur les images MEB (Figure 87 (c) et (e) et Tableau 9). Alors que la mesure sur les images au microscope optique montre un gonflement des particules après gélification. On peut expliquer cette différence par l'évaporation d'eau due au vide dans le MEB, comme expliqué ci-dessus. Ce phénomène d'évaporation est confirmé par la trace observée sous les microparticules de Ca-alginate qui est plus large que la microparticule (Figure 88). Cette trace doit être créée lors du gonflement de la microparticule dû à la gélification. Puis l'exposition sous vide dans le MEB cause la contraction de la microparticule. Enfin dû à l'adhésion de la microparticule sur l'adhésif de carbone, certains points de l'adhésif restent attachés à la surface de la microparticule (Figure 88).

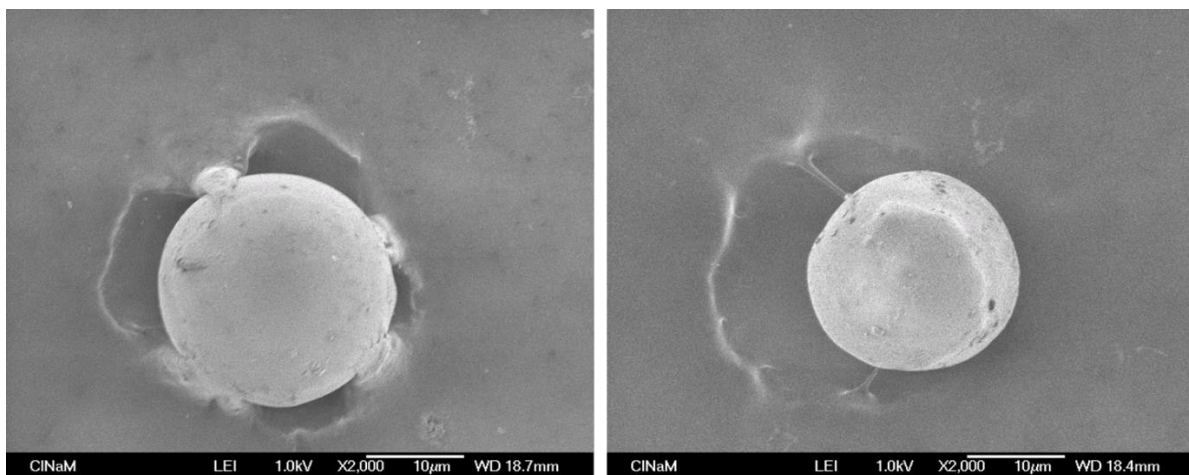


Figure 88. Microparticules de Ca-alginate avec les traces du gonflement et de la contraction sur l'adhésif en carbone du porte échantillon

## III.2. Structure interne des microparticules

### III.2.1. Méthodes développées pour « couper » les microparticules

Afin d'observer la structure interne des microparticules, trois méthodes ont été développées :

- 1) Par découpe avec une scie à fil des microparticules après les avoir emprisonnées dans une résine (protocole dans l'Annexe 3) (Figure 89 (a)). Mais on n'observe que des trous semi-sphériques (Figure 90) qui montrent que les microparticules ont été éjectées de la résine pendant le découpage.
- 2) Par frottement des microparticules collées sur le porte échantillon avec une spatule (Figure 89 (b)), comme vu dans la littérature (Suzuki, Osumi, and Minami 2012). Mais cette méthode est très difficile à appliquer aux microparticules de Na-alginate car elles sont très dures.
- 3) En « hachant » avec un rasoir la surface de l'adhésif en carbone (Figure D dans l'Annexe 4) sur lequel ont adhéré des microparticules (Figure 89 (c)), ce qui permet de couper plusieurs microparticules.

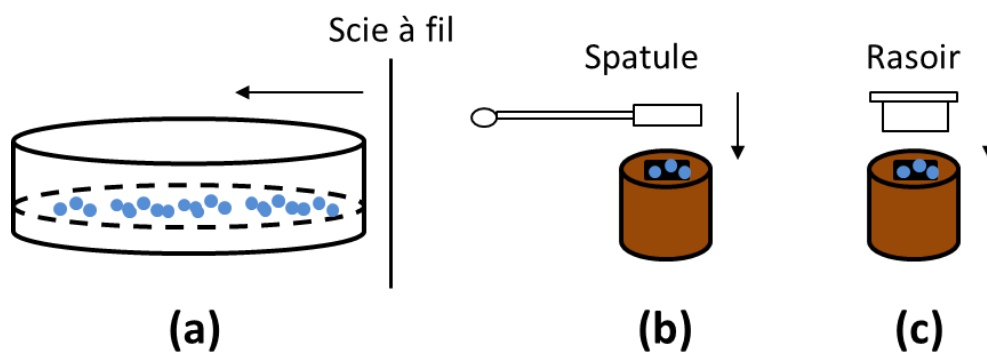


Figure 89. Schéma des méthodes pour « couper » les microparticules : (a) le découpage avec une scie à fil ; (b) le frottement avec une spatule ; (c) le « hachage » avec un rasoir.

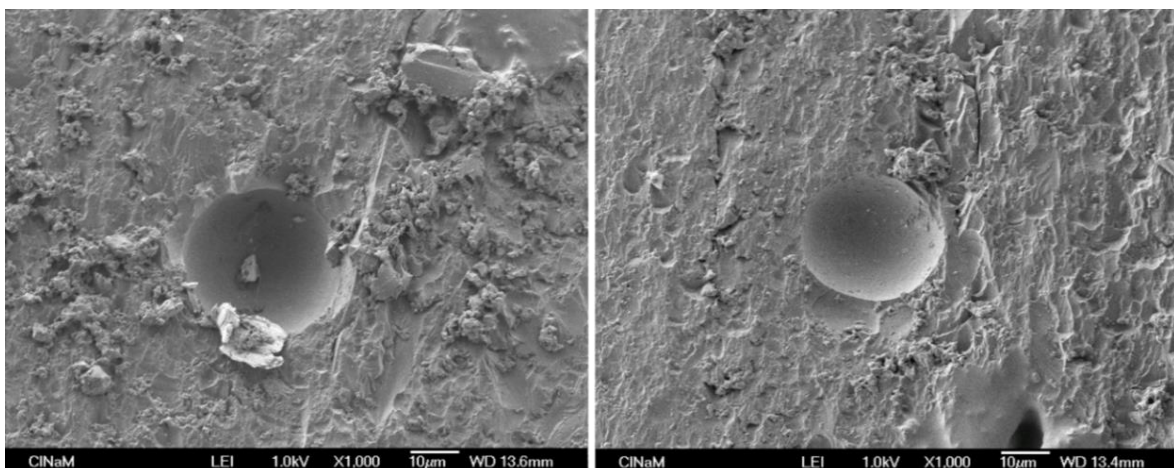


Figure 90. Images au MEB de la résine contenant une microparticule après le découpage avec une scie à fil

### III.2.2. Observation des microparticules « coupées » de Na-alginate et de Ca-alginate

La Figure 91 montre deux microparticules de Na-alginate « coupées », choisies comme exemples, qui ont été observées au MEB (Figure 91 (a1 et b1)). On remarque que la structure interne est poreuse avec des tailles et des formes de pores différentes (Figure 91 (a2 et b2)). Plus d'images au MEB des microparticules « coupées » sont dans l'Annexe 4 (Figure E).

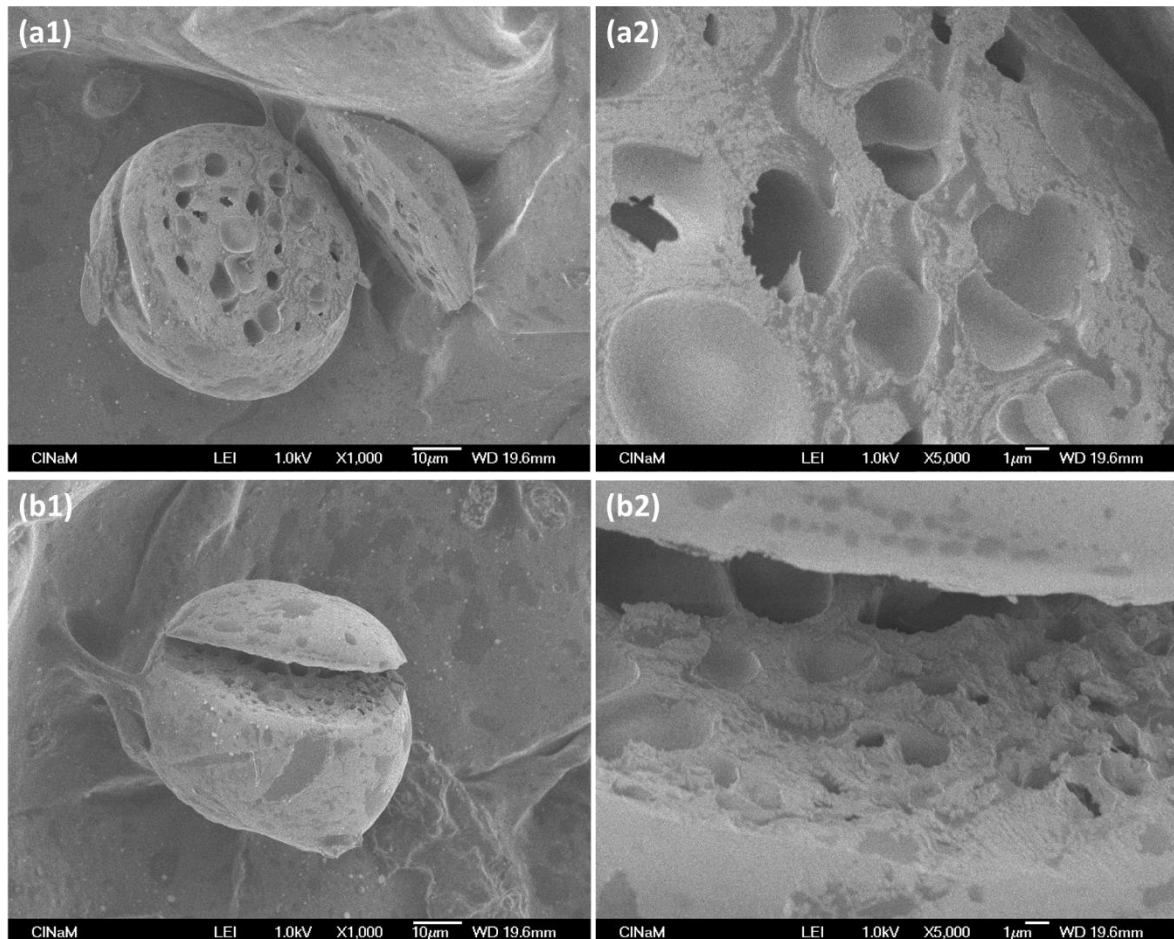


Figure 91. Image de 2 microparticules de Na-alginate (a) et (b) « coupées » avec un rasoir. Conditions de préparation :  $C_i=0,25\text{wt}\%$ ,  $Q_{DMC}=0,15\mu\text{L/s}$  et  $Q_{alginate}=0,005\mu\text{L/s}$ .

Puis les microparticules de Na-alginate « coupées » (Figure 92 (a)) sont mis en présence d'une goutte de  $\text{CaCl}_2$  (5wt%). Les microparticules « coupées » de Ca-alginate obtenues (Figure 92 (b)) sont observées au MEB. Les Figure 92 (a) et (b) correspondent à la même microparticule avant et après la gélification. On remarque que les pores restent après la gélification avec une forme similaire mais une taille qui diminue, ce qui peut être dû au séchage dans le MEB, comme vu précédemment (C.III.1.).

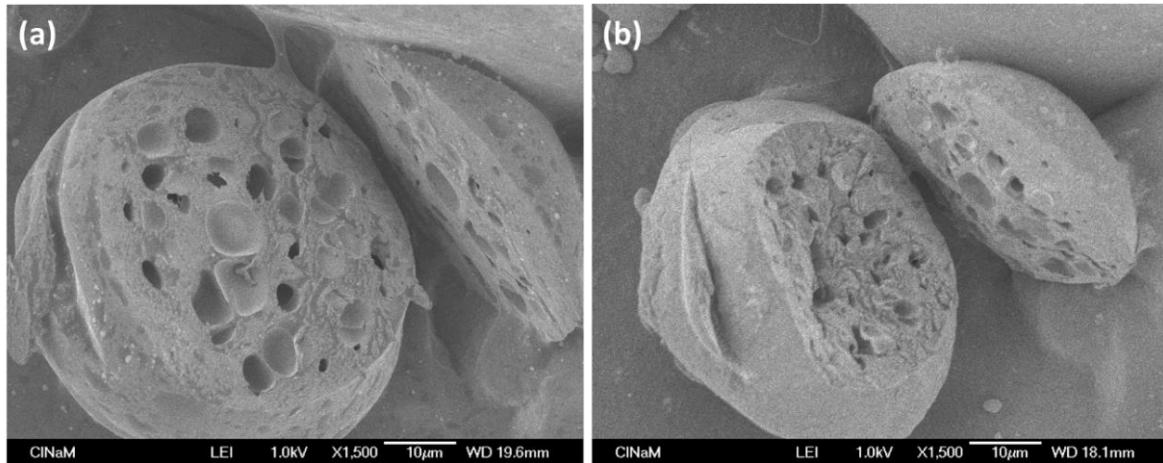


Figure 92. Image de MEB d'une même microparticule de (a) Na-alginate avant la gélification et de (b) Ca-alginate après la gélification avec du  $\text{CaCl}_2$  de 5wt%.

### III.2.3. Mécanisme de la formation des pores à l'intérieur des microparticules

Afin d'expliquer la structure poreuse des microparticules, nous comparons avec d'autres expériences de gélification de polymères rencontrées dans la littérature, dont les mécanismes ont été décrit.

#### III.2.3.1. Migration des chaînes de polymères

Yang et al. ont mis au point une méthode de préparation de microparticules de poly(styrène sulfonate) de sodium (NaPSS) (C.I.3.2.) similaire à notre méthode de préparation des microparticules de Ca-alginate. Des gouttes de la solution de NaPSS (phase dispersée) sont introduites dans un bain de butan-1-ol (phase continue). A cause de la solubilité partielle de l'eau dans le butan-1-ol, l'eau des gouttes y diffuse. Par conséquent, les gouttes de NaPSS se contractent et se transforment en microparticules. Cette préparation est effectuée avec différentes concentrations en NaPSS :

- D'une part, quand la concentration est élevée (15wt%), les microparticules de NaPSS sont sphériques avec une surface lisse (Figure 93 (a)). Après écrasement avec une lame de verre, ils observent une structure interne poreuse (Figure 93 (b)). Cette forme et la structure interne ressemblent à celles des microparticules de Na-alginate que nous obtenons dans nos expériences.

- D'autre part, avec des concentrations en NaPSS relativement faibles (2,5 ou 5wt%), un creux est observé sur la surface des microparticules de NaPSS (Figure 93 (c et e)). L'intérieur des microparticules est poreux avec une cavité au centre (Figure 93 (d et f)). Et le volume de la cavité augmente quand la concentration en NaPSS diminue.

Les auteurs (Yang et al. 2015) décrivent le mécanisme de formation des pores par la diffusion de l'eau vers la phase continue, ce qui cause le mouvement des chaînes de polymères de l'intérieur de la goutte vers la surface. Comme les polymères ne sont pas solubles dans la

phase continue, ils s'arrêtent à la surface et créent une sorte de « coque » autour de la microparticule. Par ailleurs, la migration des polymères donne lieu à l'apparition de pores. Enfin, comme la viscosité augmente avec la concentration, ceci ralentit voire empêche la diffusion des chaînes de polymères. Par conséquent, la migration est plus facile quand la concentration est faible, ce qui explique la cavité observée au centre de la microparticule (Figure 93 (d et f)), par rapport au cas où la concentration est élevée (Figure 93 (b)).

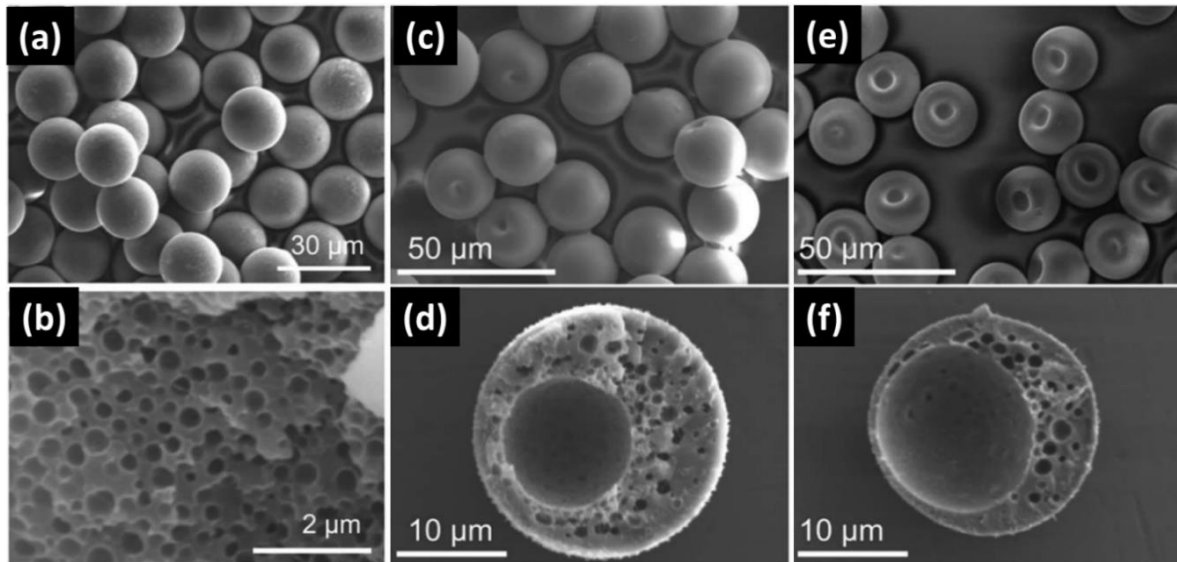


Figure 93. Images au MEB de la surface et de la structure interne des microparticules de NaPSS. Concernant la préparation, la concentration de la solution de NaPSS utilisée est (a-b) 15wt% ; (c-d) 5wt% ; (e-f) 2,5wt%. (Yang et al. 2015)

Par ailleurs, il a été observé que la forme et la structure interne des microparticules dépendent du polymère. On peut citer les travaux de Yamada et al. qui utilisent la technique microfluidique pour préparer des microparticules de collagène dont le mécanisme de gélification est similaire à celui de l'alginate. Ils obtiennent des microparticules dont la forme ressemble aux globules rouges (Figure 94 (A)). Cependant, la surface est rugueuse (Figure 94 (B)), ce qui d'après eux, résulte de l'accumulation de collagène qui est naturellement fibreux. D'ailleurs, l'intérieur des microparticules montre une structure fibreuse aussi (Figure 94 (C) et (D)).

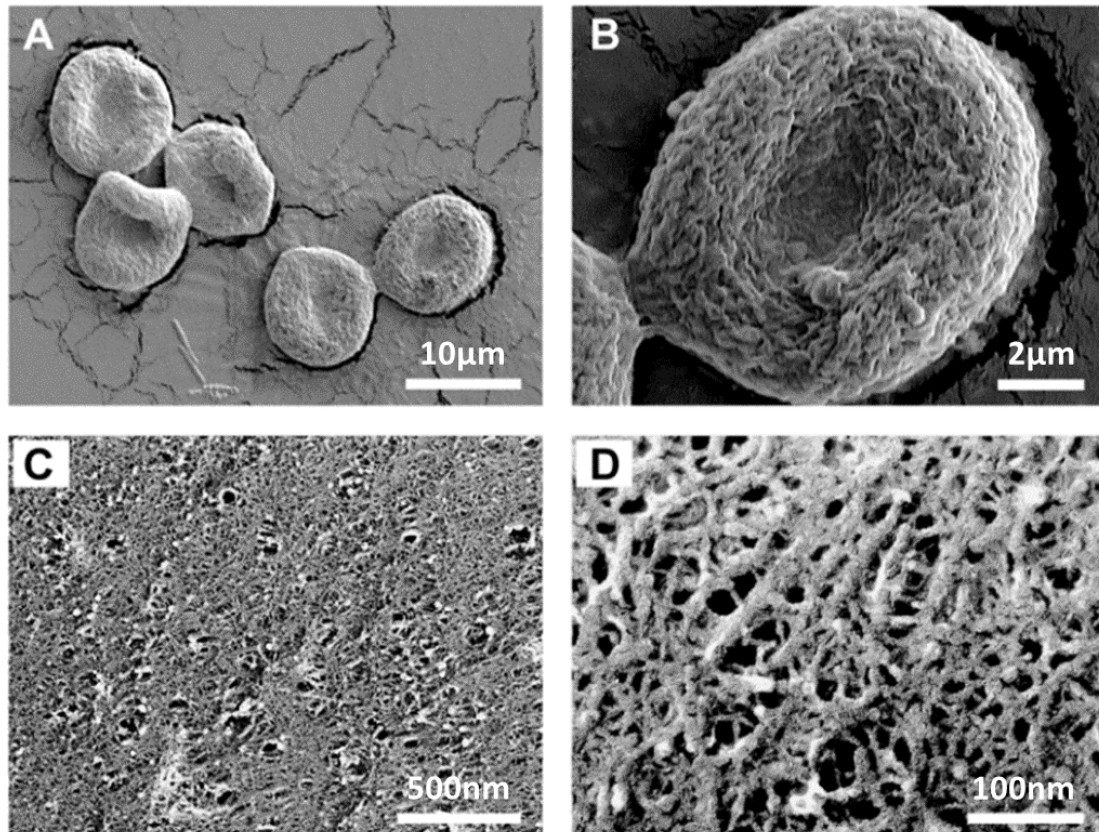


Figure 94. (A-B) Images au MEB de la surface de microparticules de collagène observée avec différents grossissements. (C-D) Images en microscopie électronique à transmission de la section d'une microparticule observée avec différents grossissements. (Yamada et al. n.d.)

### III.2.3.2. Mobilité des chaînes polymères

Comme dans nos travaux, Suzuki et al. fabriquent des microparticules constituées de poly(éthylène glycol) diméthacrylate (PEGDM) par polymérisation en suspension. Pour cela, des monomères EGDM sont d'abord dispersés dans un milieu aqueux. Après agitation à 70°C pendant 3h, des microparticules de PEGDM se forment par réticulation. Suivant la quantité de monomères utilisée pour la préparation, ils obtiennent différents diamètres de microparticules. Ils les « ouvrent » par frottement avec une spatule pour observer leur structure interne au MEB. On distingue alors deux catégories de microparticules :

- Des microparticules relativement petites, sous forme d'une coque dont l'intérieur est vide (Figure 95 (a-c)) ;
- Des microparticules plus grandes, qui sont constituées d'une coque avec des agrégats à l'intérieur (Figure 95 (d-f)).

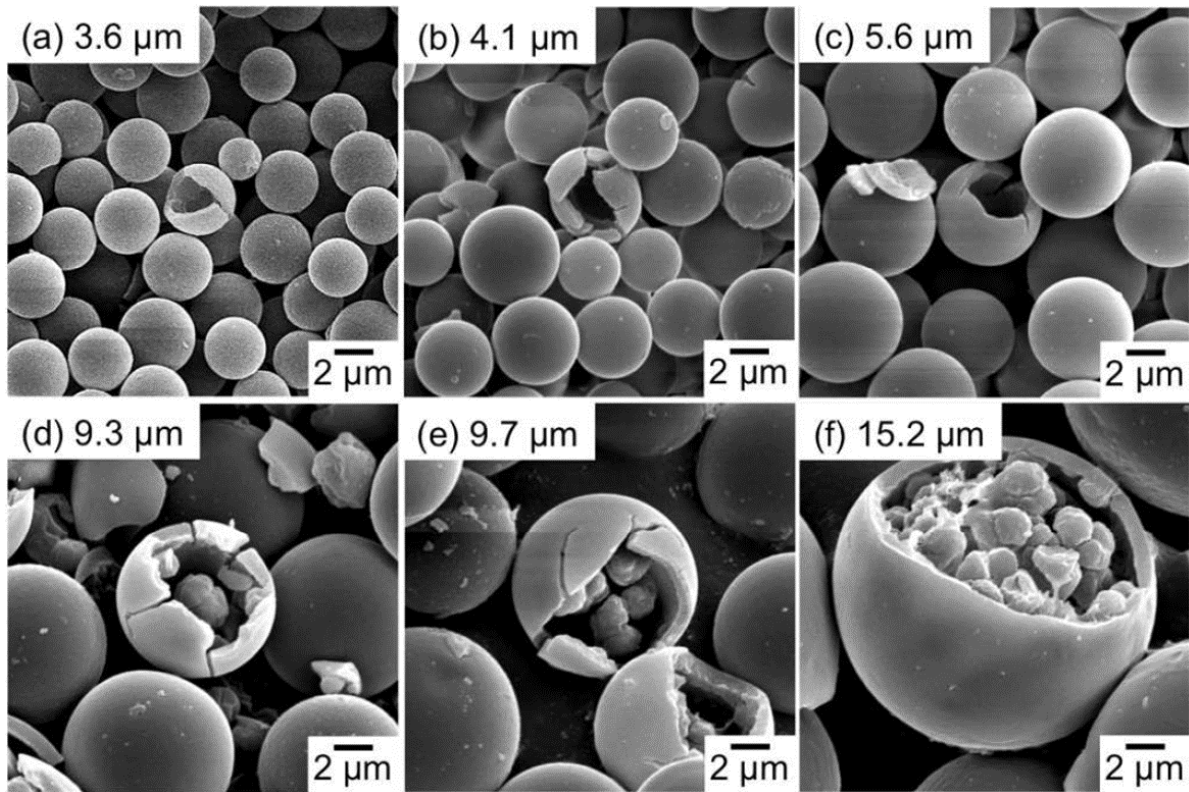


Figure 95. Images au MEB de microparticules de PEGDM « ouvertes » avec des diamètres différents (Suzuki et al. 2012)

D'après les auteurs, ces deux comportements sont liés à la mobilité des chaînes de polymères qu'ils supposent sur une distance maximale de  $2,8\mu\text{m}$ . Ainsi pour des microcapsules de rayon jusqu'à  $2,8\mu\text{m}$ , les polymères peuvent migrer jusqu'à la surface avant de s'agréger (Figure 96 (a)). Alors que pour un rayon supérieur à  $2,8\mu\text{m}$ , les polymères s'agrégent avant d'atteindre la surface et forment donc des agrégats à l'intérieur des microcapsules (Figure 96 (b)).

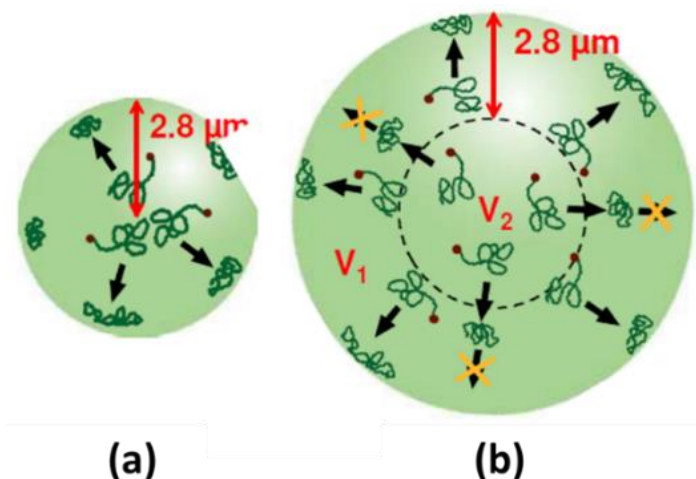


Figure 96. Schéma du mécanisme de la formation de microcapsules de PEGDM (a) creuses et (b) avec des agrégats à l'intérieur (Suzuki et al. 2012)



Si nous comparons nos résultats à ces travaux, nous pouvons en déduire que la structure poreuse des microparticules d'alginate résulte du mouvement de molécules d'alginate pendant la diffusion de l'eau dans le DMC. De plus, vu que les pores sont présents partout à l'intérieur d'une microparticule, on suppose que certaines molécules ne peuvent pas migrer jusqu'à l'interface pour former la coque à cause de la viscosité assez importante, mais elles ne précipitent pas non plus à l'intérieur de la microparticule.

### III.3. Propriétés mécaniques

Les propriétés mécaniques des microparticules ont d'abord été évaluées qualitativement avec une micro-pince conçue au laboratoire, puis quantitativement en mesurant le module de Young en utilisant un microscope à force atomique (AFM).

#### III.3.1. Mesure qualitative par micro-pince

La micro-pince a été décrite dans la partie B.II.3.2.1. La micro-pince est principalement constituée de deux bras, un mobile et l'autre fixe. Avant son utilisation, nous avons calibré le bras mobile de la micro-pince.

##### III.3.1.1. Calibration

On peut approcher le bras mobile de celui qui est fixe grâce au potentiel  $V_p$  que l'on peut lui appliquer. Dans un premier temps, nous mesurons le déplacement du bras mobile vers le bras fixe, dans l'air et sans objet à pincer, en fonction de  $V_p$ . Cette mesure permet de calibrer la micro-pince en termes d'espacement ( $e$ ) entre les deux bras de la micro-pince en fonction du  $V_p$  appliqué au bras mobile (Figure 97). Pour chaque  $V_p$ , la micro-pince est observée au microscope optique et la distance entre les deux bras est mesurée.

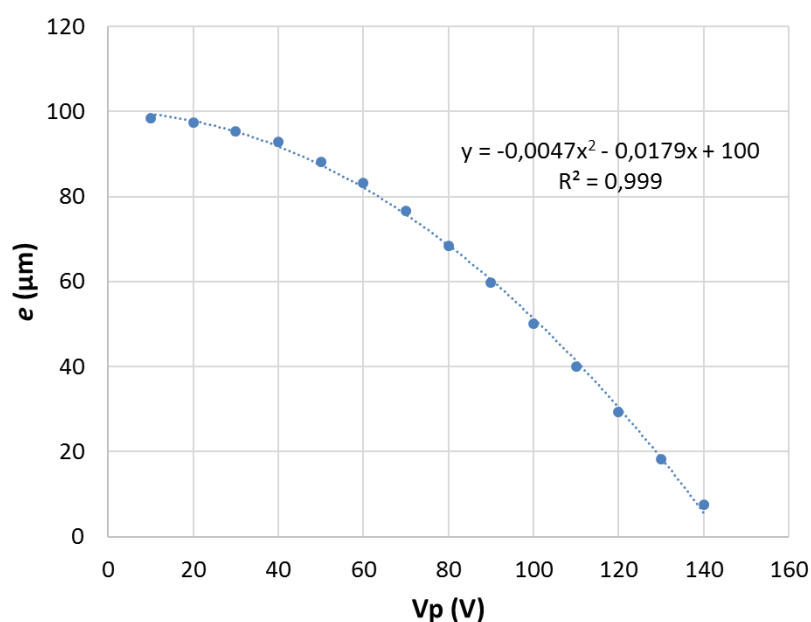


Figure 97. Espacement ( $e$ ) entre les deux bras de la micro-pince en fonction de  $V_p$

Le bras fixe est capable de ressentir une force de compression ( $F$ ) et de la convertir en un potentiel  $V_s$ . Lorsque le bras fixe est soit dans l'air, soit juste au contact de l'objet, sans que cet objet soit comprimé par le bras mobile,  $V_s$  mesuré est noté  $V_0$  et correspond à  $F=0$ . Dès que l'objet est comprimé par le bras mobile,  $V_s$  mesuré par le bras fixe augmente et la différence de potentiel ( $V_s - V_0$ ) donne la valeur de  $F$ , grâce au facteur de gain de  $48,24\mu\text{N/V}$  donné par le fournisseur de la micro-pince.

### III.3.1.2. Mesures sur les microparticules

Lors d'un essai de manipulation d'une microparticule, les deux bras sont d'abord placés autour de la microparticule. Puis le bras fixe est approché de la microparticule jusqu'à être au contact, alors que le bras mobile en est encore loin. Puis le bras mobile est approché de la microparticule en augmentant  $V_p$ . Tant que le bras mobile n'a pas commencé à comprimer la microparticule,  $F=0$ . Puis lorsque le bras mobile comprime la microparticule,  $F$  augmente avec  $V_p$ , comme le montre la Figure 98 pour des microparticules de Na-alginate et de Ca-alginate dans l'air. Pour ces dernières, nous avons gélifié avec trois concentrations de  $\text{CaCl}_2$  ( $C_{\text{CaCl}_2}$ ) : 0,5wt%, 5wt% et 10wt%. Chaque expérience a été répétée sur trois microparticules et donne des résultats reproductibles.

La croissance de  $F$  avec  $V_p$  (Figure 98) donne une indication sur la compressibilité des microparticules. En effet, si ces dernières ne sont pas compressibles, l'énergie fournie par le bras mobile est entièrement transmise au bras fixe. Ainsi  $F$  serait dépendant linéairement de  $V_p$ . Sur nos points expérimentaux, nous remarquons qu'un ajustement linéaire n'est pas adaptée, ce qui montre que les microparticules sont compressibles. Cependant leur déformation n'est pas perceptible au microscope optique car elle est très faible par rapport aux valeurs de  $V_p$  applicables, c'est-à-dire à la force maximale applicable qui est de  $250\mu\text{N}$ .

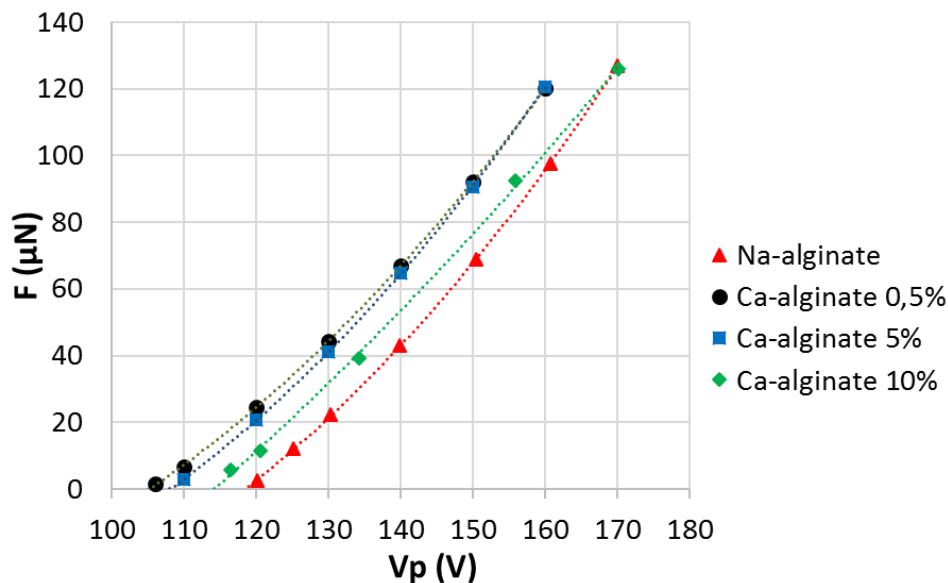


Figure 98. Tracé de  $F$  en fonction de  $V_p$  pour des microparticules de Na-alginate et de Ca-alginate dans l'air (gélifié avec trois concentrations de  $\text{CaCl}_2$  ( $C_{\text{CaCl}_2}$ ) : 0,5wt%, 5wt% et 10wt%). Les barres d'erreurs sont dans les symboles.

L'équation d'ajustement permet de déterminer, par extrapolation de  $V_p$  à  $F=0$  (axe des abscisses), le potentiel  $V_{p0}$  que l'on a dû appliquer sur le bras mobile pour l'approcher de la microparticule jusqu'au contact.  $V_{p0}$  est alors la valeur maximale de  $V_p$  pour laquelle  $F$  est encore égale à 0, car la microparticule n'est pas encore comprimée. Comme  $V_{p0}$  correspond à un déplacement dans l'air du bras mobile pour aller toucher la microparticule, on peut utiliser la calibration de la Figure 97 pour déterminer la valeur de  $e_0$  correspondante.

Le Tableau 10 montre les valeurs de  $V_{p0}$  et de  $e_0$  obtenues pour chaque microparticule. Dans nos expériences,  $e_0$  correspond donc au diamètre ( $d$ ) des microparticules, avant leur compression. Il est à noter que la microparticule de Ca-alginate gélifiée par  $\text{CaCl}_2$  de 10wt% est obtenue à partir de la microparticule de Na-alginate caractérisée dans le Tableau 10. On remarque que la valeur de  $d$  sur la microparticule de Ca-alginate est supérieure à celle mesurée sur la microparticule de Na-alginate. Ceci est caractéristique d'un gonflement des microparticules lorsqu'elles sont en présence de la solution de  $\text{CaCl}_2$ , ce qui a été également observée sur les images au microscope optique du Tableau 8 (C.II.2.2.).

Tableau 10. Valeurs de  $V_{p0}$  et  $e_0$  (ou  $d$ ) obtenues pour chaque microparticule.

Microparticules	$C_{\text{CaCl}_2}$ (wt%)	$V_{p0}$ ( $\pm 0,1\text{V}$ )	$e_0$ ou $d$ ( $\pm 0,1\mu\text{m}$ )
Na-alginate	0	118,6	31,8
Ca-alginate	0,5	105,2	46,1
	5	108,3	42,9
	10	112,0	39,0

Nous remarquons également que la micro-pince est capable d'attraper et de déplacer toutes les microparticules. Par contre, l'observation au microscope optique ne donne pas les mêmes résultats pour les deux catégories de microparticules :

- Dans le cas des microparticules de Na-alginate, lorsque  $V_p$  est élevé, le bras mobile a tendance à glisser sur la microparticule (Figure 99). Cela indique que la microparticule est moins compressible avant gélification.

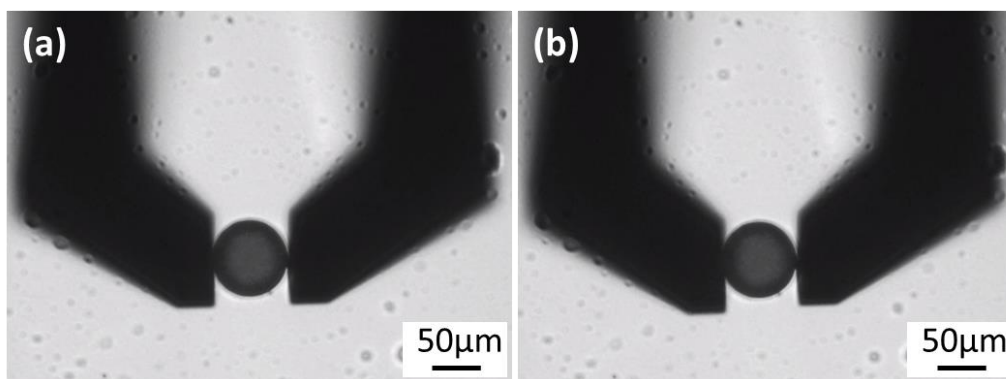


Figure 99. Image au microscope optique d'une microparticule de Na-alginate sèche dans la micro-pince : (a) lors du contact et (b) lors du pincement.

- Dans le cas des microparticules de Ca-alginate, à partir du moment où le bras mobile est en contact avec la surface, aucun glissement de ce dernier ou déplacement du bras fixe n'est observé avec la croissance de  $V_p$ . Par contre, le bras mobile n'est plus déplacé dans l'air comme avant, mais contre la microparticule. Par conséquent, le coefficient de frottement augmente considérablement ce qui fait diminuer la variation de  $e$  avec  $V_p$ . On ne peut donc plus utiliser la calibration de la Figure 97 pour déterminer la compression.

Pour conclure, la micro-pince permet de manipuler les microparticules de diamètre de 30-50 $\mu\text{m}$ . On peut également évaluer la taille des microparticules avec précision et les valeurs sont cohérentes avec celles déterminées sur les images au microscope optique. Enfin la mesure de  $F$  en fonction de  $V_p$  montre une compression des microparticules qui est plus importante pour celles de Ca-alginate que celles de Na-alginate. Cependant, il est difficile d'évaluer cette compression pour différencier les microparticules entre elles et de calculer un module de Young. Donc une méthode plus quantitative est nécessaire.

### III.3.2. Mesure quantitative par la microscopie à force atomique (AFM)

Nous avons mesuré le module de Young ( $E$ ) des microparticules grâce à un dispositif AFM du Laboratoire Adhésion et Inflammation (LAI) (B.II.3.2.2.). La Figure 100 montre un exemple de la courbe de force obtenue en indentant une microparticule de Ca-alginate (diamètre d'environ 35 $\mu\text{m}$ ) avec la pointe AFM. Le processus d'approche de la pointe est décrit par la courbe en bleu clair. La pointe part de quelques micromètres au-dessus de la microparticule et ne subit pas de déflexion tant qu'elle n'est pas en contact avec la microparticule. A partir du contact (à la distance 0 sur l'axe des abscisses), la déflexion apparaît et augmente avec l'indentation sur la microparticule jusqu'à la force maximale appliquée. Puis le processus de retrait de la pointe est décrit par la courbe en bleu foncé.

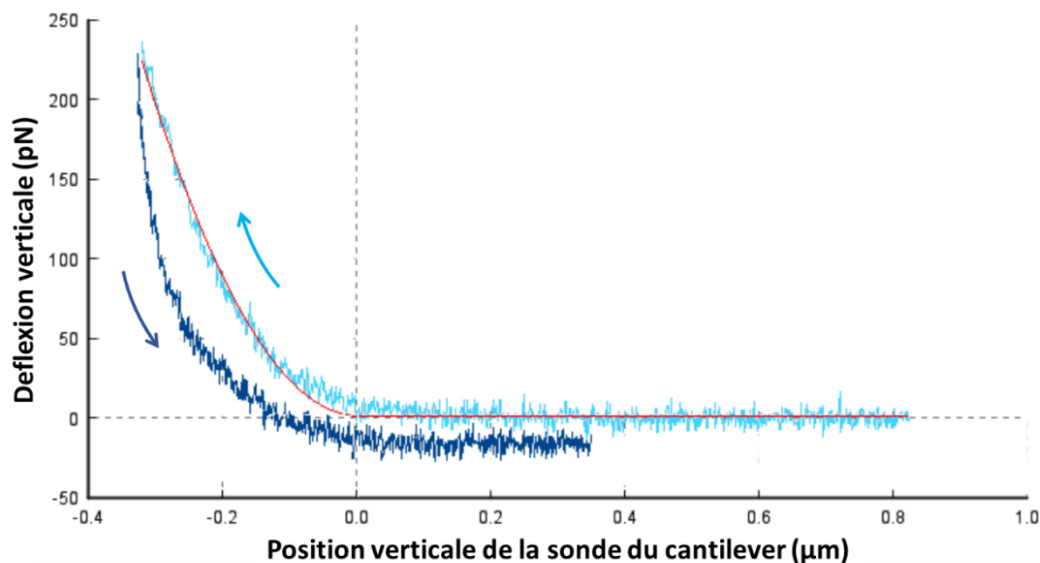


Figure 100. Exemple de courbe d'approche (bleu clair) et de retrait (bleu foncé) de la pointe sur une microparticule de Ca-alginate. Conditions de préparation :  $C_i = 0,25\text{wt}\%$ ,  $Q_{DMC} = 0,15\mu\text{L/s}$ ,  $Q_{alginate} = 0,003\mu\text{L/s}$  ; la gélification est réalisée par  $\text{CaCl}_2$  de 0,5wt%.

La profondeur d'indentation est donnée par la distance parcourue (en valeur négative sur l'abscisse) à partir de la valeur 0. Et le module de Young ( $E$ ) est déterminé en ajustant la courbe d'approche avec le modèle de Hertz (Bilodeau 1992) (courbe en rouge dans la Figure 100). Plus de détail du traitement des données est présenté dans l'Annexe 5. Ces mesures sont réalisées sur des microparticules de Na-alginate dans le DMC et celles de Ca-alginate dans l'eau. L'indentation est en général inférieure à 350nm, ce qui correspond à moins de 1% du diamètre de la microparticule de Ca-alginate ( $\approx 35\mu\text{m}$ ). Ainsi le module de Young ( $E$ ) est mesuré à la surface des microparticules. De plus, la mesure est réalisée sur 64 points de la surface pour chaque microparticule (Figure 101).

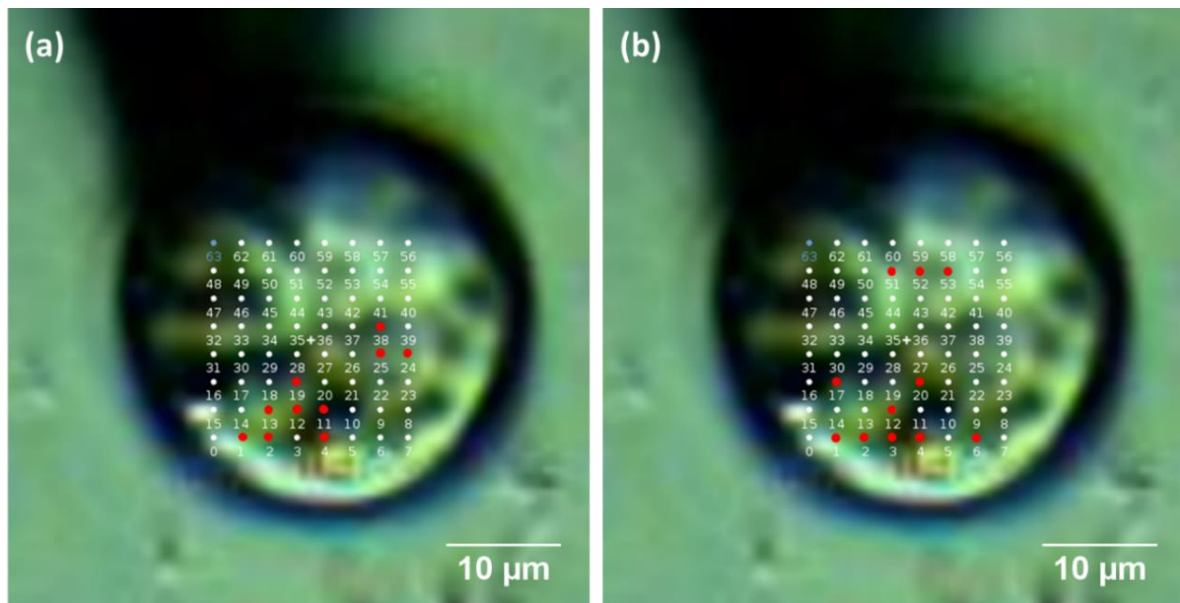


Figure 101. Distribution des points de mesure sur la surface des microparticules suivant une grille de 64 points.

Les mesures de  $E$  varient d'un point à l'autre sur la microparticule, et d'une microparticule à l'autre d'un même batch d'expérimentation. Les valeurs maximales de  $E$  sont présentées par les points rouges dans la Figure 101. Ceci peut être lié à la rugosité de la surface. Cependant, selon la forme de la microparticule (Figure 87 (d-e)), leur surface est lisse. Une seconde explication peut venir de la structure interne poreuse des microparticules. En effet, comme on le voit dans la Figure 102, l'épaisseur de la coque entre la surface et les pores les plus proches peut varier. Ainsi lors de l'indentation par la pointe jusqu'à une distance de 350nm, on peut imaginer que  $E$  est d'autant plus faible que la coque est fine.

Les résultats de distance d'indentation et de  $E$  sont résumés dans le Tableau 11. Pour les microparticules de Na-alginate,  $E$  est de l'ordre du MPa et l'indentation est inférieure à 100nm. Alors que pour les microparticules de Ca-alginate,  $E=47\pm 43\text{kPa}$  avec une indentation d'environ 320nm (Figure 100). Cette diminution de  $E$  après la gélification semble due au gonflement des microparticules par absorption de l'eau.

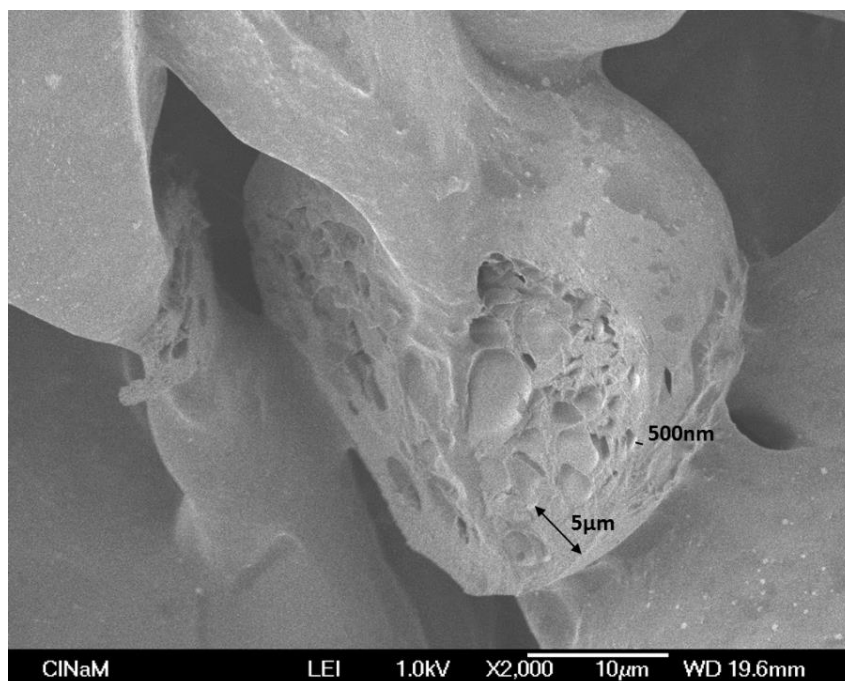


Figure 102. Image au MEB d'une microparticule de Ca-alginate qui présente des épaisseurs de coque variées

Tableau 11. Résultats de la mesure du module de Young  $E$  de microparticules de Na-alginate dans le DMC et de Ca-alginate dans l'eau. Conditions de préparation :  $C_i=0,25\text{wt}\%$ ,  $Q_{DMC}=0,15\mu\text{L/s}$ ,  $Q_{alginate}=0,003\mu\text{L/s}$  et  $C_{CaCl_2}=0,5\text{wt}\%$ .

Microparticules	Indentation (nm)	Module de Young
Na-alginate	<100	≈MPa
Ca-alginate	≈320	47±43kPa

Pour comparer avec le module de Young des GRs, nous avons trouvé plusieurs méthodes de mesure dans la littérature. En appliquant des paramètres similaires aux nôtres dans le modèle de Hertz, Dulińska et al. reportent une valeur de  $26\pm 7\text{kPa}$  pour les GRs (Dulińska et al. 2006). Nous remarquons donc que cette valeur est du même ordre que celle mesurée sur les microparticules de Ca-alginate. Par ailleurs, des valeurs élevées de  $E$  sont trouvées sur des GRs pathologiques, comme par exemple  $E=90\pm 20\text{kPa}$  pour des érythrocytes avec une déficience (en G6PD) (Dulińska et al. 2006). C'est également le cas sur des cellules spécifiquement traitées, comme par exemple par le formol ce qui donne  $E=191\pm 28\text{kPa}$  (Girasole, Dinarelli, and Boumis 2012). Néanmoins, les valeurs de  $E$  que nous avons mesurées sur les microparticules de Na-alginate sont encore plus élevées. Par conséquent, la gélification est une étape nécessaire aussi bien pour atteindre des propriétés mécaniques proches de celles des GRs que pour les rendre insolubles dans l'eau.

*Les résultats présentés aux Chapitre I – Chapitre III sont également présentés dans un article scientifique (Zhang et al. 2020) dont la publication a été acceptée par la revue « Chemical Engineering Science ».*

## Chapitre IV. Mesures ultrasonores

Ce travail de thèse s'inscrit dans un projet ANR nommé **CUMBA**, dont un des objectifs est de proposer une nouvelle technique de caractérisation ultrasonore de l'agrégation des globules rouges (GRs) dans le sang. Cette technique se base sur l'analyse de l'énergie acoustique rétrodiffusée par les GRs ou des agrégats de GRs. L'analyse du signal ultrasonore diffusé permet d'obtenir des informations sur la taille et la concentration des agrégats de GRs. Afin d'évaluer les performances de cette nouvelle technique en cours de développement au Laboratoire de Mécanique et d'Acoustique (LMA), les premiers essais doivent être menés sur des microparticules calibrées dont on peut avoir une bonne connaissance de la forme et de la composition. Dans un premier temps des essais ont été effectués sur des microparticules de polystyrène (PS) dont la taille est comparable à celle des agrégats (20  $\mu\text{m}$  de diamètre environ). Cependant, le comportement acoustique de ces microparticules ne correspond pas à celui des GRs. L'objectif de mon travail était donc de fournir des microparticules dont le comportement acoustique est plus proche que le PS (ou les autres matériaux disponibles dans le commerce) de celui des GRs. Pour cela les microparticules de Ca-alginate obtenues au cours de ce travail (Chapitre II) sont parfaitement adaptées.

### IV.1. Technique de diffusion ultrasonore

La technique de diffusion ultrasonore utilisée au LMA (Figure 103) consiste à exposer un objet à une onde ultrasonore émise par un transducteur et à procéder à une analyse spectrale des signaux rétrodiffusés par l'objet. L'analyse du spectre des signaux reçus donne des informations sur la microstructure de l'objet, la taille et les propriétés mécaniques.

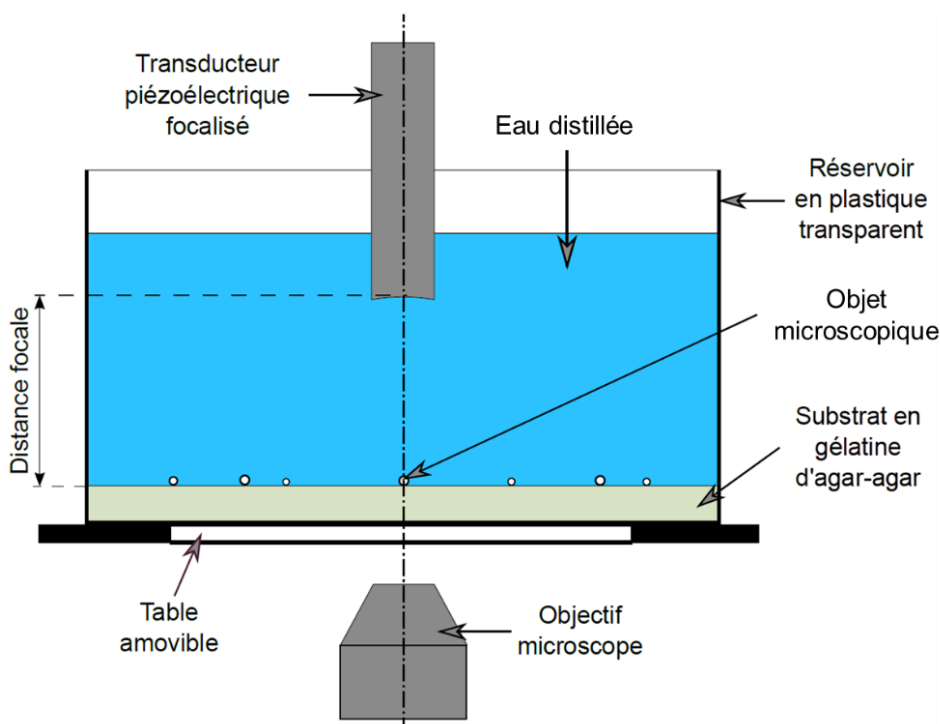


Figure 103. Schéma du montage de la technique de diffusion ultrasonore

La méthode utilisée est inspirée du travail de Falou et Rui (Falou and Rui 2010). Une suspension avec quelques microparticules est aspirée à l'aide d'une micropipette et ajoutée dans un réservoir rempli d'eau distillée (Figure 103). Les microparticules se déposent alors sur le substrat fin ( $\approx 3\text{mm}$ ) d'agar-agar, qui est disposé préalablement au fond du réservoir. Un transducteur piézoélectrique focalisé est utilisé pour émettre des ondes ultrasonores et aussi recevoir les signaux rétrodiffusés par une microparticule isolée. Il faut noter que le substrat en gélatine d'agar-agar est transparent, ce qui permet l'observation de la microparticule avec un microscope optique par dessous. De plus, l'impédance acoustique de ce substrat est faible, ce qui ne perturbe pas la mesure sur les microparticules.

La mesure est réalisée dans une bande de fréquences centrée sur 35MHz. A partir des signaux rétrodiffusés, on peut déterminer la section efficace différentielle ( $\sigma_{bs}$ ) qui permet de quantifier le pouvoir diffusant dans la direction du transducteur, ce dernier étant utilisé en émission/réception.  $\sigma_{bs}$  est définie comme le rapport entre la puissance rétrodiffusée  $d\Pi_{bs}$  par unité d'angle solide  $d\Omega$  et l'intensité de l'onde incidente  $I_0$  (Equation 24).

$$\sigma_{bs} = \frac{1}{I_0} \frac{d\Pi_{bs}}{d\Omega}$$

Equation 24

L'analyse des signaux rétrodiffusés par la microparticule nous permet de tracer  $\sigma_{bs}$  dans la bande de fréquences utiles. Les résultats ainsi obtenus sont alors comparés aux solutions théoriques disponibles dans la littérature dans le cas de microparticules sphériques :

1) le modèle d'Anderson (Anderson 1950) valide dans le cas où la microparticule est composée d'un matériau « fluide » sur le plan acoustique, c'est-à-dire dans lequel seules des ondes de compression se propagent. C'est le cas de la plupart des liquides, mais aussi de certains matériaux biologiques (peau, graisse) et également des GRs.

2) le modèle de Faran (Faran 1951) valide dans le cas où la microparticule est composée d'un matériau « élastique » sur le plan acoustique, c'est-à-dire dans lequel se propagent à la fois des ondes de compression et des ondes de cisaillement. C'est le cas des métaux, de la plupart des résines et des matériaux plastiques.

## IV.2. Diffusion ultrasonore sur des microparticules

Dans le cas des mesures sur les agrégats de GRs, l'énergie acoustique rétrodiffusée est très faible, d'une part à cause de la taille des agrégats (10-30 $\mu\text{m}$ ) mais également à cause du faible contraste d'impédance acoustique entre les agrégats et le milieu environnant. Sachant que l'impédance acoustique est le produit entre la densité et la vitesse des ondes de compression ultrasonores. En effet, l'impédance acoustique du milieu composant l'intérieur des GRs est très proche de celle du plasma. L'énergie acoustique rétrodiffusée par les agrégats de GRs sera donc très faible. Dans ce cas-là, le modèle d'Anderson est mieux adapté pour décrire la rétrodiffusion ultrasonore des GRs qui sont un matériau fluide.



Dans un premier temps, les performances de la méthode de caractérisation ultrasonore des agrégats de GRs ont été évaluées sur des microparticules dont on connaît la forme (sphérique), les dimensions et le matériau les composant. Pour cela, les tests ont été réalisés sur des microparticules de PS sphériques. Mais le PS est un matériau « élastique » dont le contraste d'impédance avec l'eau (ou le plasma) est beaucoup plus important que celui des GRs. Dans un second temps, la méthode a été évaluée sur les microparticules de Ca-alginate, dans le but de valider la faisabilité de la mesure sur des objets dont le comportement acoustique doit être plus proche de celui des GRs.

#### IV.2.1. Essais préliminaires sur des microparticules de polystyrène (PS)

Les premiers essais sur des microparticules de PS ont été menés dans le cadre d'un stage de Master (Antoine Weber, 2017). Sur la Figure 104 est représentée la section efficace de rétrodiffusion mesurée sur des microparticules sphériques de PS de 20 $\mu\text{m}$  de diamètre, ainsi que le résultat de la simulation numérique utilisant le modèle élastique de Faran. Nous pouvons observer un bon accord entre la théorie et la mesure expérimentale, ce qui montre la faisabilité de la mesure ultrasonore sur des microparticules de très petite taille devant la longueur d'onde de 40 $\mu\text{m}$  environ à 35MHz.

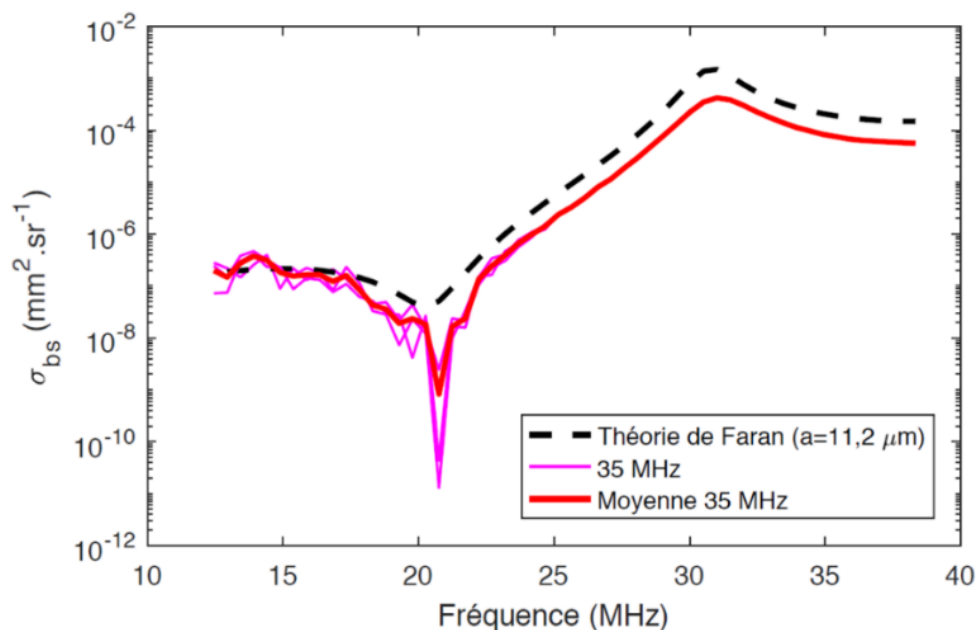


Figure 104. Rétrodiffusion ultrasonore des microparticules de PS de diamètre 20 $\mu\text{m}$  en fonction de la fréquence et comparaison avec le modèle de Faran (a : rayon de la microparticule). Plusieurs essais sont effectués avec le transducteur 35MHz. Leurs résultats sont tracés en courbes violets et la valeur moyenne est tracée en courbe rouge.

Dans un second temps les mesures ont été faites au LMA sur des microparticules de Ca-alginate dont les propriétés acoustiques (vitesse des ondes ultrasonores, densité) doivent être plus proches de celles des GRs, par rapport aux microparticules de PS.

#### IV.2.2. Mesure de la rétrodiffusion sur les microparticules de Ca-alginate

Les mesures sont effectuées sur 5 microparticules de Ca-alginate de diamètre 35 $\mu\text{m}$  issues d'une même préparation, qui ont été mises en suspension dans de l'eau distillée. Les 5 courbes de rétrodiffusion ultrasonore ( $\sigma_{bs}$ ) sont présentées dans la Figure 105. Nous observons une bonne reproductibilité des mesures ultrasonores, ce qui semble indiquer que les microparticules sont « identiques » du point de vue de leur comportement acoustique dans la gamme de fréquences ultrasonores utilisées.

Les résultats obtenus sur les microparticules de Ca-alginate ont été comparés à des simulations numériques utilisant le modèle fluide d'Anderson (avec des paramètres acoustiques proches de ceux des GRs). Nous observons que le comportement acoustique des microparticules de Ca-alginate est plus proche de celui des GRs que les microparticules de PS.

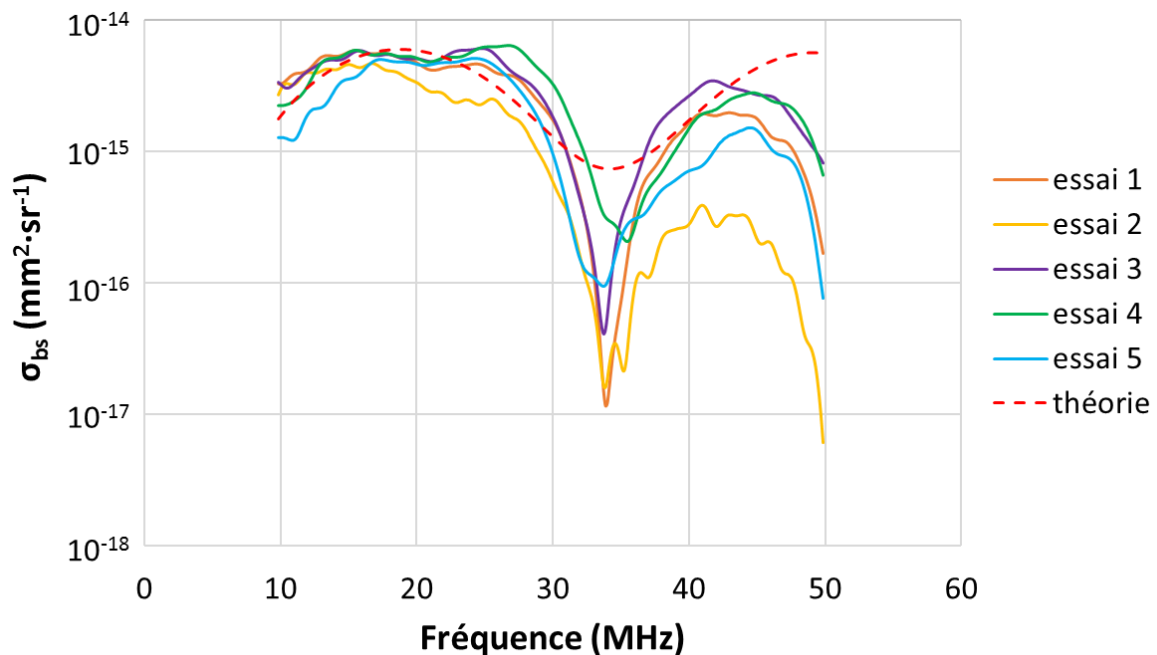


Figure 105. Rétrodiffusion ultrasonore des microparticules de Ca-alginate de diamètre 35 $\mu\text{m}$  en fonction de la fréquence et ajustement par le modèle d'Anderson. Conditions de préparation :  $C_i=0,25\text{wt}\%$ ,  $Q_{DMC}=0,15\mu\text{l/s}$ ,  $Q_{alginate}=0,005\mu\text{l/s}$  et  $C_{CaCl_2}=5\text{wt}\%$ .

La mesure ultrasonore est aussi effectuée avec une microparticule de Ca-alginate de diamètre 25 $\mu\text{m}$ . Dans la Figure 106, sa rétrodiffusion ultrasonore est comparée avec celle d'une microparticule de 35 $\mu\text{m}$  (essai 2 dans la Figure 105). Nous observons un décalage en fréquence des pics de rétrodiffusion, ce qui montre que ce type d'analyse permet dès à présent de différencier des microparticules de tailles différentes.

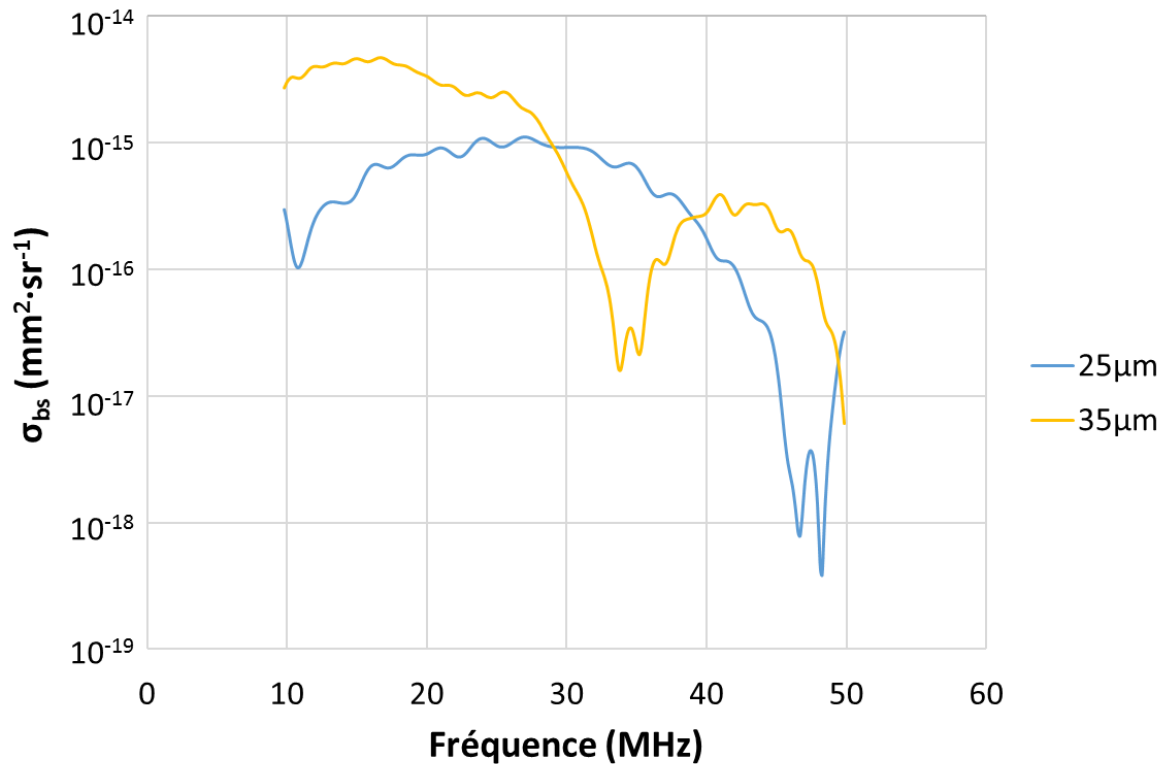


Figure 106. Comparaison de la rétrodiffusion ultrasonore entre une microparticule de Ca-alginate de 25 $\mu\text{m}$  et de 35 $\mu\text{m}$  de diamètre, en fonction de la fréquence.

Des études sont en cours au LMA afin de poursuivre ces analyses, mais ces premiers essais sur des microparticules de Ca-alginate ont montré la faisabilité de la mesure ultrasonore sur des objets qui correspondent, autant par leurs dimensions que par leur comportement acoustique, à des agrégats de GRs. Les travaux menés dans le cadre de ma thèse ont donc permis de disposer de microparticules de Ca-alginate dont la taille et les propriétés mécaniques sont comparables à celles des agrégats de GRs.

## Chapitre V. Méthodes alternatives

Tout au long de la thèse, j'ai fait évoluer la méthode de préparation des microparticules en conservant le DMC comme phase continue et le Na-alginate comme matériau des microparticules pour sa facilité de gélification ionique et sa biocompatibilité. Dans ce chapitre, je présente les autres alternatives, que j'ai explorées. Il s'agit des résultats obtenus avec d'autres phases continues pour la génération et/ou la collecte des microparticules et un autre hydrogel, l'agarose.

### V.1. Variation de la phase continue

Dans les chapitres précédents, nous avons décrit les étapes de contraction *in situ* et *ex situ* des microparticules de Na-alginate dans du DMC pur pour atteindre des caractéristiques de taille et de propriétés mécaniques proches des GRs. Dans cette partie nous explorons d'autres phases continues pour estimer leur apport sur ces caractéristiques.

#### V.1.1. Solvants organiques : octan-1-ol et carbonate de diéthyle

Nous avons comparé au DMC, deux autres phases continues peu miscibles avec l'eau, pour la génération et la collecte des gouttes de Na-alginate : l'octan-1-ol et le carbonate de diéthyle (DEC) (Tableau 1, B.I.1.2.). La Figure 107 montre le montage utilisé avec un capillaire de 150 $\mu\text{m}$  de diamètre interne.

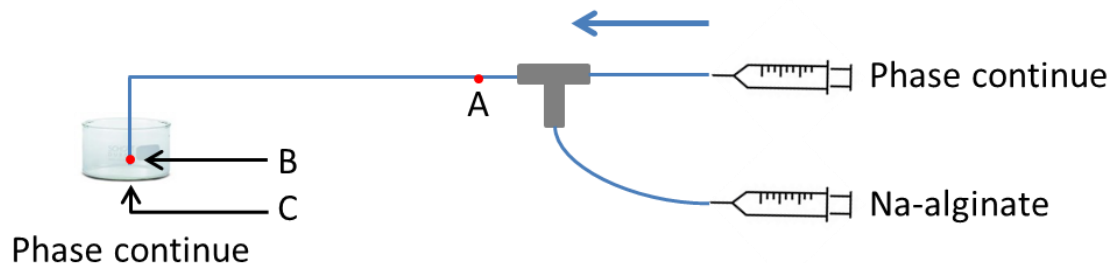


Figure 107. Schéma de la génération et de la collecte des gouttes de Na-alginate dans la phase continue d'octan-1-ol, de DEC ou de DMC.

Comme dans le DMC, nous observons une contraction *in situ* lors de la génération des gouttes de Na-alginate qui se poursuit par une contraction *ex situ* lors de la collecte des microparticules dans l'octan-1-ol et le DEC.

#### V.1.1.1. Contraction *in situ* lors de la génération des gouttes

Les gouttes sont observées au point A et au point B (Figure 107) pour déterminer le taux de réduction du volume ( $TR_{AB}$ ) par l'Equation 15 (C.I.2.). De plus, le flux massique de l'eau des gouttes entre les points A et B ( $J_{AB}$  en  $\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), vers les deux phases continues est évaluée à partir du transfert de masse à travers la surface de la goutte et pendant le temps de séjour des gouttes, par l'Equation 25 dont les paramètres sont décrits à la suite :

$$J_{AB} = \frac{\Delta V_{eau} \times \rho_{eau}}{S_{moy} \times \tau_{moy}}$$

Equation 25

- Le transfert de volume d'eau  $\Delta V_{eau}$  est donné par la différence de volume de la goutte avant et après contraction (entre A et B), en considérant que le transfert de matière est essentiellement dû à l'eau qui diffuse à travers la surface de la goutte vers la phase continue. On utilise alors la densité de l'eau  $\rho_{eau}$  pour évaluer la masse transférée.

- La surface de la goutte varie de A ( $S_A$ ) à B ( $S_B$ ) mais il est difficile d'avoir le profil de variation de la surface avec précision. Par conséquent,  $S_{moy}$  correspond à la moyenne de  $S_A$  et  $S_B$ .

- Le flux étant laminaire (A.II.2.1.1.), la vitesse moyenne des gouttes est calculée à partir de l'Equation 13 (C.I.2.), avec la section du capillaire de diamètre  $D=150\mu\text{m}$  et le débit de la phase continue  $Q_{phase\ continue}=0,15\mu\text{L/s}$ . Ainsi le temps moyen de séjour des gouttes ( $\tau_{moy}$ ) est donné par l'Equation 26 avec  $L_{AB}$  la longueur du capillaire entre A et B :

$$\tau_{moy} = \frac{\pi \times \left(\frac{D}{2}\right)^2 \times L_{AB}}{Q_{phase\ continue}}$$

Equation 26

D'après le Tableau 12, d'une part  $TR_{AB}$  calculé dans le cas du DEC montre une contraction *in situ* négligeable, ce qui est cohérent avec la très faible solubilité de l'eau dans le DEC. Cet effet est accentué par  $J_{AB}$  qui est également faible pour le DEC. D'autre part, la contraction est plus efficace dans le DMC que dans l'octan-1-ol alors que la solubilité de l'eau est plus élevée dans ce dernier. Cependant, comme  $\tau_{moy}$  est de 22,4s, la solubilisation de l'eau n'a pas atteint l'équilibre, ce qui est confirmé par la contraction qui se poursuit *ex situ*. Par conséquent, la contraction est limitée par  $J_{AB}$  qui est presque deux fois plus important pour le DMC que pour l'octan-1-ol.

Tableau 12. Contraction *in situ* et flux massique déterminés pour le DMC, l'octan-1-ol et le DEC. Conditions de la génération des gouttes :  $C_i = 0,06\text{wt}\%$ ,  $Q_{phase\ continue} = 0,15\mu\text{L/s}$ ,  $Q_{alginate} = 0,005\mu\text{L/s}$  et  $L_{AB} = 19\text{cm}$ .

Phase continue	Solubilité de l'eau à 20°C (wt%)	$d_A$ ( $\mu\text{m}$ )	$d_B$ ( $\mu\text{m}$ )	$TR_{AB}$ (%)	$J_{AB}$ ( $\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )
DMC	3	152	96	75	$12,1 \times 10^{-4}$
Octan-1-ol	4,5	156	126	47	$6,6 \times 10^{-4}$
DEC	0,89	175	174	2	$2,2 \times 10^{-5}$

### V.1.1.2. Contraction *ex situ* lors de la collecte des microparticules

Les microparticules sont observées au fond de la boîte de Pétri (au point C dans la Figure 107) après 1h dans la phase de collecte. Nous observons qu'elles sont sphériques pour les 3 solvants (Figure 108).

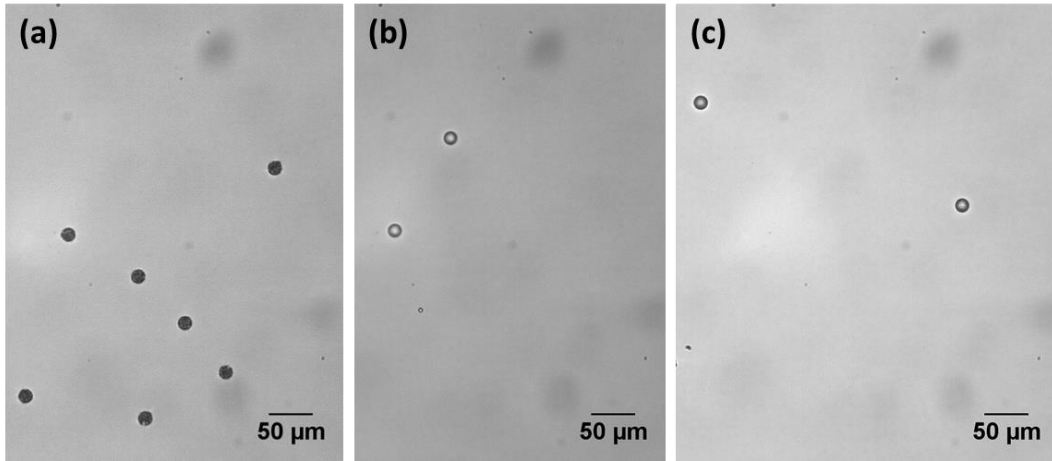


Figure 108. Images au microscope optique des microparticules de Na-alginate préparées avec les 3 phases continues : (a) le DMC ; (b) l'octan-1-ol et (c) le DEC. Conditions de la génération des gouttes :  $C_i=0,06\text{wt}\%$ ,  $Q_{\text{phase continue}}=0,15\mu\text{L/s}$ ,  $Q_{\text{alginate}}=0,005\mu\text{L/s}$  et  $L_{AB}=19\text{cm}$ .

De plus, comme dans l'étude avec le DMC (C.I.3.), nous avons mesuré le diamètre final des microparticules ( $d_f$ ) au point C pour le représenter en fonction du diamètre initial ( $d_i$ ) au point A. Nous avons également calculé la concentration finale ( $C_f$ ), avec l'Equation 23 (I.3.3.), que nous avons représentée en fonction de  $d_i$ . Les résultats sont montrés dans la Figure 109. Les premières données avec l'octan-1-ol et le DEC montrent que pour un même  $d_i$ , les microparticules se contractent plus et donc se concentrent plus lorsqu'elles sont collectées dans ces solvants que dans le DMC.

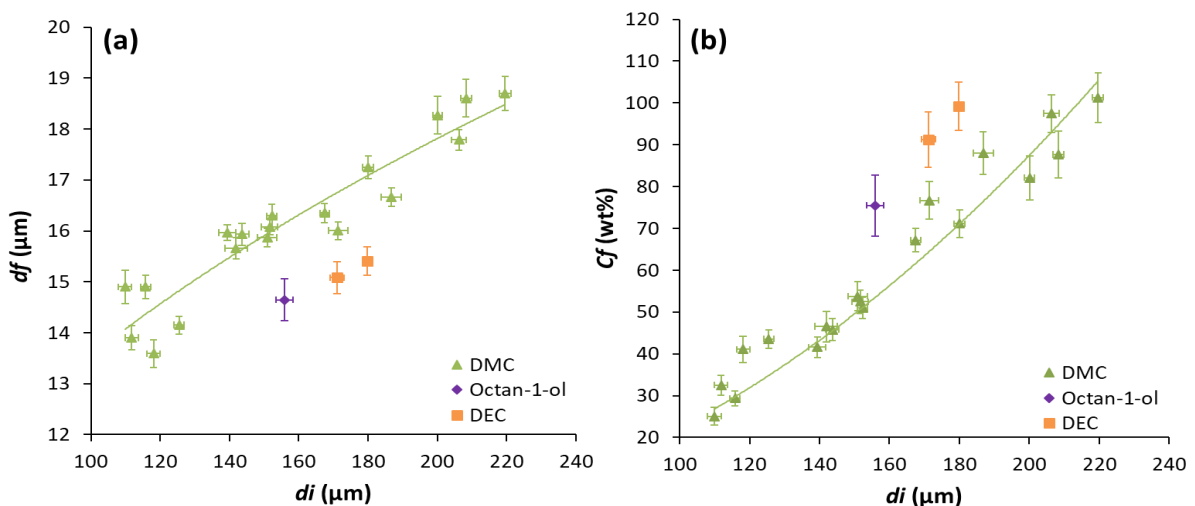


Figure 109. (a) Diamètre final des microparticules  $d_f$  et (b) leur concentration finale  $C_f$  en fonction de leur diamètre initial  $d_i$  après génération et collecte des gouttes dans les 3 phases continues : DMC, octan-1-ol et DEC. Conditions de la génération des gouttes :  $C_i=0,06\text{wt}\%$ ,  $Q_{\text{phase continue}}=0,15\mu\text{L/s}$ ,  $Q_{\text{alginate}}=0,005\mu\text{L/s}$  et  $L_{AB}=19\text{m}$ .

Dans le cas de l'octan-1-ol, la solubilité de l'eau élevée explique la contraction *ex situ* plus importante que pour le DMC, car on doit être plus proche de l'équilibre après 1h de collecte. De même, les valeurs faibles de  $J_{AB}$  (Tableau 12) et de  $\tau_{moy}$  expliquent la contraction *ex situ* plus importante que celle *in situ*.

Dans le cas du DEC, la contraction *ex situ* est plus importante que pour le DMC alors que la solubilité de l'eau et  $J_{AB}$  sont plus faibles que pour le DMC (Tableau 12). Les travaux de Yang et al. sur la migration de l'alginate à la surface lors de la diffusion de l'eau et sur la formation d'une coque permettent d'expliquer ce résultat (Yang et al. 2015). En effet,  $J_{AB}$  étant beaucoup plus élevé pour le DMC, la coque se forme plus rapidement que pour le DEC. Ceci semble donc freiner la diffusion de l'eau dans le DMC alors que qu'elle se poursuit dans le DEC, tout en étant lente ( $J_{AB}$  faible). Cependant 1h de collecte est suffisant pour que  $\Delta V_{eau}$  dans le DEC dépasse celle dans le DMC.

### V.1.2. Mélange DMC/éthanol

Nous avons vu dans le chapitre II que la collecte dans une solution aqueuse crée une interface qui déforme les gouttes (C.II.2.1.1.), dû à leur miscibilité partielle. Nous avons alors amélioré cette miscibilité en collectant dans un mélange monophasique DMC/éthanol, après avoir généré les microparticules de Na-alginate dans du DMC, comme auparavant (Figure 110). Nous varions la concentration en éthanol ( $C_{éthanol}$ ) dans le DMC de 0 à 100wt%.

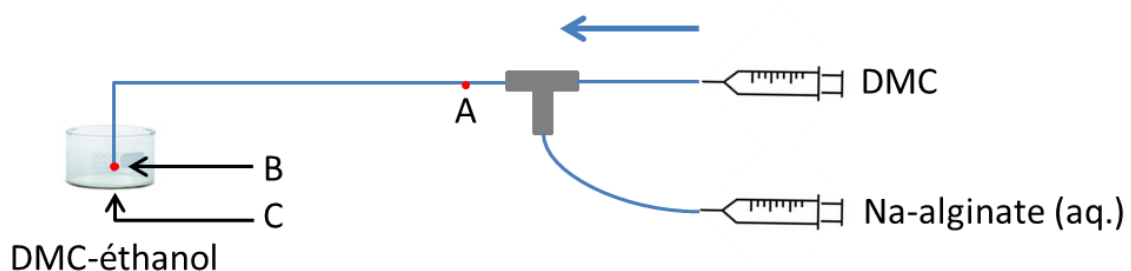


Figure 110. Schéma de la génération dans du DMC et de la collecte des gouttes dans un mélange de DMC-éthanol.

Au point A (Figure 110), nous n'observons pas de perturbation sur la génération des gouttes, qui pourrait être liée à la collecte dans le mélange DMC-éthanol. De plus, grâce à la miscibilité du DMC avec l'éthanol, il n'y a pas d'interface à l'extrémité du capillaire (point B). Dans la Figure 111, l'observation des microparticules au point C suivant  $C_{éthanol}$  du mélange de collecte est comparée aux résultats obtenus dans le DMC pur. Nous notons une différence en forme et en taille des microparticules.

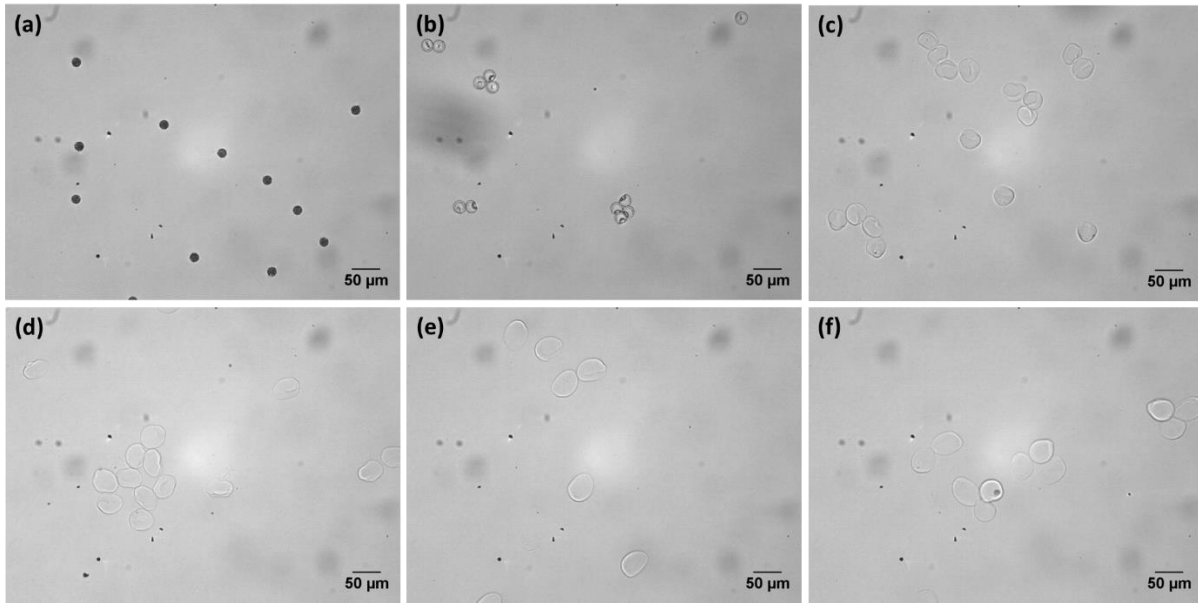


Figure 111. Images au microscope optique (au point C) des microparticules collectées dans un mélange de DMC-éthanol de concentration  $C_{\text{éthanol}}$  en wt% de (a) 0, (b) 5, (c) 20, (d) 40, (e) 80, (f) 100. Conditions de la génération des gouttes :  $C_i = 0,06\text{wt}\%$ ,  $Q_{DMC} = 0,15\mu\text{L/s}$ ,  $Q_{\text{alginate}} = 0,005\mu\text{L/s}$  et  $L_{AB} = 19\text{cm}$ .

#### V.1.2.1. Forme des microparticules collectées

D'un point de vue forme, les microparticules collectées dans du DMC pur sont sphériques (Figure 111 (a)), alors que celles collectées dans le mélange de DMC-éthanol sont déformées (Figure 111 (b-f)). De plus, ces dernières présentent un creux à  $C_{\text{éthanol}}$  de 5wt%, (Figure 111 (b)) et elles semblent être capables de se « plier » lorsque  $C_{\text{éthanol}}$  croît de 20 à 100wt% (Figure 111 (c-f)). Ainsi leur déformation augmente avec  $C_{\text{éthanol}}$ .

Il faut savoir qu'à part l'éthanol (Figure 112 (a)), nous observons également une déformation quand la collecte des microparticules est effectuée dans d'autres solvants totalement miscibles avec l'eau comme le propan-1-ol (Figure 112 (b)) et l'acide acétique (Figure 112 (c)), même si les formes des microparticules sont différentes. Par contre, la collection dans des solvants semblables au DMC, c'est-à-dire partiellement miscibles avec l'eau (Tableau 1, B.I.1.2.), comme le butan-1-ol (Figure 112 (d)), l'octan-1-ol (Figure 112 (e)) et le DEC (Figure 112 (f)), montre des microparticules qui conservent leur forme sphérique. Par conséquent, on peut en déduire que la déformation des microparticules est liée à la miscibilité du milieu de collecte avec l'eau.



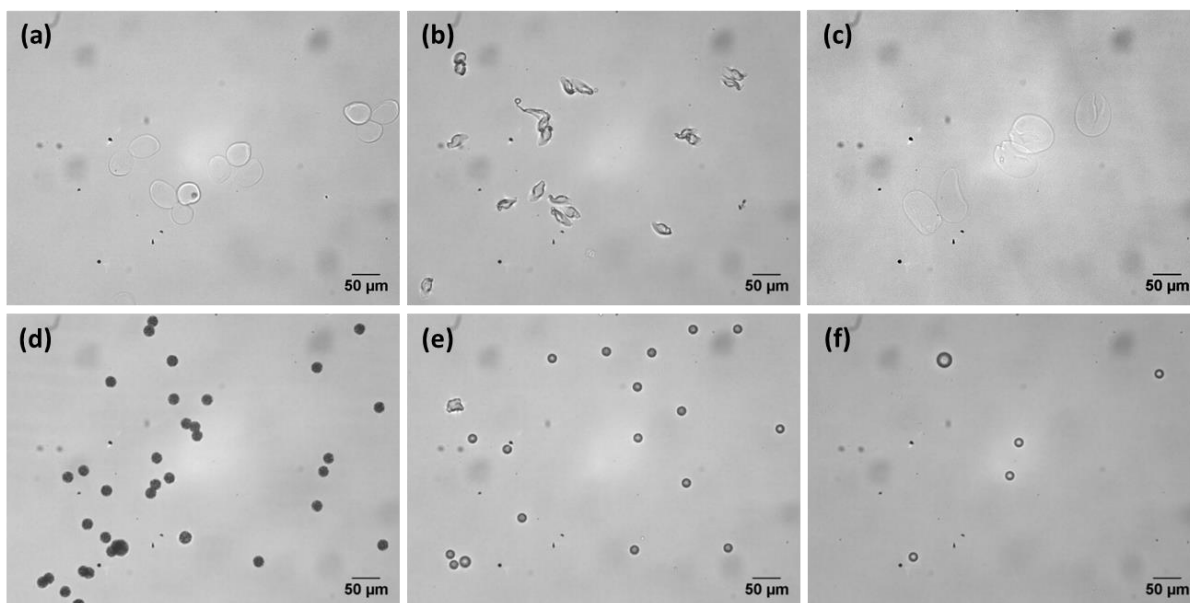


Figure 112. Images au microscope optique des microparticules collectées dans (a) l'éthanol, (b) le propan-1-ol, (c) l'acide acétique, (d) le butan-1-ol, (e) l'octan-1-ol et (f) le DEC. Les gouttes sont générées dans du DMC avec les conditions :  $C_i=0,06\text{wt}\%$ ,  $Q_{DMC}=0,15\mu\text{L/s}$ ,  $Q_{alginate}=0,005\mu\text{L/s}$  et  $L_{AB}=19\text{cm}$ .

Par ailleurs, Yang et al. observent également un creux (Figure 93 (c et e) au Chapitre III) lors de la préparation de microparticules de NaPSS avec la méthode de l'injection (C.I.3.2.) (Yang et al. 2015). Alors qu'ils observent des microparticules sphériques (Figure 93 (a)) lorsque la concentration initiale de NaPSS est élevée. Ils l'expliquent par la viscosité de la solution de NaPSS qui augmente avec la concentration. En effet, lorsque la solution de NaPSS est peu visqueuse, les molécules de NaPSS diffusent facilement vers la surface, créant une cavité à l'intérieur (Figure 93 (d et f)), ce qui provoque l'effondrement de la surface et la formation d'un creux. Lorsque la viscosité de la solution est élevée, les molécules de NaPSS diffusent plus lentement vers la surface et la structure intérieure est plus homogène sans cavité (Figure 93 (b)) donnant une forme plus sphérique.

Ainsi dans nos expériences, on peut donc supposer qu'en augmentant la concentration en alginate dans les microparticules qui sortent en B ( $C'_{alginate}$ ), on augmentera leur viscosité et on réduira leur déformation. Or dans notre étude (C.I.2.1.1.), nous avons vu que la contraction *in situ* des microparticules de Na-alginate et donc  $C'_{alginate}$  augmente avec le temps de séjour et donc la longueur du capillaire entre les points A et B ( $L_{AB}$ ). Et  $C'_{alginate}$  est évaluée à partir des diamètres  $d_A$  et  $d_B$  mesurés respectivement en A et B. Dans le Tableau 13, la forme des microparticules de Na-alginate collectées dans  $C_{\text{éthanol}}=100\%$  est présentée suite à trois expériences.

Tableau 13. Etude de l'effet de  $C'_{alginate}$  sur la forme des microparticules collectées dans l'éthanol absolu

N°	Génération des gouttes		Mesure des gouttes <i>in situ</i>			Forme des microparticules
	$C_i$ (wt%)	$L_{AB}$ (cm)	$d_A$ ( $\mu\text{m}$ )	$d_B$ ( $\mu\text{m}$ )	$C'_{alginate}$ (wt%)	
1	0,06	19	119	85	0,17	Pâte pliée
2	0,25	19	116	80	0,76	Goutte
3	0,06	141	130	19	20	Sphère

- L'expérience 1 est réalisée avec les mêmes paramètres  $C_i$  et  $L_{AB}$  que précédemment (Figure 113 (a)) et nous observons que les microparticules ont la même forme « pliée ».

- Pour l'expérience 2,  $C_i$  est multipliée par un facteur 4,2 ce qui augmente  $C'_{alginate}$  à peu près du même facteur, et une forme en « goutte » est observée (Figure 113 (b)). La forme en « goutte » est considérée comme moins déformée que la forme « pliée » (Figure 113 (a)).

- Pour l'expérience 3,  $L_{AB}$  est multiplié par 7,4, ce qui augmente  $C'_{alginate}$  d'un facteur supérieur à 118, et la forme des microparticules est sphérique (Figure 113 (c)). Par conséquent, on évite bien la déformation des microparticules avec  $C'_{alginate}$  suffisamment élevé, c'est-à-dire en augmentant la viscosité. Ce résultat est donc cohérent avec la littérature (Yang et al. 2015).

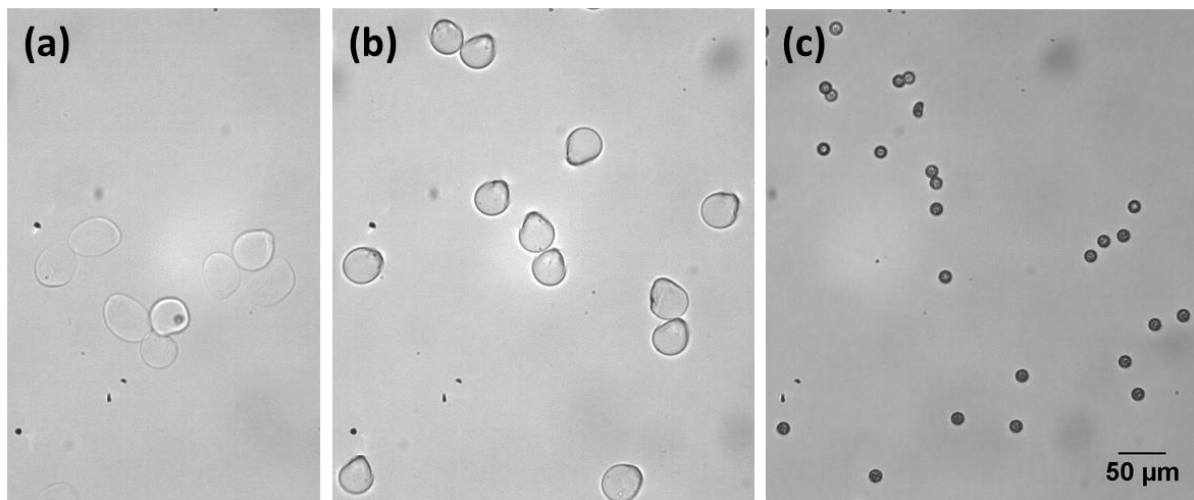


Figure 113. Images au microscope optique des microparticules collectées dans une phase de  $C_{\text{éthanol}} = 100\%$ . La génération des gouttes est réalisée avec :  $Q_{DMC} = 0,15\mu\text{L/s}$ ,  $Q_{alginate} = 0,005\mu\text{L/s}$  et (a)  $C_i = 0,06\text{wt}\%$  et  $L_{AB} = 19\text{cm}$  « forme pâte pliée » ; (b)  $C_i = 0,25\text{wt}\%$  et  $L_{AB} = 19\text{cm}$  « forme goutte » ; (c)  $C_i = 0,06\text{wt}\%$  et  $L_{AB} = 141\text{cm}$  « forme sphère ».

Enfin, malgré la déformation observée pour des valeurs faibles de  $C'_{alginate}$ , nous remarquons que l'utilisation de l'éthanol dans le milieu de collecte rend les microparticules plus transparentes que celles dans le DMC pur (Figure 114). Il faudra alors comparer également les microparticules de Ca-alginate après gélification et collecte dans l'eau. En effet, si elles restent transparentes comme dans la Figure 114, les mesures optiques prévues en écoulement sur les agrégats par l'IRPHE dans le projet **CUMBA** seront réalisables (voir Introduction).

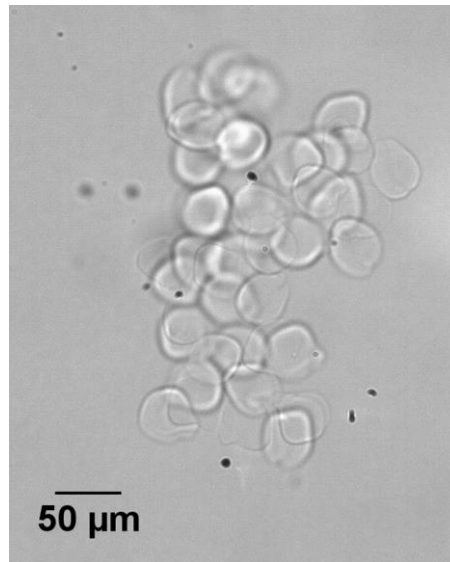


Figure 114. Image au microscope optique des microparticules collectées dans une phase de  $C_{éthanol}=100\%$ . Les gouttes sont générées dans du DMC avec les conditions :  $C_i=0,06wt\%$ ,  $Q_{DMC}=0,3\mu L/s$ ,  $Q_{alginate}=0,01\mu L/s$  et  $L_{AB}=19cm$ .

#### V.1.2.2. Taille des microparticules collectées

Du point de vue de leur taille, les microparticules obtenues à  $C_{éthanol}$  de 5wt% sont moins contractées que dans du DMC pur et cette contraction semble de moins en moins efficace lorsque  $C_{éthanol}$  augmente. Pour évaluer l'effet de  $C_{éthanol}$  sur la contraction *ex situ* des microparticules de Na-alginate suivant la teneur en éthanol du bain de collecte, nous mesurons leur taille. Cependant, dû à la déformation des microparticules, il est difficile de définir leur diamètre, pour calculer le taux de réduction en taille ( $TR_{BC}$ ) entre les points B et C. La taille des microparticules est alors évaluée par leur longueur ( $L$ ) et nous calculons  $TR_{BC}$  en notant qu'au point B les microparticules sont toutes sphériques de diamètre  $D$  (Equation 27).

$$TR_{BC}(\%) = \frac{D - L}{D} \times 100$$

Equation 27

La Figure 115 montre l'évolution de  $TR_{BC}$  en fonction de  $C_{\text{éthanol}}$  et une image des microparticules illustre chaque point de mesure. Pour  $C_{\text{éthanol}}$  de 0 à 30wt%,  $TR_{BC}$  diminue montrant que les microparticules se contractent de moins en moins dans le mélange de collecte. Par conséquent, elles contiennent plus d'eau que celles dans le DMC pur et devraient être plus molles. A partir de  $C_{\text{éthanol}}=30\text{wt}\%$ ,  $TR_{BC}$  atteint une valeur autour de 40%, ce qui montre que la contraction n'est plus influencée par  $C_{\text{éthanol}}$ .

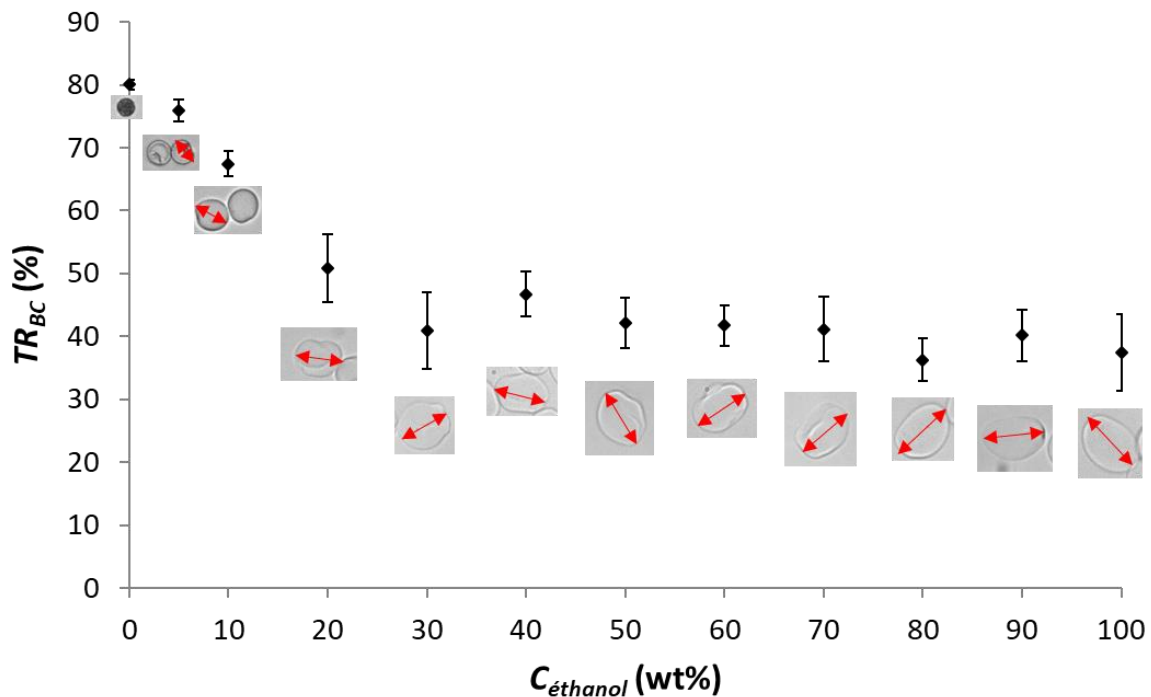


Figure 115. Variation du taux de réduction en taille des microparticules ( $TR_{BC}$ ) entre les points B et C en fonction de  $C_{\text{éthanol}}$ . Des images au microscope optique (au même grossissement) des microparticules illustrent chaque point de mesure.

On peut expliquer cette tendance en appliquant le mécanisme de formation des microparticules par diffusion des molécules d'alginate vers la surface (C.III.2.3.1.) (Yang et al. 2015). En effet, l'ajout d'éthanol qui est totalement miscible avec l'eau accélère la diffusion de l'eau de la microparticule vers le mélange de collecte. Par conséquent, les molécules d'alginate migrent rapidement vers la surface, créant une coque autour de la microparticule. Jusqu'à  $C_{\text{éthanol}}=30\text{wt}\%$ , l'épaisseur de la coque augmente, réduisant la diffusion de l'eau. Pour  $C_{\text{éthanol}}>30\text{wt}\%$ , la coque n'augmente plus en épaisseur et la quantité d'eau qui diffuse est constante quel que soit  $C_{\text{éthanol}}$ .

En conclusion, cette étude sur différentes phases continues apporte d'autres alternatives pour la génération et la collecte des microparticules de Na-alginate :

- D'autres solvants (phases continues) que le DMC, qui sont partiellement miscibles avec l'eau, permettent de générer et collecter les microparticules sphériques. La taille de ces dernières est influencée par la solubilité de l'eau dans la phase continue et aussi par la cinétique de diffusion de l'eau.

- Pour le milieu de collecte, l'ajout d'un solvant totalement miscible avec l'eau, comme l'éthanol, permet de rendre les microparticules plus molles et plus transparentes. Ces caractéristiques sont intéressantes pour les mesures optiques en écoulement. Enfin la déformation des microparticules de Na-alginate peut être contrôlée par la viscosité et donc la concentration en alginate.

## **V.2. Variation de l'hydrogel : l'agarose**

En plus de la gélification ionique du Na-alginate par du  $\text{CaCl}_2$ , nous avons également étudié en parallèle une autre méthode de gélification utilisant la température, comme dans le cas de l'agarose (A.III.3.2.1.). C'était un « plan B » proposé dans le projet ANR, en cas de verrou technique infranchissable dans le cas de l'alginate.

### **V.2.1. Détermination du point de gélification de l'agarose**

Pour l'agarose, le point de gélification ( $T_{gel}$ ) est défini par la température au-delà de laquelle la solution est dans l'état liquide, et en-dessous de laquelle elle devient un gel. Comme  $T_{gel}$  est influencée par la concentration en agarose ( $C_{agarose}$ ) (Buckley et al. 2009) (Zamora-Mora et al. 2014), nous avons varié  $C_{agarose}$  de 0,1 à 4wt% en solution aqueuse et nous avons mesuré  $T_{gel}$  (Figure 116). Pour cela, les solutions sont préparées en mélangeant la poudre d'agarose avec de l'eau à 90°C dans des flacons de 2mL. Puis, elles sont refroidies dans un monopuit sur la platine du microscope optique (B.I.2.4.), qui est thermostaté et permet de diminuer la température de 50°C à 0°C par palier de 2°C/min. On observe le changement d'état du liquide vers le gel et le point de gélification ( $T_{gel}$ ) pour chaque  $C_{agarose}$  (Figure 116). On remarque alors que  $T_{gel}$  augmente avec  $C_{agarose}$  jusqu'à 1wt%. Au-delà de cette valeur,  $C_{agarose}$  a peu d'influence sur  $T_{gel}$ .

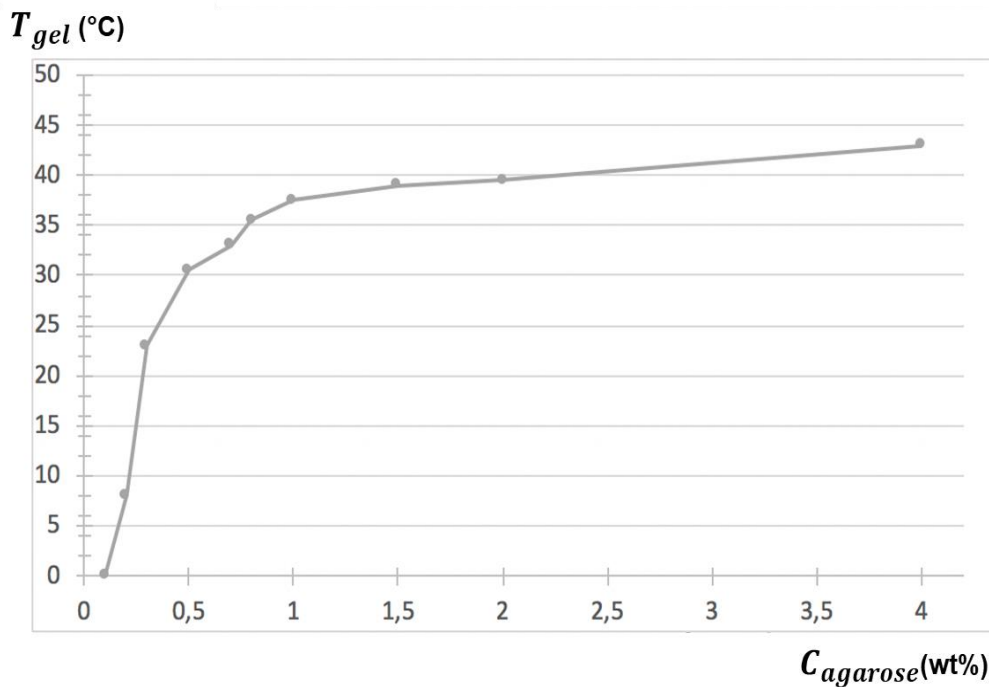


Figure 116. Point de gélification ( $T_{gel}$ ) de l'agarose en fonction de sa concentration ( $C_{agarose}$ )

### V.2.2. Préparation des microparticules d'agarose

Le montage (Figure 117) est similaire à celui utilisé pour le Na-alginate, avec le DMC comme phase continue et des capillaires de 150 $\mu$ m (diamètre interne). Le contrôle de la température concerne 3 zones : 1) la zone 1 de génération des gouttes dans un four où la température est supérieure à  $T_{gel}$  pour que la solution d'agarose (phase dispersée) soit liquide ; 2) la zone 2 de refroidissement dans une boîte thermostatée à une température inférieure à  $T_{gel}$ , transformant les gouttes d'agarose en gel ; 3) la zone 3 de collection des microparticules à température ambiante. L'observation au microscope optique se fait aux points B et C car il est difficile d'observer en A dans l'enceinte du four.

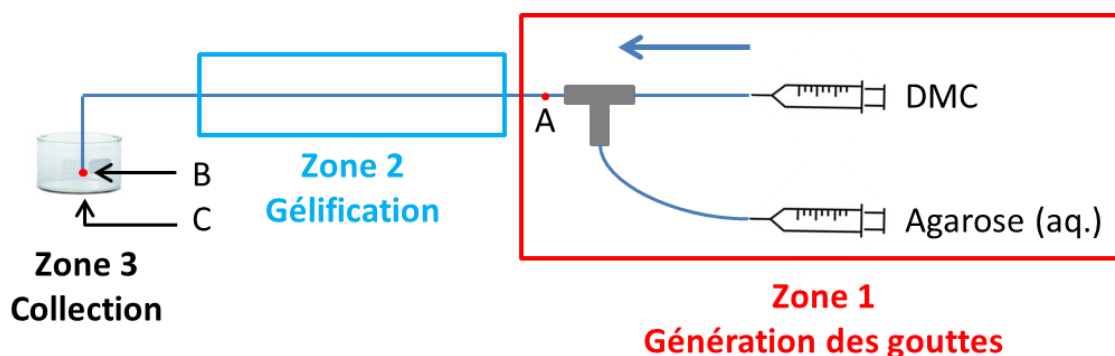


Figure 117. Schéma du montage de préparation des microparticules d'agarose.

### V.2.2.1. Gélification de l'agarose dans le capillaire

Afin de disposer de la plus grande gamme de température de gélification, nous choisissons  $C_{\text{agarose}}=1\text{wt}\%$ , pour laquelle  $T_{\text{gel}}\approx 38^\circ\text{C}$ . Ainsi, la génération des gouttes dans le DMC (zone 1 de la Figure 117) est réalisée à  $60^\circ\text{C}$ , ce qui permet d'être assez loin du point d'ébullition du DMC ( $90^\circ\text{C}$ ). Dans la zone 2 (Figure 117), le capillaire est refroidi à différentes températures à l'aide d'un bain thermostaté : 1)  $2-4^\circ\text{C}$  ; 2)  $25^\circ\text{C}$  et 3)  $38^\circ\text{C}$ . Lors du refroidissement de  $60^\circ\text{C}$  à  $2-4^\circ\text{C}$  ou  $25^\circ\text{C}$ , on observe que l'écoulement des gouttes devient difficile. Les gouttes d'agarose sont donc rapidement transformées en gel, ce qui augmente la viscosité de la phase dispersée. Le refroidissement à  $38^\circ\text{C}$  permet une gélification lente ce qui augmente peu la viscosité et permet d'éviter le colmatage du capillaire.

### V.2.2.2. Collecte et observation des microparticules d'agarose

La collecte est effectuée à température ambiante ( $25^\circ\text{C}$ ) dans du DMC. L'observation en C au microscope optique des microparticules d'agarose collectées (Figure 118 (a)) montre qu'elles se sont contractées entre les points B et C. De plus, elles semblent toutes homogènes avec un diamètre de  $80\mu\text{m}$  environ. Par ailleurs, après le séchage à l'air, l'observation au MEB des microparticules montre une forme hémisphérique avec un creux (Figure 118 (b)).

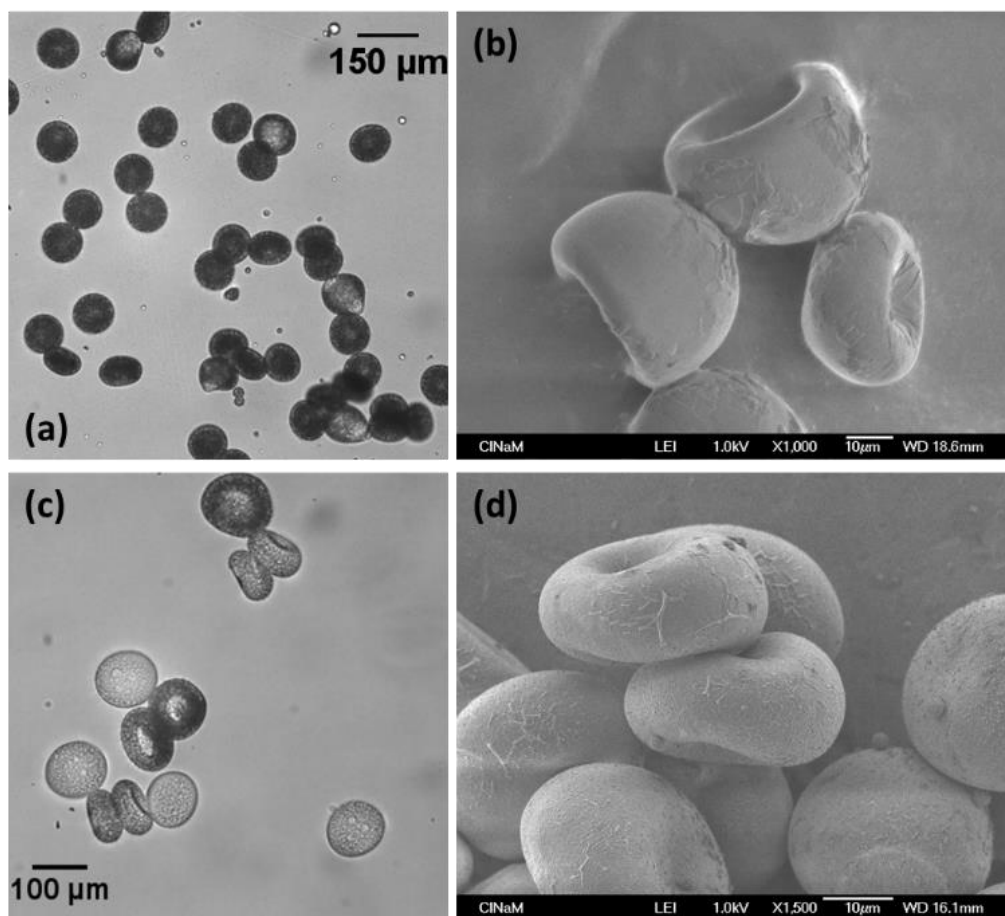


Figure 118. Microparticules d'agarose préparées par collection dans (a-b) DMC et (c-d) DMC-éthanol ( $C_{\text{éthanol}}=20\text{wt}\%$ ). Conditions de la préparation :  $C_{\text{agarose}}=1\text{wt}\%$ ,  $Q_{\text{DMC}}=0,5\mu\text{L/s}$ ,  $Q_{\text{agarose}}=0,025\mu\text{L/s}$  et gélification à  $38^\circ\text{C}$  dans un capillaire de longueur 53cm.

La réduction de la taille observée au MEB par rapport à celle au microscope optique est due à la perte d'eau pendant le séchage à l'air et sous vide dans la chambre du MEB. Cela a déjà été observé précédemment pour les microparticules de Na-alginate et celles de Ca-alginate (Tableau 8, C.III.1.). Cependant, comme l'eau diffuse considérablement dans le DMC, la contraction des microparticules d'agarose est importante, et ces dernières deviennent très dures lorsqu'on essaie de les écraser avec une aiguille. En rajoutant de l'eau froide, pour éviter de dissoudre l'agarose, nous remarquons un gonflement des microparticules comme dans le cas du Na-alginate avec la solution aqueuse de  $\text{CaCl}_2$ . D'ailleurs, elles deviennent plus molles dans l'eau selon l'essai avec une aiguille.

Une autre méthode pour réduire la dureté des microparticules d'agarose consiste à collecter dans un mélange de DMC/éthanol, car nous avons vu précédemment pour l'alginate que cela permettait de réduire la diffusion de l'eau et donc la contraction. Par conséquent, nous avons collecté les microparticules d'agarose dans un mélange DMC/éthanol (80/20 en masse) et l'observation au microscope optique et au MEB sont présentées respectivement dans les Figure 118 (c) et (d). Les microparticules d'agarose présentent une forme biconcave (façon donuts) avec une taille plus élevée que dans du DMC pur. De plus, on réussit à les écraser avec une aiguille, ce qui montre bien qu'elles sont plus molles.

D'après cette étude, l'agarose présente l'avantage de donner des microparticules après gélification, directement dans le capillaire (*in situ*). Cependant, la gélification *in situ* augmente la viscosité de la phase dispersée, ce qui pose parfois un problème de l'écoulement, dû au colmatage du capillaire. Pour éviter cela, la température doit être fixée de façon précise tout au long de la préparation. Par ailleurs, cette méthode permet de produire des microparticules d'agarose avec une forme proche de celle de GRs. Comme nous l'avons vu précédemment (C.IV.) pour les mesures acoustiques, nous sommes plus intéressés pour l'instant par la forme sphérique qui est plus facile à modéliser. Cependant, lorsque la forme des microparticules deviendra une caractéristique importante pour le développement de la méthode ultrasonore, la préparation de microparticules à partir d'agarose pourra être améliorée.



## **D. Conclusion générale et Perspectives**

Inscrite dans un projet ANR **CUMBA**, ma thèse a pour objectif de préparer des microparticules monodisperses qui permettront de calibrer un outil ultrasonore pour la mesure de l'agrégation des globules rouges (GRs). Les microparticules doivent alors présenter une taille et des propriétés mécaniques proches des GRs. Pour cela, j'ai développé une méthode microfluidique à base de gouttes de solution aqueuse d'alginate de sodium (Na-alginate) qui forment des microparticules de Ca-alginate par gélification ionique avec du  $\text{CaCl}_2$  sans utiliser de tensioactif.

La première étape de la méthode consiste à générer dans un capillaire des gouttes de Na-alginate, dans un flux de carbonate de diméthyle (DMC) dans lequel l'eau est partiellement miscible. La taille initiale des gouttes est contrôlée par les débits de la phase continue de DMC et de la phase dispersée de Na-alginate. Ensuite, les gouttes de Na-alginate subissent une contraction *in situ* tout le long du capillaire dû au DMC. Ainsi cette contraction augmente avec le volume de DMC qui sépare les gouttes dans le capillaire.

En collectant les gouttes dans le DMC, la contraction se poursuit *ex situ*, produisant des microparticules de Na-alginate qui deviennent très concentrées et dont on contrôle la taille finale qui peut atteindre celle des GRs. Cette taille finale est liée à la concentration initiale en Na-alginate qui crée une structure interne poreuse et une coque, comme observées au MEB, ce qui peut gêner la diffusion de l'eau vers l'extérieur. De plus, les mesures de force réalisées par AFM conduisent à un module de Young de l'ordre du MPa, qui est très supérieur aux 26kPa correspondant aux GRs. Ainsi la dureté des microparticules de Na-alginate les rend peu adaptées pour mimer des GRs, en termes des propriétés mécaniques. Par ailleurs, même si les microparticules de Na-alginate sont sous forme solide, elles se dissolvent dans l'eau, ce qui rend impossible leur utilisation pour les mesures optiques (à l'IRPHE) et ultrasonores (au LMA), qui se font en suspension dans de l'eau, dans le cadre du projet ANR **CUMBA**.

Afin de rendre insolubles les microparticules, une méthode de gélification par  $\text{CaCl}_2$  est développée, dans la seconde étape de la méthode, pour transformer les microparticules de Na-alginate en Ca-alginate. Les méthodes de gélification *in situ*, avec une contraction *in situ* et une gélification simultanées dans le capillaire, sont peu adaptées pour la génération des gouttes à cause de l'augmentation de la viscosité de la phase dispersée. Parmi les méthodes de gélification *ex situ* testées au cours de cette thèse, la première en collectant dans une solution aqueuse de  $\text{CaCl}_2$ , conduit à une interface à la sortie du capillaire, due à l'immiscibilité entre le DMC et la solution de  $\text{CaCl}_2$ , qui déforme les microparticules. La seconde méthode, en utilisant un mélange DMC/ $\text{CaCl}_2$  comme phase de collecte, donne une gélification limitée due à la faible concentration en  $\text{CaCl}_2$  dans le DMC, et produit donc des microparticules solubles dans l'eau.

La troisième méthode testée consiste en une gélification *ex situ* dans une solution de  $\text{CaCl}_2$  après collecte dans du DMC et séchage des microparticules de Na-alginate. Cette méthode donne des microparticules de Ca-alginate, qui ont gonflé tout en gardant une forme sphérique (adaptées aux mesures ultrasonores) et qui sont insolubles dans l'eau. Ce gonflement les rend transparentes, ce qui est essentiel pour les mesures optiques en

écoulement sur les agrégats de microparticules de Ca-alginate (à l'IRPHE). D'autre part, les microparticules de Ca-alginate ont un module de Young proche de celui des GRs, ce qui est primordial pour les mesures ultrasonores (au LMA). Enfin, j'ai montré la faisabilité des mesures ultrasonores, réalisées au LMA, sur ces microparticules. Un comportement acoustique proche de celui des GRs a été observé. Par conséquent, grâce à ces travaux, nous disposons actuellement de microparticules de Ca-alginate dont la taille et les propriétés optiques et mécaniques permettent de les utiliser comme mimes de GRs.

Enfin, j'ai proposé un mécanisme simple inspiré de la littérature pour expliquer la structure interne poreuse des microparticules de Na-alginate et de Ca-alginate. La formation des pores est due à la diffusion de l'eau de la microparticule vers la phase continue entraînant l'alginate, celui-ci s'arrêtant à l'interface entre la microparticule et la phase continue formant ainsi une coque. Dû à la viscosité assez importante, certaines molécules ne peuvent pas migrer jusqu'à l'interface pour former la coque mais elles ne précipitent pas non plus à l'intérieur de la microparticule. Par conséquent, des pores se trouvent partout à l'intérieur de la microparticule.

Au cours de cette thèse, des méthodes alternatives en utilisant d'autres phases continues pour la génération et/ou la collecte des microparticules et un autre hydrogel, l'agarose, ont été testées. J'ai montré que les solvants organiques partiellement miscibles avec l'eau, comme l'octan-1-ol et le carbonate de diéthyle, sont également adaptés en tant que phase continue. De plus, dans les mêmes conditions de génération des gouttes, ces solvants permettent d'obtenir des microparticules sphériques plus petites que dans le cas du DMC. Cela me permet de déduire que la contraction est influencée non seulement par la solubilité de l'eau mais aussi par la cinétique de la diffusion. Par ailleurs, l'ajout d'un solvant totalement miscible avec l'eau comme l'éthanol, dans la phase de collecte, rend les microparticules plus transparentes mais les déforme. Cela peut être évité en augmentant la viscosité et donc la concentration en Na-alginate des gouttes à la fin de la contraction *in situ* dans le capillaire.

Enfin, j'ai remplacé le Na-alginate par l'agarose et j'ai préparé des microparticules par gélification thermique. Cette méthode permet de produire des microparticules qui ont une forme biconcave en donuts, proche de celles des GRs. Ceci peut être intéressant pour les mesures ultrasonores lorsque le LMA aura modifié son modèle pour passer d'une forme sphérique à une forme biconcave. Cependant, cette méthode demande un contrôle précis de la température pour éviter les risques de colmatage qui empêche complètement la génération des microparticules.

En termes de perspectives sur le système alginate/DMC, la compréhension du mécanisme de formation des microparticules demande des études supplémentaires, notamment sur la formation des pores à l'intérieur des microparticules de Na-alginate et de Ca-alginate. Le rôle du diamètre initial de la goutte sur la concentration finale en alginate (Figure 69) demeure inexplicé à ce jour et mériterait des investigations supplémentaires. De plus, l'effet de la concentration en  $\text{CaCl}_2$  sur le gonflement des microparticules de Ca-alginate doit être explorée en vue de l'utiliser pour contrôler leur taille et leurs propriétés mécaniques.

Par ailleurs, les méthodes alternatives explorées pour la phase continue et/ou de collecte et le matériau des microparticules, peuvent être affinées et complétées par des caractérisations (de la forme par MEB, des mesures du module de Young par AFM) et des mesures ultrasonores. Enfin, lorsque le modèle acoustique proposé par le LMA sera adapté à la forme biconcave des GRs, on pourra envisager d'utiliser l'agarose après des études complémentaires pour s'affranchir du colmatage du capillaire. Enfin, il faudra aborder l'extrapolation de la méthode pour passer à la production de grammes de ces microparticules aux propriétés contrôlées.

## Références

- Acarturk, S. Takka, F. 1999. "Calcium Alginate Microparticles for Oral Administration: I: Effect of Sodium Alginate Type on Drug Release and Drug Entrapment Efficiency." *Journal of Microencapsulation* 16(3):275–90.
- Agüero, Lissette, Dionisio Zaldivar-Silva, Luis Peña, and Marcos L. Dias. 2017. "Alginate Microparticles as Oral Colon Drug Delivery Device: A Review." *Carbohydrate Polymers* 168:32–43.
- Ahmed, Enas M. 2015. "Hydrogel: Preparation, Characterization, and Applications: A Review." *Journal of Advanced Research* 6(2):105–21.
- Akbari, Samin and Tohid Pirbodaghi. 2014. "Microfluidic Encapsulation of Cells in Alginate Particles via an Improved Internal Gelation Approach." *Microfluidics and Nanofluidics* 16(4):773–77.
- Ami, R. Ben, G. Barshtein, D. Zeltser, Y. Goldberg, I. Shapira, A. Roth, G. Keren, H. Miller, V. Prochorov, A. Eldor, S. Berliner, and S. Yedgar. 2001. "Parameters of Red Blood Cell Aggregation as Correlates of the Inflammatory State." *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 280(5):H1982–88.
- Anderson, Victor C. 1950. "Sound Scattering from a Fluid Sphere." *The Journal of the Acoustical Society of America* 22(4):426–31.
- Armisen, Rafael, and Fernando Galatas. "Production, properties and uses of agar." Production and utilization of products from commercial seaweeds. FAO Fish. Tech. Pap 288 (1987): 1-57.
- Arnott, Struther, A. Fulmer, and W. E. Scott. 1974. "The Agarose Double Helix and Its Function in Agarose Gel Structure." 17.
- Barklin, A., A. Larsson, C. Vestergaard, J. Koefoed-Nielsen, A. Bach, R. Nyboe, L. Wogensen, and E. Tønnesen. 2008. "Does Brain Death Induce a Pro-Inflammatory Response at the Organ Level in a Porcine Model?: Brain Death and Cytokines in Organs." *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* 52(5):621–27.
- Baroud, Charles N., Francois Gallaire, and Rémi Dangla. 2010. "Dynamics of Microfluidic Droplets." *Lab on a Chip* 10(16):2032.
- Barton, Allan F. M. and M. C. Haulait-Pirson, eds. 1984. *Alcohols with Water*. 1st ed. Oxford ; New York: Pergamon.
- Bilodeau, G. G. (1992). Regular pyramid punch problem. *J. Appl. Mech*, 59(3), 519-523.
- Braschler, Thomas, Songmei Wu, and Fabien Wildhaber. 2015. "Soft Nanofluidics Governing Minority Ion Exclusion in Charged Hydrogels." *Soft Matter* 13.
- Buckley, Conor T., Stephen D. Thorpe, Fergal J. O'Brien, Anthony J. Robinson, and Daniel J. Kelly. 2009. "The Effect of Concentration, Thermal History and Cell Seeding Density on the Initial Mechanical Properties of Agarose Hydrogels." *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 2(5):512–21.

- Caccavo, D., S. Cascone, G. Lamberti, and A. A. Barba. 2018. "Hydrogels: Experimental Characterization and Mathematical Modelling of Their Mechanical and Diffusive Behaviour." *Chemical Society Reviews* 47(7):2357–73.
- Casadevall i Solvas, Xavier and Andrew deMello. 2011. "Droplet Microfluidics: Recent Developments and Future Applications." *Chem. Commun.* 47(7):1936–42.
- Christopher, G. F. and S. L. Anna. 2007. "Microfluidic Methods for Generating Continuous Droplet Streams." 19.
- Clark, Allan H. and Simon B. Ross-Murphy. 1987. "Structural and Mechanical Properties of Biopolymer Gels." 136.
- De Menech, M., P. Garstecki, F. Jousse, and H. A. Stone. 2008. "Transition from Squeezing to Dripping in a Microfluidic T-Shaped Junction." *Journal of Fluid Mechanics* 595:141–61.
- Dendukuri, Dhananjay, Shelley S. Gu, Daniel C. Pregibon, T. Alan Hatton, and Patrick S. Doyle. 2007. "Stop-Flow Lithography in a Microfluidic Device." *Lab on a Chip* 7(7):818.
- Doshi, N., A. S. Zahr, S. Bhaskar, J. Lahann, and S. Mitragotri. 2009. "Red Blood Cell-Mimicking Synthetic Biomaterial Particles." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(51):21495–99.
- Draget, K. I. 2009. "Alginates." Pp. 807–28 in *Handbook of Hydrocolloids*. Elsevier.
- Dulińska, Ida, Marta Targosz, Wojciech Strojny, Małgorzata Lekka, Paweł Czuba, Walentyna Balwierz, and Marek Szymoński. 2006. "Stiffness of Normal and Pathological Erythrocytes Studied by Means of Atomic Force Microscopy." *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 66(1–3):1–11.
- Falou, Omar and Min Rui. 2010. "The Measurement of Ultrasound Scattering from Individual Micron-Sized Objects and Its Application in Single Cell Scattering." *J. Acoust. Soc. Am.* 128(2):9.
- Faran, James J. 1951. "Sound Scattering by Solid Cylinders and Spheres." *The Journal of the Acoustical Society of America* 23(4):405–18.
- Fonteno, W. C. and T. E. Bilderback. 1993. "Impact of Hydrogel on Physical Properties of Coarse-Structured Horticultural Substrates." *Journal of the American Society for Horticultural Science* 118(2):217–22.
- Gacesa, Peter. 1988. "Alginates."
- Gassin, Pierre-Marie. "Mesure de la tension superficielle par la technique de la goutte pendante." *Bull. Union Phys* 963 (2014): 567-574.
- Girasole, Marco, Simone Dinarelli, and Giovanna Boumis. 2012. "Structure and Function in Native and Pathological Erythrocytes: A Quantitative View from the Nanoscale." *Micron* 43(12):1273–86.

- Grant, Gregor T., Edwin R. Morris, David A. Rees, Peter J. C. Smith, and David Thom. 1973. "Biological Interactions between Polysaccharides and Divalent Cations: The Egg-Box Model." *FEBS Letters* 32(1):195–98.
- Haghgooeie, Ramin, Mehmet Toner, and Patrick S. Doyle. 2009. "Squishy Non-Spherical Hydrogel Microparticles." *Macromolecular Rapid Communications* NA-NA.
- Hoffman, Allan S. 2012. "Hydrogels for Biomedical Applications." *Advanced Drug Delivery Reviews* 64:18–23.
- Hu, Yuandu, Qin Wang, Jianying Wang, Jintao Zhu, Hong Wang, and Yajiang Yang. 2012. "Shape Controllable Microgel Particles Prepared by Microfluidic Combining External Ionic Crosslinking." *Biomicrofluidics* 6(2):026502.
- Iwata, Kazuyuki, Kazuhiro Watanabe, Yoshiyuki Kimura, and Hiromichi Okuda. 1994. "Algin-Containing Food and Beverage."
- Kato, Atsushi, Masayuki Arakawa, and Tamotsu Kondo. 1984. "Preparation and Stability of Liposome-Type Artificial Red Blood Cells Stabilized with Carboxymethylchitin." *Journal of Microencapsulation* 1(2):105–12.
- Kumacheva, Eugenia and Piotr Garstecki. 2011. *Microfluidic Reactors for Polymer Particles*. John Wiley & Sons.
- Lee, Kuen Yong and David J. Mooney. 2012. "Alginate: Properties and Biomedical Applications." *Progress in Polymer Science* 37(1):106–26.
- Lee, Kuen Yong, Jon A. Rowley, Petra Eiselt, Erick M. Moy, Kamal H. Bouhadir, and David J. Mooney. 2000. "Controlling Mechanical and Swelling Properties of Alginate Hydrogels Independently by Cross-Linker Type and Cross-Linking Density." *Macromolecules* 33(11):4291–94.
- Liu, Kan, Hui-Jiang Ding, Jing Liu, Yong Chen, and Xing-Zhong Zhao. 2006. "Shape-Controlled Production of Biodegradable Calcium Alginate Gel Microparticles Using a Novel Microfluidic Device."
- Maitra, Jaya and Vivek Kumar Shukla. 2014. "Cross-Linking in Hydrogels - a Review." *American Journal of Polymer Science* 7.
- Marquis, Mélanie, Joelle Davy, Aiping Fang, and Denis Renard. 2014. "Microfluidics-Assisted Diffusion Self-Assembly: Toward the Control of the Shape and Size of Pectin Hydrogel Microparticles." *Biomacromolecules* 15(5):1568–78.
- Mathur, Arvind M., Shailender K. Moorjani, and Alec B. Scranton. 1996. "Methods for Synthesis of Hydrogel Networks: A Review." *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews* 36(2):405–30.
- McHugh, Dennis J. "Production, properties and uses of alginates." *Production and Utilization of Products from Commercial Seaweeds*. FAO. Fish. Tech. Pap 288 (1987): 58-115.



- Merkel, T. J., S. W. Jones, K. P. Herlihy, F. R. Kersey, A. R. Shields, M. Napier, J. C. Luft, H. Wu, W. C. Zamboni, A. Z. Wang, J. E. Bear, and J. M. DeSimone. 2011. "Using Mechanobiological Mimicry of Red Blood Cells to Extend Circulation Times of Hydrogel Microparticles." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(2):586–91.
- Mokken, Fleur C., C. Pieter Henny, Mohan Kedaria, and Adrian W. Gelb. 1995. "Hemorheological Changes Associated with Brain Death and Their Implications for Potential Organ Donors." *Transplant International* 8(2):147–51.
- Mørch, Ýrr A., Ivan Donati, and Berit L. Strand. 2006. "Effect of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ , and  $\text{Sr}^{2+}$  on Alginate Microbeads." *Biomacromolecules* 7(5):1471–80.
- Mukhopadhyay, Rajendrani. 2007. "When PDMS Isn't the Best." *Analytical Chemistry* 79(9):3248–53.
- Muramatsu, Nabuhiro and Tamotsu Kondo. 1980. "Platelet Adhesion onto Artificial Red Blood Cells." *Journal of Biomedical Materials Research* 14(3):211–24.
- Nge, Pamela N., Chad I. Rogers, and Adam T. Woolley. 2013. "Advances in Microfluidic Materials, Functions, Integration, and Applications." *Chemical Reviews* 113(4):2550–83.
- Pittermannová, A., Z. Ruberová, A. Zdražil, N. Bremond, J. Bibette, and F. Štěpánek. 2016. "Microfluidic Fabrication of Composite Hydrogel Microparticles in the Size Range of Blood Cells." *RSC Advances* 6(105):103532–40.
- Reddy, Narendra, Roopa Reddy, and Qiuran Jiang. 2015. "Crosslinking Biopolymers for Biomedical Applications." *Trends in Biotechnology* 33(6):362–69.
- Ren, Kangning, Jianhua Zhou, and Hongkai Wu. 2013. "Materials for Microfluidic Chip Fabrication." *Accounts of Chemical Research* 46(11):2396–2406.
- Roduit, Charles. 2008. "Membrane Elastic Heterogeneity Studied at Nanometrical Scale on Living Cells." 239.
- Rondeau, Elisabeth and Justin J. Cooper-White. 2008. "Biopolymer Microparticle and Nanoparticle Formation within a Microfluidic Device." *Langmuir* 24(13):6937–45.
- Rosiak, Janusz M. and Fumio Yoshii. 1999. "Hydrogels and Their Medical Applications." *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 151(1–4):56–64.
- Satarkar, Nitin S. and J. Zach Hilt. 2007. "Hydrogel Nanocomposites as Remote-Controlled Biomaterials." *Acta Biomaterialia* 4(1):11–16.
- Seemann, Ralf, Martin Brinkmann, Thomas Pfohl, and Stephan Herminghaus. 2012. "Droplet Based Microfluidics." *Reports on Progress in Physics* 75(1):016601.

- She, Shupeng, Qinqin Li, Bowen Shan, Weijun Tong, and Changyou Gao. 2013. "Fabrication of Red-Blood-Cell-Like Polyelectrolyte Microcapsules and Their Deformation and Recovery Behavior Through a Microcapillary." *Advanced Materials* 25(40):5814–18.
- Stephenson, Richard and James Stuart. 1986. "Mutual Binary Solubilities: Water-Alcohols and Water-Esters." *Journal of Chemical & Engineering Data* 31(1):56–70.
- Sugaya, S., M. Yamada, and M. Seki. 2011. "PRODUCTION OF EXTREMELY-SMALL HYDROGEL MICROSPHERES BY UTILIZING WATER- DROPLET DISSOLUTION IN A POLAR SOLVENT." 3.
- Suzuki, T., A. Osumi, and H. Minami. 2012. "One-Step Synthesis of 'Rattle-like' Polymer Particles via Suspension Polymerization." 5.
- Teh, Shia-Yen, Robert Lin, Lung-Hsin Hung, and Abraham P. Lee. 2008. "Droplet Microfluidics." *Lab on a Chip* 8(2):198.
- Trivedi, Varun, Ankur Doshi, G. K. Kurup, E. Ereifej, P. J. Vandevord, and Amar S. Basu. 2010. "A Modular Approach for the Generation, Storage, Mixing, and Detection of Droplet Libraries for High Throughput Screening." *Lab on a Chip* 10(18):2433.
- Ullah, Faheem, Muhammad Bisryul Hafi Othman, Fatima Javed, Zulkifli Ahmad, and Hazizan Md. Akil. 2015. "Classification, Processing and Application of Hydrogels: A Review." *Materials Science and Engineering: C* 57:414–33.
- Utada, A. S., L. Y. Chu, A. Fernandez-Nieves, D. R. Link, C. Holtze, and D. A. Weitz. 2007. "Dripping, Jetting, Drops, and Wetting: The Magic of Microfluidics." *MRS Bulletin* 32(9):702–8.
- Utech, Stefanie, Radivoje Prodanovic, Angelo S. Mao, Raluca Ostafe, David J. Mooney, and David A. Weitz. 2015. "Microfluidic Generation of Monodisperse, Structurally Homogeneous Alginate Microgels for Cell Encapsulation and 3D Cell Culture." *Advanced Healthcare Materials* 4(11):1628–33.
- Whitesides, George M. 2006. "The Origins and the Future of Microfluidics." *Nature* 442(7101):368–73.
- Wichterle, O. and D. Lim. 1960. "Hydrophilic Gels for Biological Use."
- Wu, Tiantian, Jiaqi Huang, Yangyang Jiang, Yaqin Hu, Xingqian Ye, Donghong Liu, and Jianchu Chen. 2018. "Formation of Hydrogels Based on Chitosan/Alginate for the Delivery of Lysozyme and Their Antibacterial Activity." *Food Chemistry* 240:361–69.
- Xu, J. H., S. W. Li, J. Tan, and G. S. Luo. 2008. "Controllable Preparation of Monodispersed Calcium Alginate Microbeads in a Novel Microfluidic System." *Chemical Engineering & Technology* 31(8):1223–26.
- Yamada, Masumi, Ayaka Hori, Sari Sugaya, Yuya Yajima, Rie Utoh, Masayuki Yamato, and Minoru Seki. n.d. "Cell-Sized Condensed Collagen Microparticles for Preparing Microengineered Composite Spheroids of Primary Hepatocytes." 12.

- Yang, Jianmin, Daisuke Katagiri, Sifeng Mao, Hui Zeng, Hizuru Nakajima, and Katsumi Uchiyama. 2015. "Generation of Controlled Monodisperse Porous Polymer Particles by Dipped Inkjet Injection." *RSC Advances* 5(10):7297–7303.
- Zagnoni, Michele, Jamie Anderson, and Jonathan M. Cooper. 2010. "Hysteresis in Multiphase Microfluidics at a T-Junction." *Langmuir* 26(12):9416–22.
- Zamora-Mora, Vanessa, Diego Velasco, Rebeca Hernández, Carmen Mijangos, and Eugenia Kumacheva. 2014. "Chitosan/Agarose Hydrogels: Cooperative Properties and Microfluidic Preparation." *Carbohydrate Polymers* 111:348–55.
- Zhang, Cheng, Romain Grossier, Leda Lacaria, Felix Rico, Nadine Candoni, and Stéphane Veessler. 2020. "A Microfluidic Method Generating Monodispersed Microparticles with Controllable Sizes and Mechanical Properties." *Chemical Engineering Science* 211:115322.
- Zhang, Hong, Ethan Tumarkin, Raheem Peerani, Zhihong Nie, Ruby May A. Sullan, Gilbert C. Walker, and Eugenia Kumacheva. 2006. "Microfluidic Production of Biopolymer Microcapsules with Controlled Morphology." *Journal of the American Chemical Society* 128(37):12205–10.
- Zhang, Hong, Ethan Tumarkin, Ruby May A. Sullan, Gilbert C. Walker, and Eugenia Kumacheva. 2007. "Exploring Microfluidic Routes to Microgels of Biological Polymers." *Macromolecular Rapid Communications* 28(5):527–38.
- Zhang, Shuheng, Carine Guivier-Curien, Stéphane Veessler, and Nadine Candoni. 2015. "Prediction of Sizes and Frequencies of Nanoliter-Sized Droplets in Cylindrical T-Junction Microfluidics." *Chemical Engineering Science* 138:128–39.
- Zheng, S., R. L. Beissinger, and D. T. Wasan. 1991. "The Stabilization of Hemoglobin Multiple Emulsion for Use as a Red Blood Cell Substitute." *Journal of Colloid and Interface Science* 144(1):72–85.
- Zhu, Pingan and Liqiu Wang. 2017. "Passive and Active Droplet Generation with Microfluidics: A Review." *Lab on a Chip* 17(1):34–75.

# ANNEXES

Annexe 1. Production industrielle de l'alginate

Annexe 2. Matériaux pour la fabrication des dispositifs microfluidiques

Annexe 3. Découpage d'une résine encapsulant des microparticules

Annexe 4. « Hachage » des microparticules avec un rasoir

Annexe 5. Traitement des données AFM pour la mesure du module de Young

Annexe 6. Publication dans « Chemical Engineering Science »

## Annexe 1. Production industrielle de l'alginate

La production d'alginate peut être réalisée par la biosynthèse bactériale ou par l'extraction des algues brunes. L'alginate est le polysaccharide le plus répandu dans les algues brunes, occupant jusqu'à 40% de la matière sèche (Draget 2009). Dans les algues brunes, l'alginate est sous forme de sel avec des cations, majoritairement de calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) mais également de magnésium ( $\text{Mg}^{2+}$ ) et de sodium ( $\text{Na}^+$ ). Malgré le fait que l'alginate synthétisé par des microorganismes ait une structure chimique et des propriétés physiques mieux définies (Lee and Mooney 2012), les alginates commerciaux sont aujourd'hui tous produits par l'extraction des algues brunes. La Figure A montre le processus de la production industrielle de l'alginate. La première étape consiste à transformer les sels insolubles dans l'eau, Ca-alginate et Mg-alginate, en sel soluble de Na-alginate.

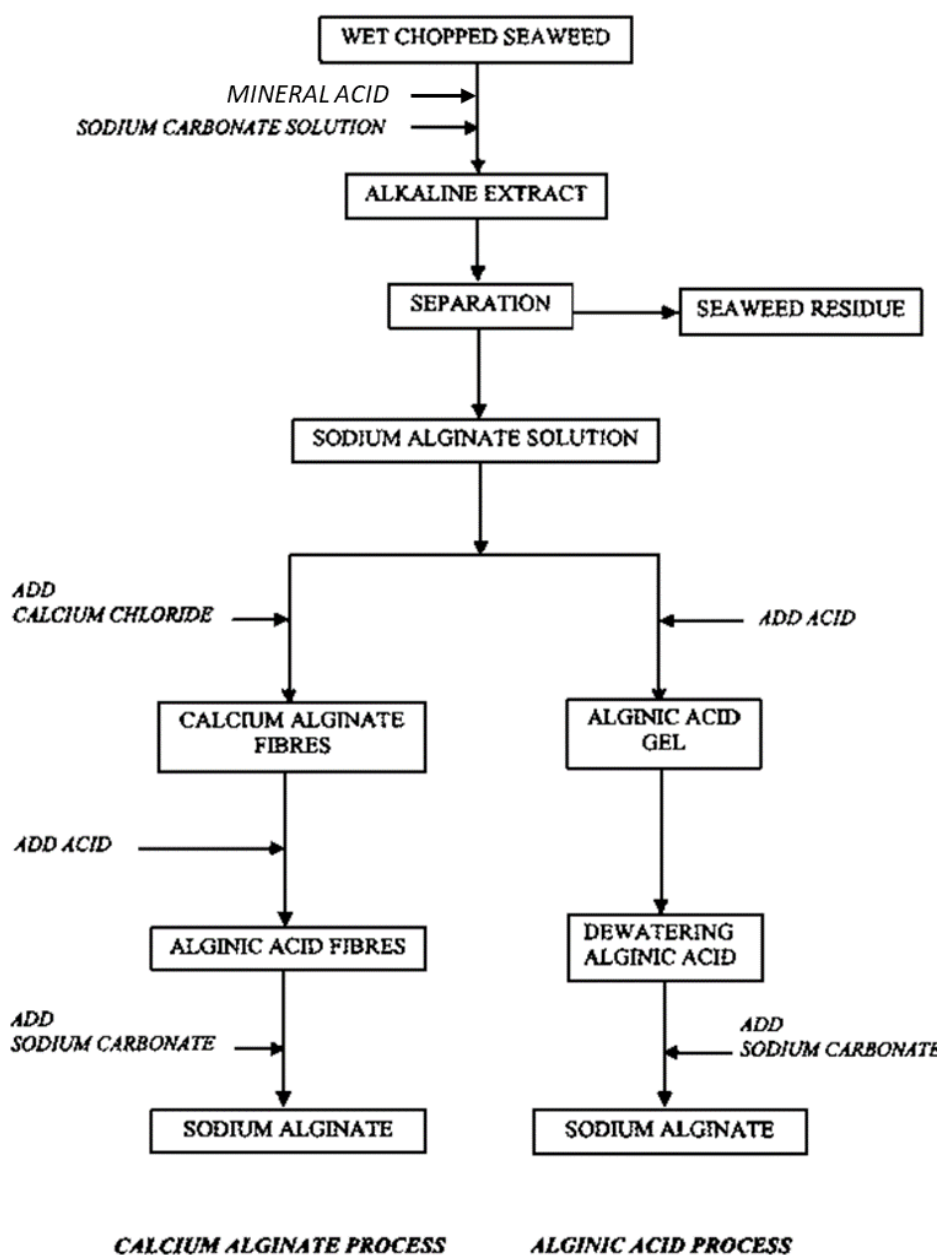


Figure A. Schéma d'extraction de l'alginate des algues brunes (McHugh, 1987)

En pratique, les algues récoltées sont d'abord hachées pour que les réactions suivantes soient plus rapides et efficaces. Les réactions consistent en un traitement avec un acide, HCl ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, puis l'ajout d'une solution de carbonate de sodium (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Ces deux réactions permettent l'échange d'ions suivant les équations réactionnelles (a) et (b), dans lesquelles l'alginate (Alg) est considéré comme un anion monovalent.



Ensuite, le Na-alginate est dissous et séparé de résidus. La solution de Na-alginate obtenue contient une grande quantité d'eau. L'évaporation directe de cette eau n'étant pas énergétiquement économique. Deux procédés sont proposés pour précipiter le Na-alginate, soit en Ca-alginate, soit en acide alginique (McHugh 1987).

### **1.1. Précipitation en alginate de calcium**

Le chlorure de calcium (CaCl<sub>2</sub>) est ajouté à la solution de Na-alginate, transformant Na-alginate en Ca-alginate, qui se présente sous forme de fibres faciles à séparer de la solution. Puis, l'acide HCl ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> est ajouté aux fibres pour transformer Ca-alginate en acide alginique, qui est toujours sous forme de fibre. Après compression de ces fibres, de l'acide alginique déshydraté est obtenu. Il est ensuite mélangé avec Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (solide), donnant du Na-alginate qui devient une pâte. Finalement, la pâte est séchée et broyée pour obtenir les poudres de Na-alginate avec une bonne taille de particule (≈250µm).

### **1.2. Précipitation en acide alginique**

L'acide HCl ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> est ajouté directement dans la solution de Na-alginate pour la transformer en acide alginique qui précipite sous la forme d'un gel. Ce gel est ensuite séparé et déshydraté. Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> est ensuite ajouté pour transformer l'acide alginique en Na-alginate, suivi par des étapes de séchage et de broyage.

L'extraction de l'alginate est simple d'un point de vue des réactions chimiques entrant en jeu dans le procédé. La difficulté est liée aux manipulations de filtration et de centrifugation qui doivent être réalisées avec une solution plus ou moins visqueuse. La comparaison des deux procédés montre que même si la précipitation de l'acide d'alginate contient une étape de moins, elle est plus difficile à réaliser et elle conduit à plus de perte de matière. Pour cette raison, le procédé qui utilise la voie précipitation d'alginate de calcium est le plus utilisé.

## Annexe 2. Matériaux pour la fabrication des dispositifs microfluidiques

Le tableau de tous matériaux utilisés pour la fabrication des dispositifs microfluidiques provient des travaux de Nge et al. (Nge et al. 2013).

Material	Optical Clarity	UV Transparency	EOF ( $\times 10^{-4} \text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	Separation	Surface Chemistry	Surface Charge
Glass	Good	>280 nm	3 (pH 7.0)	Yes	Silanol	Negative
			$4.21 \pm 0.18$ (pH 9.2)			
Silicon	Opaque	None	NR	NR	Silicon/Silanol	Requires oxidation
LTCC	Opaque	None	$3.00 \pm 0.05$ (pH 7.0)	Yes	Aluminum oxide	Negative
Ormocer	Moderate	>300 nm	$3.3 \pm 0.3$ (pH 10.0, lithography)	Yes	NR	Negative
			$5.3 \pm 0.1$ (pH 10.0, UV-embossed)			
PDMS (native)	Good	>220 nm	$2.5 \pm 0.5$ (pH 6.0)	Yes	Silanol	Negative
			$4.9 \pm 0.9$ (pH 9.0)			
PDMS (oxidized)	Good	>220 nm	$8.2$ (pH 9.0)	Yes	Silanol	Negative
			$2.2$ (10 mM SDS)			
TPE	Moderate	>400 nm	$\sim 2.5$ (pH 6.0)	Yes	Polyester	Requires oxidation
			$\sim 1.7$ (pH 7.0)			
			$\sim 0.6$ (pH 9.0)			
			$\sim 0.6$ (pH 9.0)			
			$\sim 1.4$ (pH 10.0)			
			$\sim 0.10$ (pH 6–10, PEG-grafted)			
$\sim 2.6$ (oxidized)						

Material	Optical Clarity	UV Transparency	EOF ( $\times 10^{-4} \text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	Separation	Surface Chemistry	Surface Charge
PFPE	Moderate	>350 nm	NR	No	Fluorocarbon	NR
PS	Good	>300 nm	1.54 $\pm$ 0.03 (pH 9.2)	Yes	Phenyl	Requires oxidation
PC	Good	>360 nm	2.22 $\pm$ 0.09 (pH 9.2)	Yes	Phenyl/Carbonate	Requires oxidation
PMMA	Good	>340 nm	2.07 $\pm$ 0.07 (pH 9.2)	Yes	Acrylate	Negative
PEGDA	Good	>300 nm	NR	Yes	Acrylate/PEG	Negative
PEGDA/PMMA	Good	>300 nm	0.63 $\pm$ 0.02 (pH 8.7)	Yes	Acrylate/PEG	Negative
PDMS-co-PEO (5%)	Moderate	>440 nm	2.5 $\pm$ 0.7 (pH 6.0) 5.7 $\pm$ 0.8 (pH 9.0)	Yes	Silanol/PEO	Negative
PDMS-co-PEO (10%)	Moderate	>440 nm	1.2 $\pm$ 0.3 (pH 6.0) 2.5 $\pm$ 0.3 (pH 9.0)	Yes	Silanol/PEO	Negative
FEP/PFA	Moderate	NR	NR	No	Fluorocarbon	NR Requires oxidation
COC	Good	>360 nm	3.08 $\pm$ 0.28 (TBE buffer)	Yes	Cyclic olefin	oxidation
Thiol-ene	Moderate	NR	NR	No	Thiol/Allyl	NR
PU (Castor Oil)	Moderate	NR	2.6 (pH 7.0)	Yes	Carbamate/Ricinoleic acid	Negative
PU (Tecothane TT-1095A)	Moderate	>300 nm	2.47 (pH 7.0)	Yes	Carbamate/Phenyl	Negative
Zein	Moderate	NR	NR	No	Zein	NR
SU-8	Moderate	>360 nm	NR	Yes	Epoxy/Phenyl	Negative
Paper	Opaque	None	NR	NR	Cellulose	NR

EOF: électro-osmose; NR: non reporté; LTCC: céramiques co-chauffé à basse température; PDMS: polydiméthylsiloxane; TPE: polyester thermodurci; PFPE: polyfluoropolyméthyle; PS: polystyrène; polycarbonate; PMMA: polyméthacrylate de méthyle; PEGDA: polyéthylène glycol diacrylate; PEO: poly(éthylène oxide); FEP: propylène éthylène fluoré; PFA: perfluoroalkoxy; COC: copolymère oléfinique cyclique; PU: polyuréthane.



## Annexe 3. Découpage d'une résine encapsulant des microparticules

### 3.1. Encapsulation des microparticules dans la résine

La résine époxy se présente sous la forme bi-composante, 2,2-[[1-méthyléthylidène) bis(4,1-phénylèneoxyméthylène)]bisoxirane (composant A) et 1,4-Bis(2,3-époxypropoxy) butane (composant B) (Araldite 2020, *Huntsman*). Elle est transparente et souvent utilisée pour le collage du verre. Pour la préparation, j'ai suivi la notice qui indique de déposer dans un moule en polypropylène (Figure B), 40 gouttes du composant A et 16 gouttes du composant B avec une pipette en plastique. Puis je les ai mélangés avec un bâtonnet en bois, et laissés à l'air pendant 2 jours pour que la résine se durcisse. Ensuite les microparticules en suspension dans le DMC pour celles de Na-alginate, ou dans l'eau pour celles de Ca-alginate sont prélevées et déposées sur la résine. Après le séchage des microparticules, de la résine préparée avec le même processus est déposée sur les microparticules. Ainsi, les microparticules sont encapsulées dans la résine.



Figure B. Moule contenant la résine transparente

### 3.2. Découpe de la résine avec une scie à fil

La résine est ensuite sortie du moule et collée sur une plaque métallique à l'aide de cire d'abeille fondue. Après refroidissement de la cire, l'ensemble est monté sur une plateforme de découpe avec une scie à fil (Figure C (a)) (*ESCIL*). Le moteur permet au rouleau à fil de tourner dans deux sens de rotation alternativement. Par conséquent, la résine est découpée par le fil qui est d'un diamètre de 200 $\mu$ m avec des grains de diamant de 40 $\mu$ m (Figure C (c)). Le processus est répété pour obtenir plusieurs tranches. Comme la résine est préparée en deux étapes, on voit une ligne séparant les deux parties de résine sur la tranche (Figure C (b)). Les microparticules coupées doivent alors se trouver autour de cette ligne. Pour cela, on observe les tranches au microscope optique grâce à leur transparence et on marque

les endroits d'intérêt (cercles dans la Figure C (b)), et puis perce un trou à côté qui facilitera l'observation au MEB. En effet, on s'appuie sur la détection facile d'un relief (le trou) proche de la zone d'intérêt contenant des microparticules.

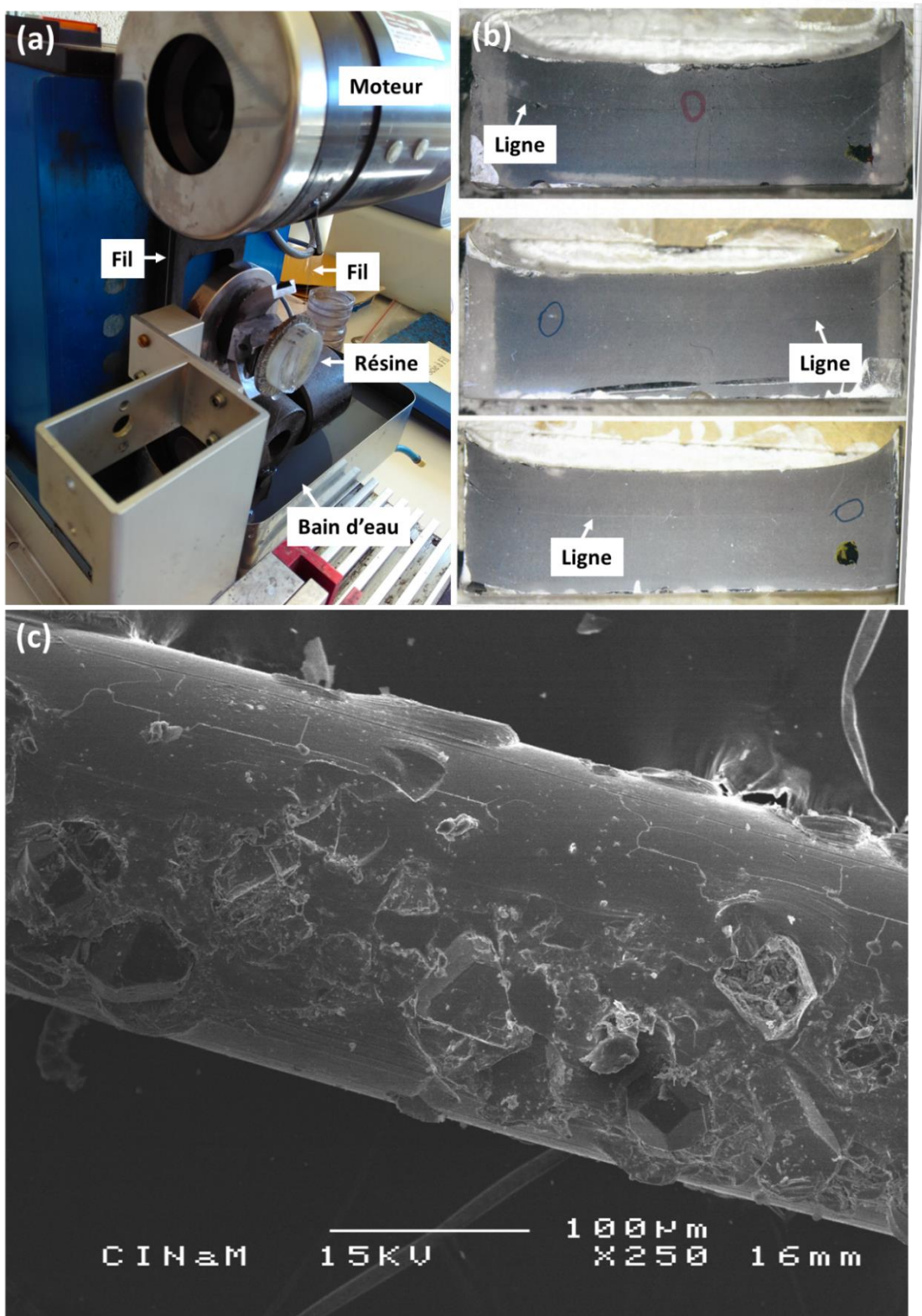


Figure C. (a) Résine sur la plateforme de découpe avec une scie à fil ; (b) trois tranches de résine découpées ; (c) image au MEB du fil. La préparation a été réalisée au laboratoire avec Olivier Grauby.

## Annexe 4. « Hachage » des microparticules avec un rasoir

Les microparticules collées sur l'adhésif en carbone du porte échantillon métallique sont d'abord observées au MEB avant hachage avec un rasoir. Avec un grossissement de  $\times 25$ , elles apparaissent sous la forme de points blancs (Figure D (a)). Cependant, ce grossissement les rend difficiles à observer après le hachage (Figure D (b)). A cette échelle sur la Figure D (b), on devine seulement les lignes laissées par le « hachage » avec le rasoir.

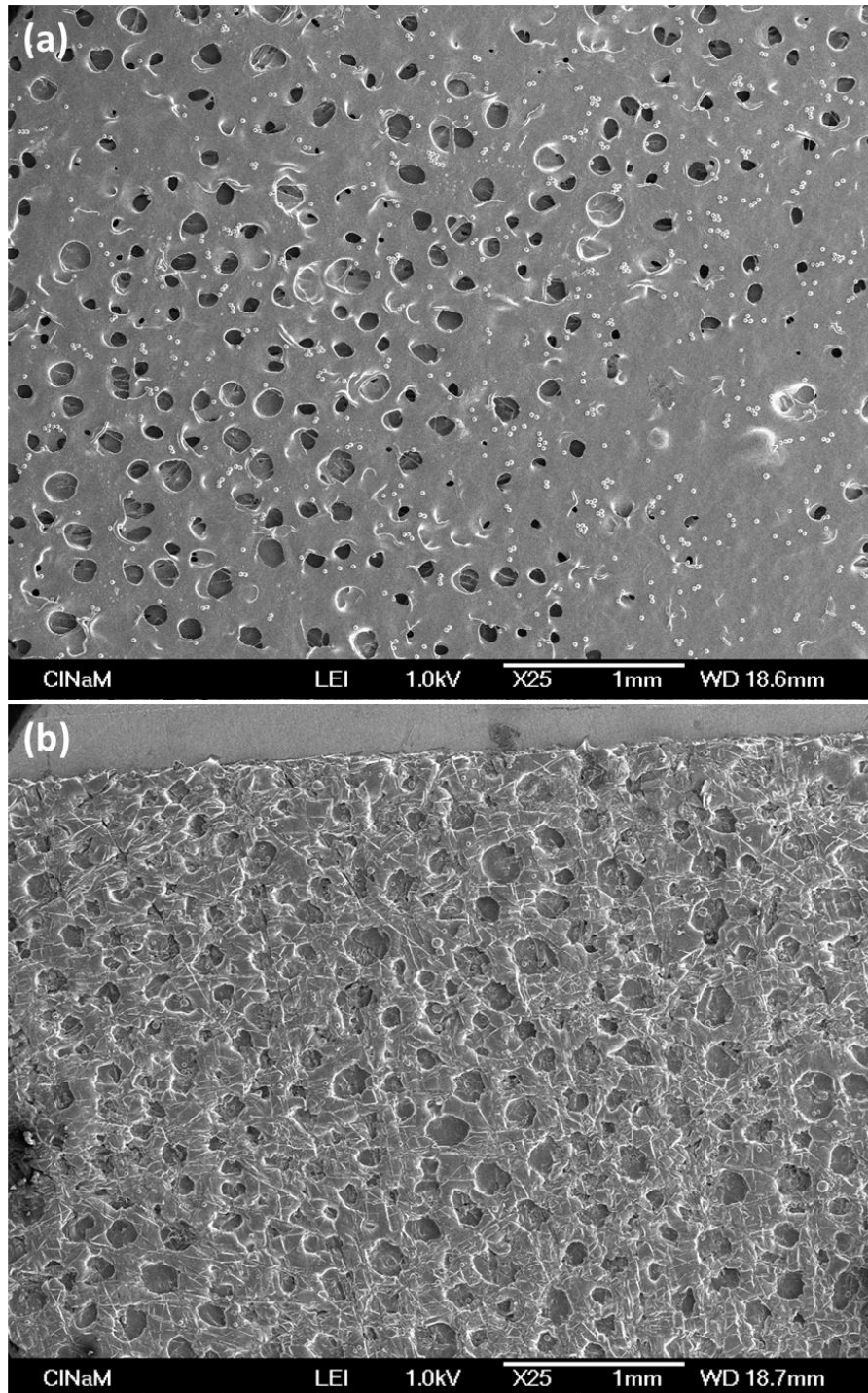


Figure D. Exemple des images au MEB (grossissement  $\times 25$ ) de la surface de l'adhésif en carbone (a) avant et (b) après être « hachée » par un rasoir.

Avec un fort grossissement ( $\times 2000$ ), la Figure E montre 4 microparticules de Na-alginate qui ont bien été « coupées » avec le rasoir (Figure E).

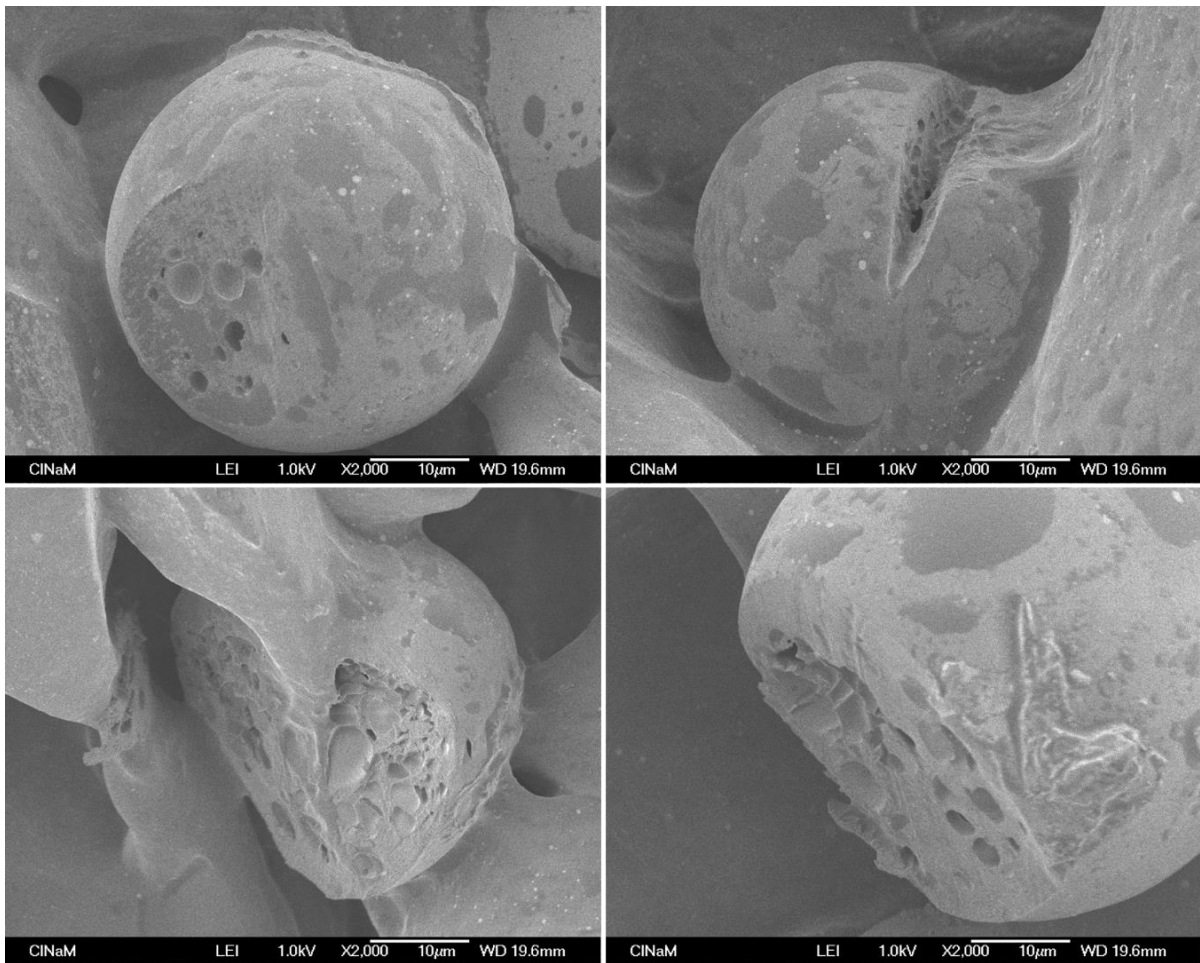


Figure E. Images au MEB (grossissement  $\times 2000$ ) de 4 microparticules de Na-alginate coupées avec le rasoir. Conditions de préparation :  $C_i = 0,25\text{wt}\%$ ,  $Q_{DMC} = 0,15\mu\text{L/s}$  et  $Q_{alginate} = 0,005\mu\text{L/s}$ .

## Annexe 5. Traitement des données AFM pour la mesure du module de Young

Un schéma de l'AFM que nous avons utilisé est représenté sur la Figure F (Roudit 2008). La déviation du levier (cantilever) est donnée par la détection du laser sur la photodiode, sous forme d'une différence de potentiel ( $\Delta V$ ). La déflexion du cantilever ( $\Delta d$ , en nm) correspond au produit de  $\Delta V$  (en V) par la sensibilité du levier (en nm/V) qui est déterminée grâce à une calibration préliminaire.

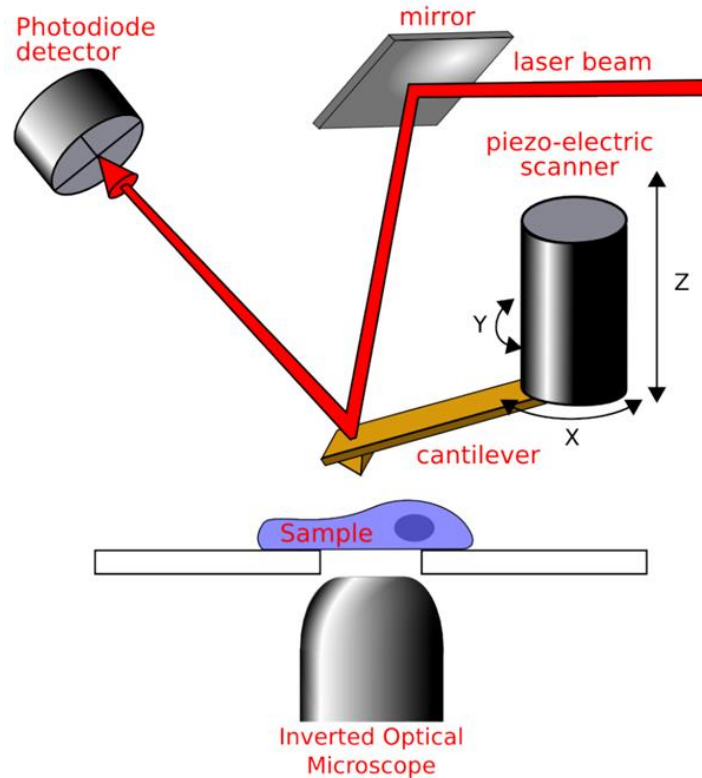


Figure F. Schéma de l'AFM utilisé dans cette thèse (Roudit 2008).

Le levier est de forme triangulaire (Figure G (a)) avec au bout une pointe de forme pyramide (Figure G (b)).

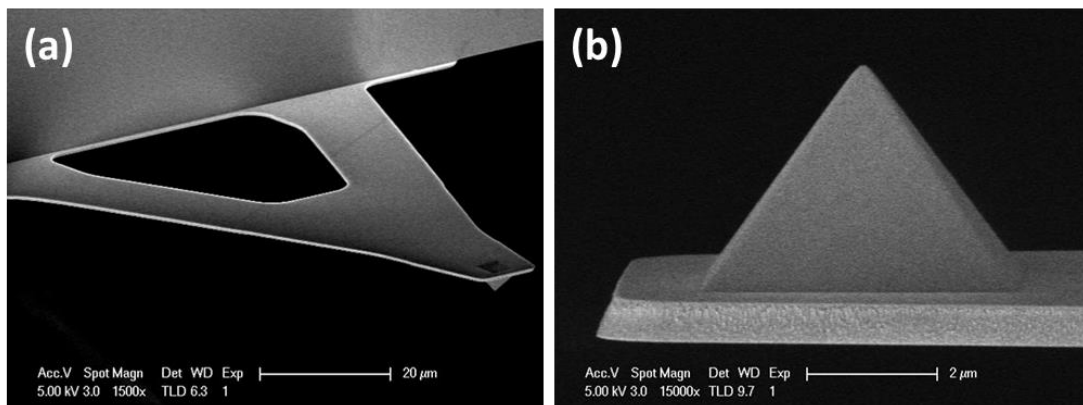


Figure G. Images au MEB (a) du levier (grossissement x1500) et (b) de la pointe (grossissement x15000) (<https://www.brukerafmprobes.com/p-3947-MLCT-BIO-DC.aspx>).

Lors de l'approche de pointe vers la surface à scanner, le signal du laser ne défléchit pas jusqu'au contact de la pointe avec la surface. Un exemple de courbe de force est donné dans la Figure H pour une microparticule de Ca-alginate. Les courbes expérimentales relatives à l'approche et à la rétraction du levier sont respectivement en bleu clair et bleu foncé et le modèle pour une pointe pyramidale est en rouge. L'indentation zéro indique le point de contact théorique. Il correspond à une déflexion nulle du levier (axe des ordonnées) car aucune force n'est encore appliquée de la part de la pointe sur la surface de la microparticule, et à une distance entre cette dernière et le levier qui est également nulle (axe des abscisses). Les valeurs négatives de l'abscisse sont l'indentation, qui est la déformation de la surface de la microparticule.

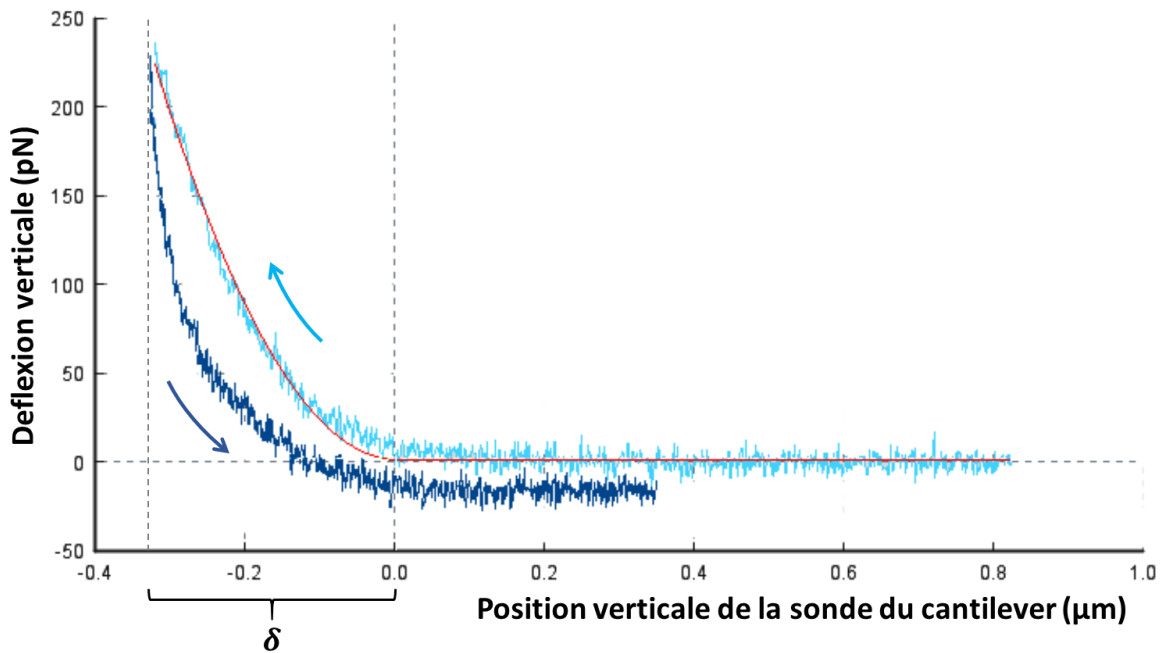


Figure H. Exemple de courbe de force sur une microparticule de Ca-alginate.

Le levier étant considéré comme un oscillateur harmonique de constante de raideur  $k_s$ , la loi de Hooke permet de déterminer la force ( $F$ ) avec l'Equation (c).

$$F = k_s \times \Delta d \quad (c)$$

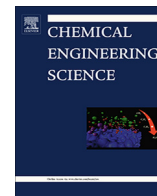
Suivant les propriétés mécaniques de la microparticule,  $F$  peut provoquer une déformation de la surface due à l'indentation ( $\delta$ ). Sur la courbe de force (Figure H),  $\delta$  correspond à la valeur absolue maximale de l'abscisse. Enfin, en appliquant le modèle de Hertz, lié à la forme pyramidale du cantilever (Figure G (b)), on relie  $F$  à  $\delta$  et au module de Young ( $E$ ) de la microparticule :

$$F = \frac{E \times t g \theta}{\sqrt{2} \times (1 - \nu^2)} \times \delta^2 \quad (d)$$

Avec  $\theta$  l'angle de la forme pyramidale, et  $\nu$  le ratio de Poisson.

## **Annexe 6. Publication dans « Chemical Engineering Science »**

Un article concernant la préparation des microparticules de Na-alginate et de Ca-alginate et leurs caractérisations (Chapitre I – Chapitre III dans la partie « C. Résultats et Discussions » de cette thèse) a été accepté par la revue « Chemical Engineering Science ».



# A microfluidic method generating monodispersed microparticles with controllable sizes and mechanical properties

Cheng Zhang<sup>a</sup>, Romain Grossier<sup>a</sup>, Leda Lacaria<sup>b</sup>, Felix Rico<sup>b</sup>, Nadine Candoni<sup>a</sup>, Stéphane Veessler<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> CNRS, Aix-Marseille Université, CINaM (Centre Interdisciplinaire de Nanosciences de Marseille), Campus de Luminy, Case 913, F-13288 Marseille Cedex 09, France

<sup>b</sup> Adhesion and Inflammation Lab (LAI)/INSERM U1067 CNRS UMR 7333, 163, Avenue de Luminy, Case 937, 13288 Marseille Cedex 09, France

## HIGHLIGHTS

- Microfluidic method for the production of monodispersed hydrogel microparticles.
- No use of surfactant.
- Microparticle separation is simple and easy.
- Microparticles of controllable sizes and mechanical properties are produced.

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 30 August 2019

Received in revised form 21 October 2019

Accepted 27 October 2019

Available online 28 October 2019

### Keywords:

Microfluidic  
Microparticle  
Hydrogel  
Alginate  
Microdroplet

## ABSTRACT

Seeking to produce microparticles that mimic red blood cells (RBCs), we present a microfluidic method of generating monodispersed hydrogel microparticles of Na-/Ca-alginate with controllable sizes (micrometer range) and mechanical properties. No surfactant is used. Transformation from Na-alginate to Ca-alginate microparticles is realized via *ex situ* gelation, which proves essential to obtaining desired microparticle properties, such as insolubility in water and RBC-like mechanical properties. For both Na-alginate and Ca-alginate microparticles, a smooth surface and a porous inner structure are observed under a scanning electron microscope. A platform of microgrippers is successfully developed to manipulate the microparticles. The Young's modulus measured using an atomic force microscope on the surface of Ca-alginate microparticles is of the same order as that of RBCs.

© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Microfluidics is recognized as a powerful technique to form discrete and uniform hydrogel structures at the microscale (<100 μm) (Utech et al., 2015). Its main advantage is that droplet-based microfluidic systems permit generation of discrete and uniform microdroplets which are dispersed in a continuous phase (Zhang et al., 2015). Each microdroplet can serve as the site of a gelation reaction that yields microparticles (Hâti et al., 2016; Utech et al., 2015; Yamada et al., 2012; Zhang et al., 2007). In this paper, we explore the generation of monodispersed hydrogel microparticles for potential applications in medical and biological fields (Lee and Mooney, 2012).

Alginate is a well-known biopolymer obtained from brown algae. It has been widely applied in drug delivery and tissue engi-

neering due to its biocompatibility, low toxicity, nonimmunogenicity, relatively low cost, and easy gelation with divalent cations such as Ca<sup>2+</sup> (ionic cross-linking). Alginate is a linear polysaccharide containing varying amounts of 1,4-linked β-D-Mannuronic acid and α-L-Guluronic acid residues arranged in a block-wise manner along the backbone. The composition and residue sequence vary with the source (Lee and Yuk, 2007). Seeking to control the mechanical and/or swelling properties of alginate gels, researchers have investigated ionic cross-linking with different types of molecules and cross-linking densities (Ouwerx et al., 1998). The purpose of our study was to produce calibrated and monodispersed microparticles whose size (5–10 μm) and mechanical properties (E = 26 ± 7 kPa (Dulińska et al., 2006)) are similar to those of red blood cells (RBCs). This was intended to validate a cellular ultrasonic imaging setup (Monchy et al., 2018) used to assess RBC aggregation under *in vivo* and *in situ* flow conditions.

Calcium alginate (Ca-alginate) was chosen for its mechanical properties (Ouwerx et al., 1998). Alginate forms hydrogel by simple gelation with divalent cations, such as calcium cation (Ca<sup>2+</sup>). However, direct mixing of a calcium solution with an alginate

\* Corresponding author at: CNRS, Aix-Marseille Université, CINaM (Centre Interdisciplinaire de Nanosciences de Marseille), Campus de Luminy, Case 913, F-13288 Marseille Cedex 09, France.

E-mail address: [veessler@cinam.univ-mrs.fr](mailto:veessler@cinam.univ-mrs.fr) (S. Veessler).



solution in a microfluidic chip gives rise to instant gelation, likely resulting in clogging and non-uniform microdroplet formation (Utech et al., 2015). To overcome this, other approaches were proposed in the literature to provide calcium (a cross-linker):

(1) dissolution of solid particles: internal gelation when solid particles of calcium carbonate are in the dispersed alginate phase, or external gelation when solid particles of calcium acetate are in the continuous phase (Zhang et al., 2007);

(2) chelation of calcium and its controlled release in the microdroplet via acidification (Utech et al., 2015) or exchange of ligands (Hâti et al., 2016);

(3) injection of a buffer to delay gelation, acting as a barrier to delay calcium diffusion (Yamada et al., 2012) but requiring a complicated microfluidic chip with up to 7 inlet channels and with a risk of clogging.

Thus, *in situ* gelation under a microfluidic method remains an issue. Seeking to overcome this problem, we use a solvent extraction method (Freitas et al., 2005; Rondeau and Cooper-White, 2008; Sugaya et al., 2013). We develop a simple 3-step alginate microparticle synthesis. First, sodium alginate (Na-alginate) microdroplets of the desired size and concentration are produced without using surfactant, since surfactant has been shown to affect particle morphology (Pittermannová et al., 2016). Second, Na-alginate microparticles are obtained by microdroplet shrinkage via water extraction by dimethyl carbonate (DMC). Third, *ex situ* cross-linking is performed with a calcium chloride ( $\text{CaCl}_2$ ) solution, which yields Ca-alginate microparticles. Here, unlike most approaches where particle size is controlled exclusively by channel size (Utech et al., 2015), the final size is controlled by channel diameter, chemical composition of the continuous phase, initial Na-alginate concentration ( $C_i$ ), ratio ( $k$ ) of flow rates between the continuous phase and the dispersed phase and total flow rate ( $\Phi_{\text{TOT}}$ ) of the two phases.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemical materials

Sodium alginate (I3G80), dimethyl carbonate (ReagentPlus 99%, CAS number 613-38-6,) and calcium chloride (22 317.297) were obtained from Alliance Gums and Industries, SIGMA-ALDRICH and PROLABO, respectively and used without further purification.

### 2.2. Principle of droplet-based microfluidic system with DMC

A droplet-based microfluidic system is constructed (Fig. 1) using commercially available polyether ether ketone (PEEK) junctions and Teflon-like tubing (IDEX Health and Science) with inner diameter (ID) 150  $\mu\text{m}$  unless specified, initially designed for high-performance liquid chromatography (HPLC) systems. These two materials were previously tested in our group and proved to be compatible with almost all solvents, showing excellent resistance and no solvent evaporation (Ildefonso et al., 2012).

This droplet-based microfluidic system is used to generate hydrogel microparticles dispersed in a flow of continuous phase.

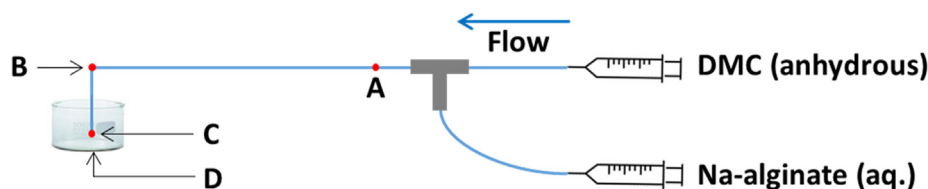


Fig. 1. Diagram of the microfluidic setup where A, B, C and D are observation points after microdroplet generation, at the end of the channel, at the outlet of the channel and at the bottom of the collecting vial respectively.

An aqueous Na-alginate solution (concentration varying over 3 orders of magnitude from 0.006 to 1 wt%) is used as the dispersed phase and dimethyl carbonate (DMC) as the continuous phase. Although these two phases are immiscible at room temperature, water's low solubility (3 wt%) in DMC (Stephenson and Stuart, 1986) ensures slow exchange between DMC and water.

### 2.3. Principle of shrinkage during generation and collection of microdroplets

Our approach is inspired by Rondeau and Cooper-White (Rondeau and Cooper-White, 2008) who studied the formation of biopolymer microparticles using DMC as continuous phase. Along the microfluidic channel, water contained in Na-alginate microdroplets diffuses slowly into carrier fluid DMC (Fig. 2). Consequently, the concentration of alginate in the microdroplets increases, assuming negligible diffusion of alginate in DMC (Rondeau and Cooper-White, 2008). Furthermore, this mechanism allows the desired microparticle size and concentration to be obtained without using low ID channels or injecting a highly concentrated and viscous alginate solution, both of which would complicate the procedure and risk blocking microchannels. Finally, shrunk microdroplets are collected in a DMC-containing vial, where water extraction continues. Because of the water extraction by DMC, Na-alginate microdroplets generated in the microfluidic channel shrink, becoming Na-alginate microparticles. After gentle drying at room temperature, alginate cross-linking is realized simply by adding an aqueous  $\text{CaCl}_2$  solution, forming Ca-alginate microparticles. Fig. 3 shows optical micrographs of microdroplets/particles at different observation points during the experiment. Note that separating Na-alginate and Ca-alginate microparticles from solution is a crucial step for potential applications (Pittermannová et al., 2016).

### 2.4. Characterization of microparticles

#### 2.4.1. Scanning electron microscope

The topology and inner structure of microparticles are observed by scanning electron microscope (SEM, JEOL 6340F), with a low acceleration voltage of 1 kV and without coating. After drying at room temperature in air, microparticles are fixed to the bottom of a recipient. They are then transferred to a copper sample plot with carbon tape. This step may break some microparticles, revealing the inner structure. A razor blade is also used to cut microparticles to observe the inner structure.

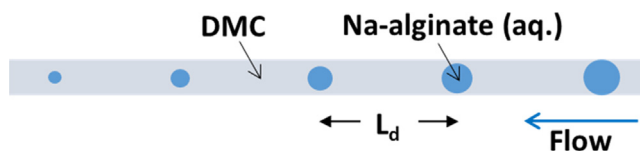
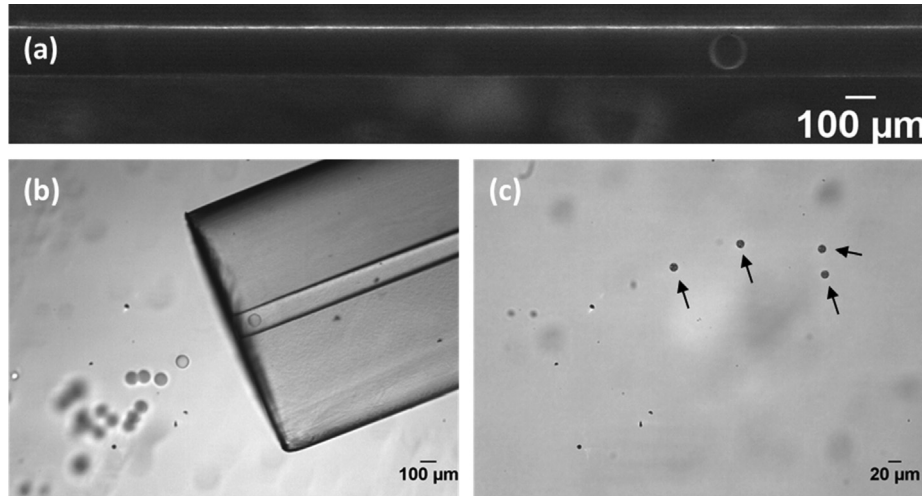


Fig. 2. Schematic illustration of the shrinkage of microdroplets in DMC along the microfluidic channel where  $L_d$  is the distance between 2 successive microdroplets.



**Fig. 3.** Optical micrographs of Na-alginate microdroplets ( $C_i = 0.06$  wt%) in DMC in a channel (ID 150  $\mu\text{m}$ ) (a) after generation (point A in Fig. 1) and (b) at the outlet of the channel (point C in Fig. 1) during collection in DMC. (c) Na-alginate microparticles ( $d = 11.7 \mu\text{m} \pm 1.9\%$ ) in DMC, after complete shrinkage, at the bottom of the collecting vial (point D in Fig. 1).

#### 2.4.2. Microgrippers

The mechanical properties of microparticles are first evaluated using microgrippers (FT-G 102 Force Sensing Microgrippers from FemtoTools). Alginate microparticles, placed in a glass petri dish filled with aqueous solution, are observed under a transmission optical microscope.

#### 2.4.3. Atomic force microscope

The mechanical properties of microparticles are also characterized by measuring the Young's modulus using a NanoWizard atomic force microscope (JPK, Bruker, Santa Barbara, CA, USA). The experiment involves the use of a V-shaped cantilever, an MLCT-Bio-DC(C) (Bruker, Santa Barbara, CA, USA) with a pyramidal probe and a spring constant of 0.01 N/m. Microparticles are deposited on a surface and observed via an inverted optical microscope coupled with AFM.

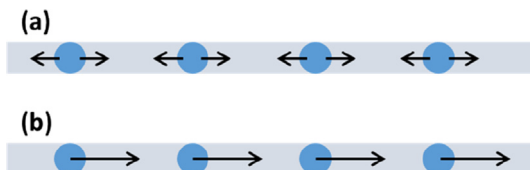
### 3. Results and discussion

#### 3.1. In-channel microdroplet shrinkage

We discuss here in detail the shrinkage of spherical microdroplets in the microfluidic channel. For each microdroplet, water diffuses both left and right in the channel (Fig. 4 (a)). To facilitate the calculation, we consider that water diffuses exclusively in one direction, either left or right (Fig. 4 (b)), until DMC is saturated.

Thus, the quantity of DMC in the volume between two microdroplets ( $V_d$ ), related to the distance between two microdroplets ( $L_d$ ), determines the maximum quantity of water that can be extracted from one microdroplet. For a microfluidic channel of inner diameter  $d$ ,  $V_d$  is calculated with the Eq. (1).

$$V_d = L_d \times \pi \left( \frac{d}{2} \right)^2 \quad (1)$$



**Fig. 4.** Illustration of water diffusion (a) in reality and (b) for simplified calculation during extraction by DMC in the channel.

Obviously, given the limited solubility (3 wt%) of water in DMC, a certain  $L_d$  (or  $V_d$ ) is required to achieve the desired decrease in diameter (or volume) of microdroplets.

We demonstrate here a method of estimating the required  $L_d$  to obtain a given reduction in diameter after shrinkage of microdroplets of initial diameter  $d_i$ . Because diffusion of Na-alginate in DMC is negligible (Rondeau and Cooper-White, 2008), the decrease in microdroplet diameter (or volume) is only due to water extraction by DMC. The desired diameter is attained when DMC is saturated by water. This equilibrium state is described by Eq. (2), which indicates that the volume of water diffused to DMC determines the reduction in microdroplet volume  $R_v(\%)$ :

$$V_d \times 3\% = \left( \frac{4}{3} \right) \pi \left( \frac{d_i}{2} \right)^3 \times R_v(\%) \quad (2)$$

As a first approximation, we assume that the initial diameter  $d_i$  of the microdroplets generated is close to the channel ID ( $d_i \approx d$ ). Then, by combining Eqs. (1) and (2), we get Eq. (3) showing the ratio between required microdroplet distance  $L_d$  and initial microdroplet diameter  $d_i$ .

$$L_d/d_i \approx \frac{2}{9} R_v \quad (3)$$

As an example, there is a 90% decrease in diameter, from microdroplets with a diameter of 150  $\mu\text{m}$  to microparticles with the same diameter range as RBCs (e.g. 15  $\mu\text{m}$ ). This corresponds to a 99.97% decrease in volume  $R_v$ . Therefore, according to the theoretical calculation (3), the  $L_d/d_i$  ratio required is:

$$L_d/d_i \approx 22.2 \quad (4)$$

#### 3.2. Operating parameters required to obtain desired microdroplet diameter

The channel containing microdroplets and DMC is observed at points A and B, situated 5 cm and 63 cm respectively from the outlet of T-junction (Fig. 1).

##### 3.2.1. Controlling the distance between microdroplets $L_d$

Experiments are conducted to study the generation of microdroplets at point A, by varying the flow rates of dispersed phase  $\phi_D$  and continuous phase  $\phi_C$  (Fig. S1 in the supplementary material).  $\phi_D$  is varied from 0.001 to 0.3  $\mu\text{L/s}$  and  $\phi_C$  from 0.01 to

0.6  $\mu\text{L/s}$ . For each pair ( $\phi_D$  and the corresponding  $\phi_C$ ),  $L_d$  is measured at point **A**. Each pair corresponds to a given ratio  $k$  ( $\phi_C/\phi_D$ ). Regarding the total flow rate  $\phi_{TOT}$  ( $\phi_D + \phi_C$ ), our pairs are divided into two groups with low and high values of  $\phi_{TOT}$ . Plotting  $L_d/d_i$  versus  $k$  for each range of  $\phi_{TOT}$  (Fig. S2 in the supplementary material) shows an increase in  $L_d/d_i$  with  $k$ , with a linear relationship and slope depending on  $\phi_{TOT}$ . This result is consistent with our previous findings on the influence of  $\phi_D/\phi_C$  (i.e.  $1/k$ ) and  $\phi_{TOT}$  on microdroplet diameter  $d_i$  (Zhang et al., 2015).

Finally, the fitting equation obtained for each value of  $\phi_{TOT}$  gives the value of  $k$  required to reach  $L_d/d_i = 22.2$  (Eq. (4)), corresponding to a volume reduction of 99.97% (crosses in Fig. S2 in the supplementary material). This means that with a low and a high total flow rate, a value of 21 and 38 for  $k$  respectively ensures a volume reduction of 99.97%. Moreover, assuming a maximum reduction of volume  $R_v < 100\%$  for the final microparticle, Eq. (3) demonstrates that this  $R_v$  is attainable with  $L_d/d_i < 22.3$ . This is why the fitting curves are stopped at  $L_d/d_i < 22.3$ . However, loss of water takes time, and meanwhile the microdroplet is moving forward in the channel. Therefore, the length of channel required to reach the final diameter depends on flow rates, as discussed below.

### 3.2.2. Influence of residence time on shrinkage rate

For a given  $k$ , microdroplets are observed at points **A** and **B**. Fig. 5 shows optical micrographs of microdroplets at point **B** obtained for  $\phi_{TOT}$  varying from 0.1 to 0.2  $\mu\text{L/s}$ , thus between the two  $\phi_{TOT}$  ranges described above (see fitting curves). Because of  $k$  values (20, 30 and 40),  $L_d$  is too large to be photographed for measurement. Nevertheless, microdroplet shrinkage is observed for all three values of  $k$ . According to optical micrographs taken at points **A** and **B**, microdroplet volume reduces 17%, 71% and 99% respectively for  $k$  of 20, 30 and 40. Thus, microdroplet shrinkage or water loss increases with  $k$ . Moreover, the significant shrinkage for  $k = 40$  is confirmed by observation of microdroplets at different points along the channel (between **A** and **B**), as shown in Fig. S3 of the supplementary material. The final microparticle diameter is about 10  $\mu\text{m}$ , which is in the same range as RBCs.

However, assuming  $L_d/d_i = 22.2$  (Eq. (4)) for  $R_v$  of 99.97%, i.e. a diameter reduction of 90% (crosses in Fig. 5), experiments should lead to a diameter reduction of around 50%, 80% and almost 100% for  $k$  of 20, 30 and 40, respectively. Obviously, the real

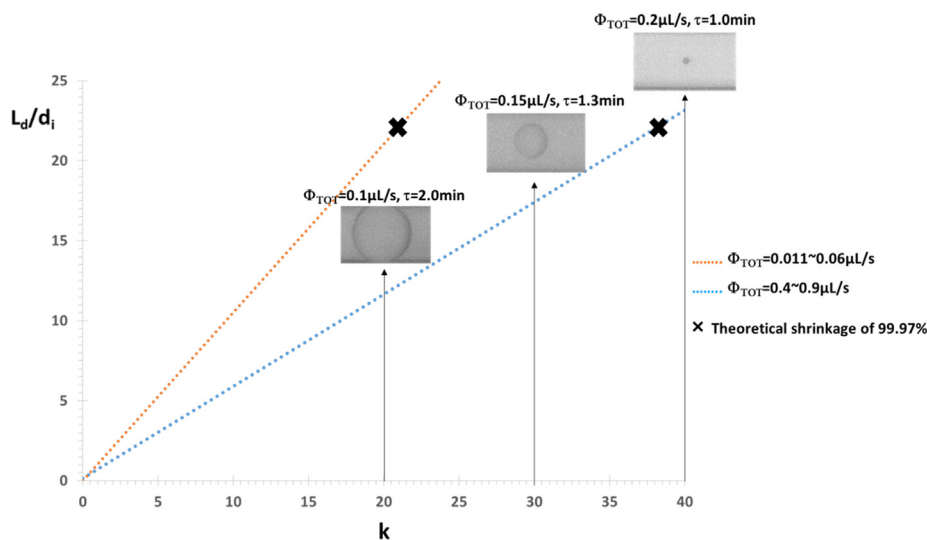
shrinkage rate at point **B** is lower than that calculated. This is probably due to the insufficient residence time  $\tau$  of microdroplets in the channel between points **A** and **B**, which limits the loss of water. Moreover,  $\tau$  decreases with  $\phi_{TOT}$  since the distance between **A** and **B** is fixed. Therefore, we can either increase the channel length or continue the shrinkage by collecting microdroplets in DMC.

However, a long channel causes fluid instability, probably because of the pressure drop. For instance, microdroplets at the end of the channel for  $k = 40$  and  $\phi_{TOT} = 0.205 \mu\text{L/s}$  are observed to approach each other, forming aggregations because no surfactant is used (Fig. S4 in the supplementary material). They flow together towards the outlet, despite the fact that they start out relatively far from each other due to the high value of  $L_d$ . Actually, because of shrinkage, when microdroplet diameter becomes too small compared to channel ID, microdroplets can move towards the inner wall of the channel and may be affected by contamination there. Our experience indicates that a clean channel is key to avoiding the aggregation of microdroplets. Thus, careful cleaning of the channel with ethanol before experiments is highly recommended, especially when a high  $k$  is required. Contrastingly, for low values of  $k$ , the main risk is coalescence of microdroplets when leaving the channel. This can be prevented by gentle hydrodynamic agitation. Thus, in addition to the careful choice of  $k$ , certain operating techniques also play a role in achieving desired microparticle size.

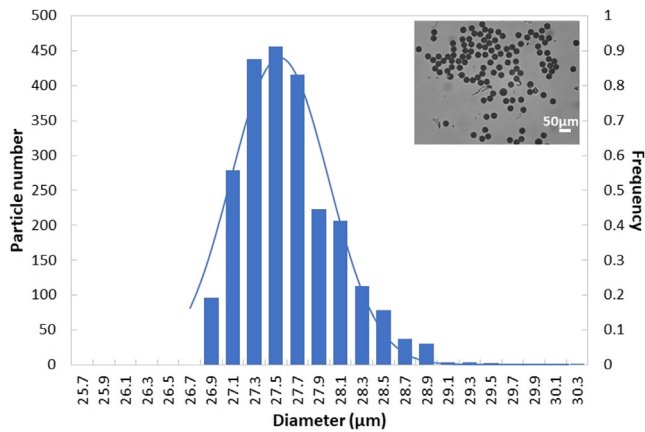
### 3.3. Shrinkage during collection: From microdroplets to microparticles of Na-alginate

When collected in DMC, Na-alginate microdroplets continue to shrink and eventually form spherical Na-alginate microparticles. For the experimental condition of  $C_i = 0.25 \text{ wt\%}$ , **DMC flow rate** = 0.15  $\mu\text{L/s}$ ,  $k = 30$  and  $L = 20 \text{ cm}$ ,  $d_f$  is measured on a sampling of about 2386 microparticles and monodisperse size distribution is revealed (Fig. 6).

Initial values of microdroplet diameter ( $d_i$ ) and Na-alginate concentration ( $C_i$ ) are varied to study their effect on final microparticle diameter ( $d_f$ ) and concentration ( $C_f$ ) after collection. For the experiments in Fig. 7, microdroplets of  $d_i$  from 110 to 220  $\mu\text{m}$  are generated with  $C_i$  of Na-alginate solutions varying from 0.006 to 1 wt%. For each experiment,  $d_f$  is measured on a sampling of about 50 microparticles. It is noteworthy that spherical microparticles with



**Fig. 5.** Fitting of  $L_d/d_i$  versus  $k$  for two range values of  $\phi_{TOT}$  from Fig. S2 with observations of microdroplets at point **B** (63 cm from T-junction outlet, Fig. 1) for  $\phi_{TOT}$  from 0.1 to 0.2  $\mu\text{L/s}$ . Markers ( $\times$ ) correspond to theoretical shrinkage of 99.97% in microdroplet volume, i.e. 90% diameter reduction ( $L_d/d_i = 22.2$ ).  $\tau$ : Residence time of microdroplets in the channel. (Initial Na-alginate concentration  $C_i = 0.02 \text{ wt\%}$ , channel length  $L = 70 \text{ cm}$ .)



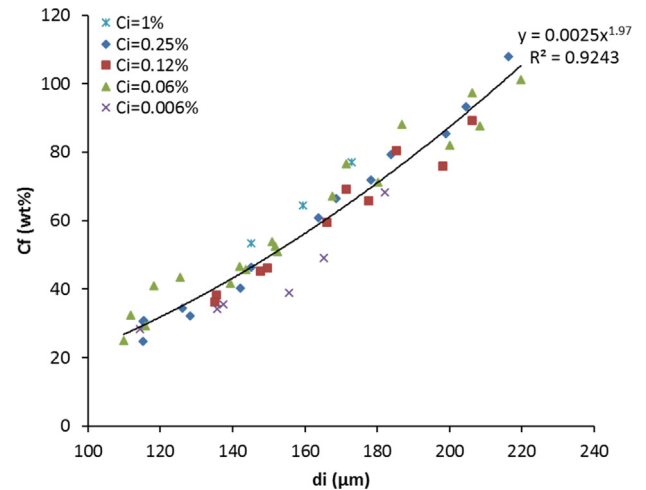
**Fig. 6.** Size distribution of Na-alginate microparticles. The microparticles are illustrated in the inset.  $d_f = 27.5 \mu\text{m} \pm 0.5 \mu\text{m}$ . The curve shows the Gaussian fitting. Experimental conditions:  $C_i = 0.25 \text{ wt}\%$ , **DMC flow rate** =  $0.15 \mu\text{L/s}$ ,  $k = 30$  and  $L = 20 \text{ cm}$ . Result based on 2386 microparticles produced at a frequency of 2 microparticles/s without using surfactant.

a post-collection diameter  $d_f$  of  $7.7 \mu\text{m} \pm 0.3 \mu\text{m}$  are obtained with  $C_i = 0.006 \text{ wt}\%$  (Fig. 10a and b), indicating that RBC size can be reached using this process. Moreover, Fig. 7a shows that  $d_f$  increases with both  $C_i$  and  $d_i$ . Similar results were previously found for porous microparticles of Na-poly(styrenesulfonate) formed by inkjet injection (Yang et al., 2015). In our study, for each  $C_i$ ,  $d_f$  versus  $d_i$  is fitted by a power law. According to the fitting equations, the exponent is about 0.3–0.4 for all  $C_i$ , whereas the constant factor increases with  $C_i$  (Fig. 7a). Since  $d_f$  does not greatly vary with  $d_i$  when  $C_i$  is fixed, a mean value of  $d_f$  is calculated for each  $C_i$  and plotted versus  $C_i$  (Fig. 7b). This leads to another power law dependence. This curve enables the initial concentration of Na-alginate to be defined so as to obtain a given final microparticle size.

In addition, the final concentration of Na-alginate ( $C_f$ ) in the microparticle after collection is estimated from initial and final volumes of the microdroplet ( $V_i$  and  $V_f$ ), considering that the quantity of Na-alginate in the microdroplet remains constant. Therefore, we assume as above that water diffusion from microdroplets to DMC is the only mass transfer. Then  $C_f$  is given by Eq. (5).

$$C_f = C_i \times \left(\frac{d_i}{d_f}\right)^3 \quad (5)$$

From data in Fig. 7a and Eq. (5),  $C_f$  is calculated for different  $d_i$  and  $C_i$  (Fig. 8). It is obvious that  $C_f$  depends drastically on  $d_i$ , whatever the value of  $C_i$ . Thus, a power law fits all the points without



**Fig. 8.** Relationship between the calculated final Na-alginate concentration  $C_f$  in the microparticle and the initial diameter  $d_i$  of droplets with different initial concentrations  $C_i$ , with the fitting curve of all data.

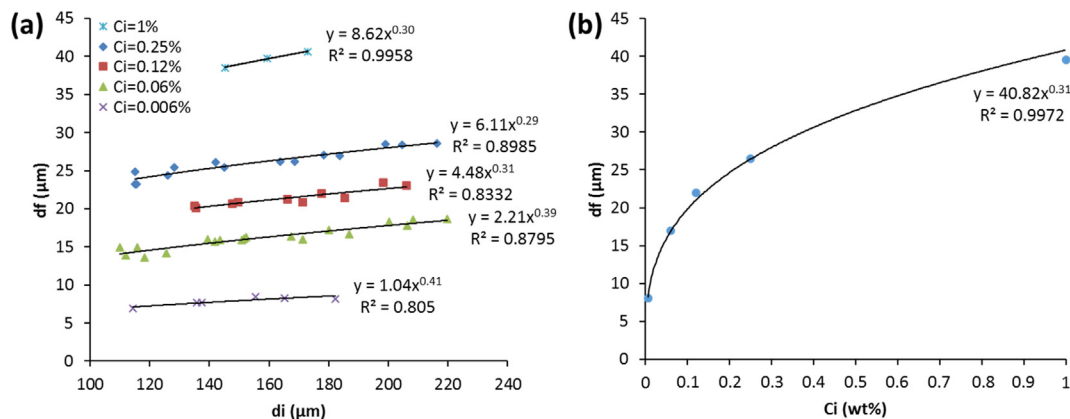
distinction between  $C_i$  values. Note that the fitting equation can be derived from those in Fig. 7a (mathematical derivation in the supplementary material). This curve enables the initial size of droplets to be defined so as to obtain a given final concentration of Na-alginate in microparticles. This final concentration is important, as it can affect the mechanical properties of the microparticles. Thus, the initial size of droplets determines the final concentration of Na-alginate in microparticles, which in turn may control microparticle mechanical properties.

### 3.4. From Na-alginate microparticles to Ca-alginate microparticles

All the Na-alginate microparticles are observed to be soluble in water, which limits the chemical composition of the media used in further research or applications. To optimize, we therefore use a divalent cation,  $\text{Ca}^{2+}$  here, for alginate gelation.

#### 3.4.1. Formation of Ca-alginate microparticles by cross-linking with a $\text{CaCl}_2$ solution

After total evaporation of DMC, an aqueous  $\text{CaCl}_2$  solution is added to the collecting vial containing dried Na-alginate microparticles. The cation of calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) induces cross-linking (Yang et al., 2015), thus transforming Na-alginate microparticles into Ca-alginate microparticles. Immediate swelling is observed when  $\text{CaCl}_2$  (0.5%, 1% or 10 wt%) is added. The diameter of microparticles



**Fig. 7.** (a) Final microparticle size  $d_f$  as a function of initial microdroplet size  $d_i$  for different Na-alginate concentrations  $C_i$  (0.006 to 1 wt%); (b) Plot of final microparticle mean diameter  $d_f$  after collection versus initial Na-alginate concentration  $C_i$ .

increases from  $28.7 \mu\text{m} \pm 0.3 \mu\text{m}$  (measured on 51 microparticles) before cross-linking (dried microparticles obtained with  $C_1 = 0.25$  - wt%,  $k = 5$  and  $\phi_{\text{TOT}} = 0.06 \mu\text{L/s}$ ) to  $33.4 \mu\text{m} \pm 0.4 \mu\text{m}$  (measured on 51 microparticles) after immersion and cross-linking (Fig. 9 for 0.5 wt% of  $\text{CaCl}_2$ ). The results are identical whatever the  $\text{CaCl}_2$  concentration: it has no obvious effect on either the shape or the size of final Ca-alginate microparticles. Unlike Na-alginate microparticles, all the Ca-alginate microparticles are observed to be insoluble in water. This holds promise for future applications in water.

It is noteworthy that gelation was also achieved for small Na-alginate microparticles ( $7.7 \mu\text{m} \pm 0.3 \mu\text{m}$ ) whose diameter is close to that of RBCs (Figs. 7, 10a and b). Observations lead to the same conclusion: immediate swelling after immersion in  $\text{CaCl}_2$  (Fig. 10c). However, due to the difficulty of observation and measurement of the Ca-alginate microparticles produced in this experimental condition, we cannot provide quantitative data regarding size and mechanical properties on these microparticles.

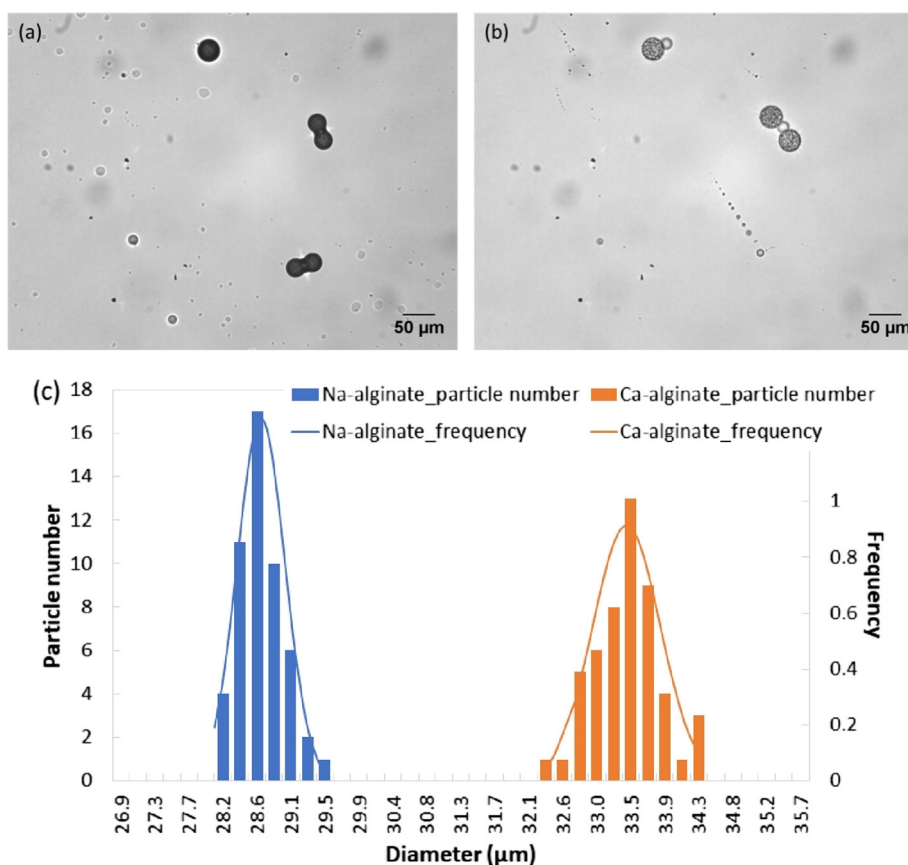
### 3.4.2. Characterization of Na-alginate and Ca-alginate microparticles

In addition to the optical microscope, the scanning electron microscope (SEM) is also used to observe the topology and the inner structure of microparticles. Furthermore, preliminary attempts to characterize microparticle mechanical properties are carried out using microgrippers.

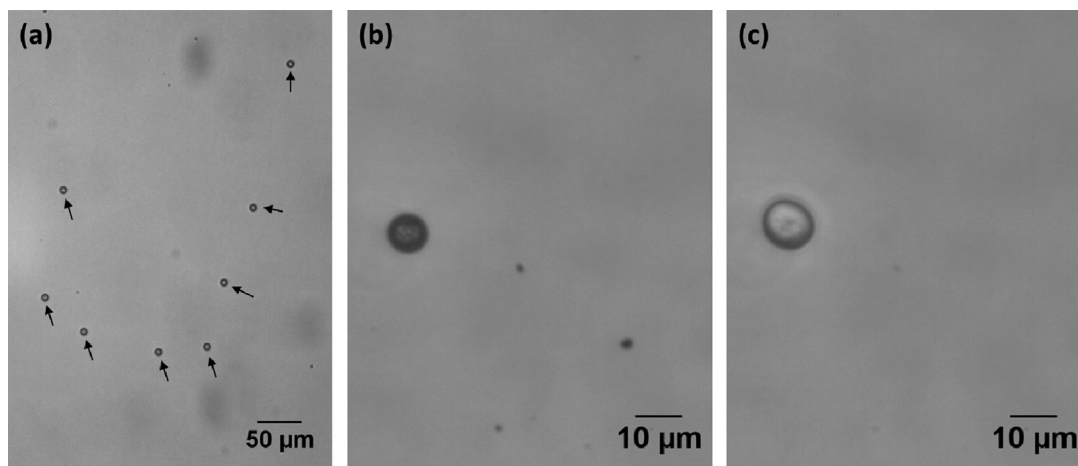
**3.4.2.1. Topology of Na-alginate and Ca-alginate microparticles.** SEM images (Fig. 11) show that both Na-alginate and Ca-alginate microparticles are spherical with a smooth surface. Ca-alginate microparticles are slightly smaller than Na-alginate microparticles,

which seems inconsistent with the swelling previously observed (Fig. 9). This can be explained by the manipulating conditions under vacuum in SEM. Because water remaining in the microparticle is extracted and quickly evaporates, there is a second shrinkage after production, until a new equilibrium is reached. This second shrinkage sometimes even causes deformation in the microparticle surface (Fig. S6(b) in the supplementary materials), depending on microparticle properties such as diameter and concentration. This is why, for both Na-alginate and Ca-alginate microparticles, the diameter measured by SEM is smaller than that measured by optical microscope. Moreover, SEM measurements show Na-alginate microparticles to be larger than the corresponding Ca-alginate ones, suggesting that Ca-alginate microparticles lose more water due to the vacuum.

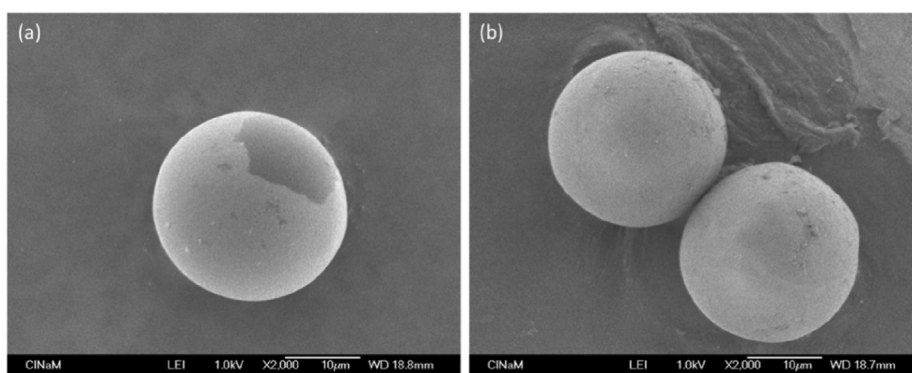
**3.4.2.2. Inner structure of Na-alginate and Ca-alginate microparticles.** Observations of an Na-alginate microparticle in DMC under optical microscope (Fig. S5 in the supplementary material) and a dried one under SEM (Fig. 12 (a)) reveal a porous inner structure in both cases. We therefore propose the following mechanism of microparticle formation, in accordance with (Yang et al., 2015) First, after Na-alginate microdroplets are generated, water moves from the microdroplets to DMC. Within the microdroplets, this water movement also induces the migration of alginate molecules towards the interface with DMC. As a result, (1) an outer shell of alginate forms gradually until it becomes so dense that water can no longer be extracted and therefore remains trapped inside; (2) several inner areas become vacant after the alginate migrates, which explains the observation of pores. The inner structure of



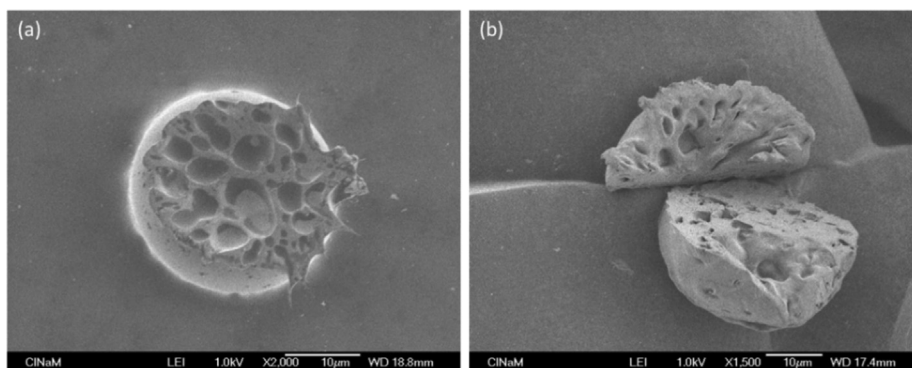
**Fig. 9.** Images of (a) dried Na-alginate microparticles and (b) Ca-alginate microparticles after immersion in  $\text{CaCl}_2$  solution (0.5 wt%). (c) Size distribution of Na-alginate and Ca-alginate microparticles (measured on 51 microparticles). The curves show the Gaussian fitting. Experimental conditions:  $C_1 = 0.25$  wt%, DMC flowrate =  $0.05 \mu\text{L/s}$  and  $k = 5$ .



**Fig. 10.** (a) Alginate microparticles in DMC; (b) a dried alginate microparticle; (c) the same microparticle as in (b) immersed in  $\text{CaCl}_2$  (1.35 wt%). Experimental conditions:  $C_i = 0.006$  wt%, DMC flow rate =  $0.15 \mu\text{L/s}$ ,  $k = 30$ ,  $L = 30$  cm.



**Fig. 11.** SEM photographs of (a) Na-alginate and (b) Ca-alginate microparticles (formed in a 0.5 wt%  $\text{CaCl}_2$  solution). (Same experimental conditions as for Fig. 9).

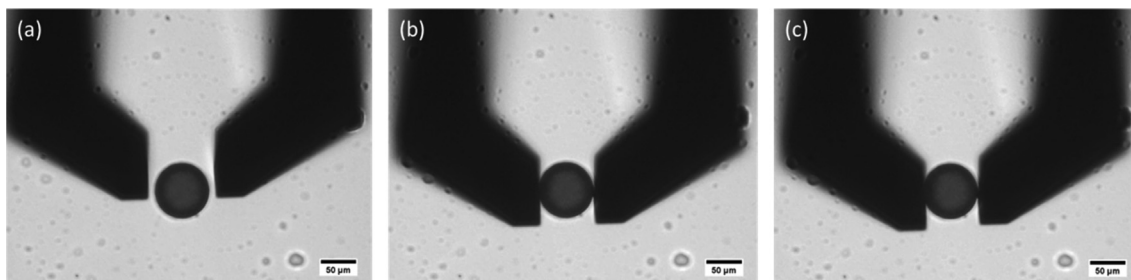


**Fig. 12.** SEM photographs of the inner structure of (a) Na-alginate and (b) Ca-alginate microparticles (formed in a 0.5 wt%  $\text{CaCl}_2$  solution). (Same experimental conditions as for Fig. 9).

Ca-alginate microparticles is also observed to be porous (Fig. 12 (b) and Fig. S7 in the supplementary material), suggesting that cross-linking by calcium cation does not influence microparticle inner structure.

**3.4.2.3. Mechanical properties evaluated by microgrippers.** After drying, Na-alginate and Ca-alginate microparticles are grasped with force sensing microgrippers to estimate their mechanical properties (Fig. S8 in the supplementary material). Using a 6D positioning

system, the microgrippers are placed around the microparticle to be tested. Depending on the voltage supplied to the microgripper left arm (0–170 V), the microparticle is grasped and the force sensor of the right arm provides applied force of up to  $250 \mu\text{N}$ . This applied force combined with the optical observation provides access to the microparticle reaction to the compression. For the Na-alginate microparticle (Fig. 13), we observed (Fig. 13 (c)) slipping of the left gripper arm, which indicates a strong resistance to the maximum applied force of  $250 \mu\text{N}$ . For both Na-alginate



**Fig. 13.** A dried Na-alginate microparticle ( $d_f = 78.7 \mu\text{m}$ ,  $C_i = 0.25 \text{ wt}\%$ , **DMC flow rate** =  $1.5 \mu\text{L/s}$ ,  $k = 50$ ,  $L = 30 \text{ cm}$  in a capillary with inner diameter (ID)  $500 \mu\text{m}$ ) between microgrippers during (a) approach, (b) contact and (c) force-controlled gripping.

and Ca-alginate microparticles manipulated by microgrippers, no overall deformation was observed.

**3.4.2.4. Mechanical properties measured by AFM.** The Young's moduli of both Na-alginate and Ca-alginate microparticles are measured by AFM (Fig. 14 (a)). All measurements are performed under the same force of  $0.4 \text{ nN}$ , an approach velocity of  $2 \mu\text{m/s}$  and a  $z$  length of  $1 \mu\text{m}$ . An  $8 \times 8$  force curve grid (points  $2.5 \mu\text{m}$  apart) is acquired in the center of the microparticle (Fig. 14 (b)). Each point is measured 5 times to obtain 5 force curves/point.

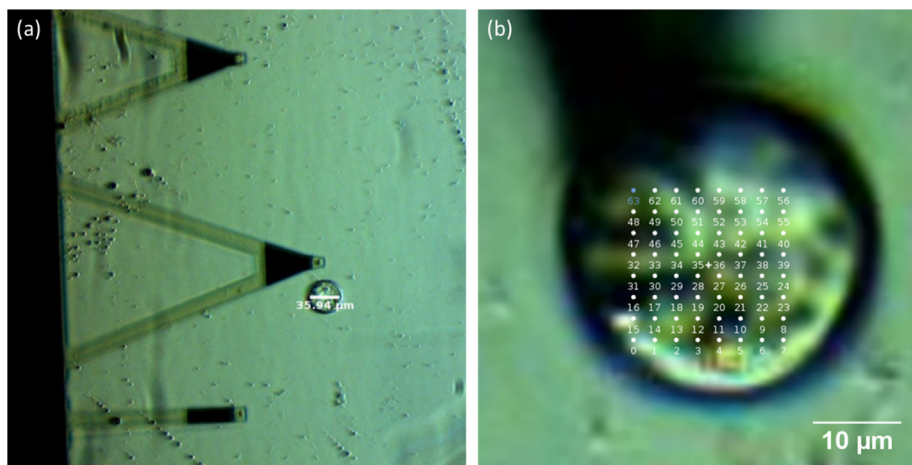
An example of a force curve is shown in Fig. 15. The vertical deflection of the cantilever, proportional to the force, depends on the distance between AFM probe and microparticle surface. During measurement, the AFM probe indents about  $320 \text{ nm}$  on the surface (Fig. 15), less than 1% of the diameter of Ca-alginate microparticles ( $35 \mu\text{m}$ ). Thus, the Young's modulus is measured at the microparticle surface.

Furthermore, we find that the Young's modulus of Na-alginate microparticles is of the order of MPa, whereas the Young's modulus of Ca-alginate microparticles is  $47 \pm 43 \text{ kPa}$ . Obviously, there is a significant decrease in Young's modulus from Na-alginate microparticles to Ca-alginate microparticles. This is due to the swelling observed during the gelation process when Na-alginate microparticles are immersed in  $\text{CaCl}_2$  solution. Consequently, Ca-alginate microparticles contain more water than Na-alginate microparticles, reducing the Young's modulus.

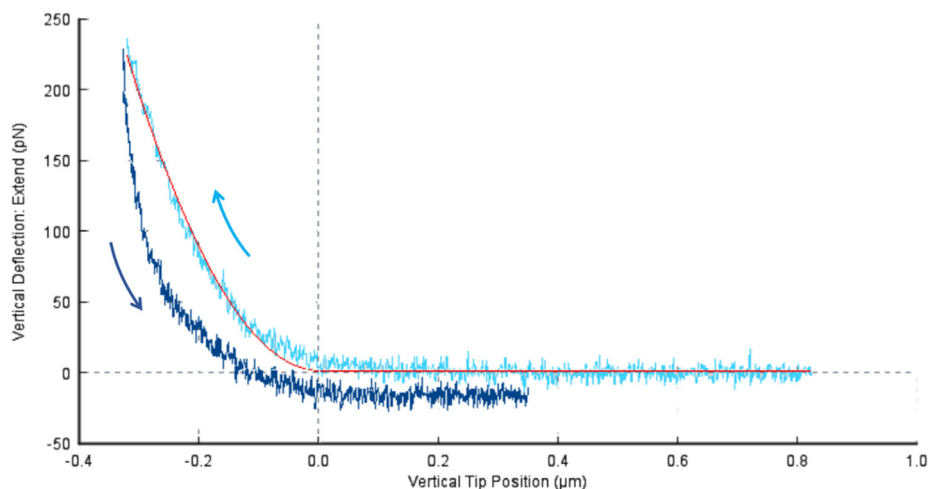
Moreover, the Young's modulus of Ca-alginate microparticles ( $47 \pm 43 \text{ kPa}$ ) is of the same order as that of RBCs ( $26 \pm 7 \text{ kPa}$ ),

where a similar indentation of  $200 \text{ nm}$  was reported using a similar AFM probe. (Dulińska et al., 2006) It should be noted that larger Young's modulus values have been found in pathological RBCs (e.g.  $90 \pm 20 \text{ kPa}$  for erythrocytes with G6PD deficiency) (Dulińska et al., 2006) and in RBCs that have undergone specific treatments (e.g.  $191 \pm 28 \text{ kPa}$  for formalin-treated cells) (Girasole et al., 2012). Nevertheless, the Young's modulus of Na-alginate microparticles ( $\sim\text{MPa}$ ) remains beyond the latter range. Gelation can therefore be considered a key step in producing microparticles with mechanical properties close to those of RBCs.

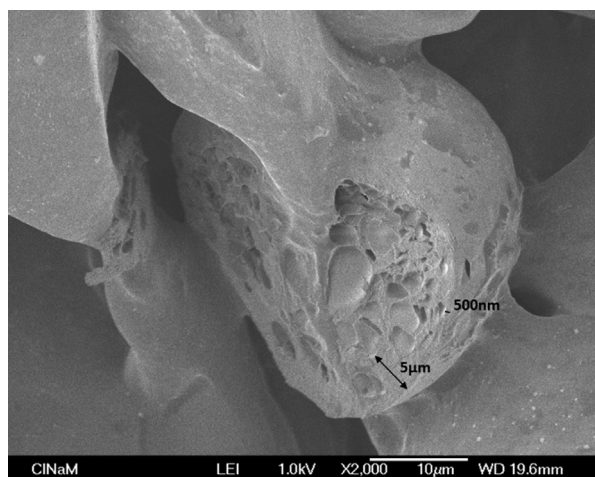
On the other hand, we also find that the Young's modulus varies substantially depending on the measuring point on the microparticle surface (Fig. S9 in the supplementary material). Moreover, this variation also depends on the individual microparticle, even though all are prepared in the same way and come from the same experimental batch. This is actually reflected by the relatively high standard deviation in results ( $E = 47 \pm 43 \text{ kPa}$ ). Surface irregularities can lead to Young's modulus variations; however here, the surface of both Na-alginate and Ca-alginate microparticles is smooth according to SEM photographs (Fig. 11). Thus, it may be reasonable to attribute the variation to the microparticles' porous inner structure (Figs. 12 and 16). As shown in Fig. 16, the thickness of the shell, defined as the space between the surface and the closest inner pore of the microparticle, varies greatly. Because of the heterogeneity of the porous inner structure, this thickness can be of the same order ( $500 \text{ nm}$ ) as the indentation of the cantilever probe ( $320 \text{ nm}$ ), or larger (in  $\mu\text{m}$  range). Consequently, the varying Young's moduli measured may be the result of varying shell thickness. However, further investigations would be required to validate this explanation.



**Fig. 14.** Image of (a) the cantilever used for the force measurement by AFM and a Ca-alginate microparticle in water ( $C_i = 0.25 \text{ wt}\%$ , **DMC flow rate** =  $0.15 \mu\text{L/s}$ ,  $k = 50$ ,  $L = 19 \text{ cm}$  and  $[\text{CaCl}_2] = 0.5 \text{ wt}\%$ ) and (b) an example of a force curve grid on a Ca-alginate microparticle, acquired during the experiment using an inverted optical microscope coupled with AFM.



**Fig. 15.** Example of a force curve on a Ca-alginate microparticle: curves relative to cantilever approach and retraction, indicated by arrows, are respectively in light and dark blue; the Hertz Model fit is in red. Zero vertical position shows the point of contact between cantilever and microparticle where no force is applied and the distance between cantilever and sample surface is zero. The negative values of the abscissa, in absolute value, are the indentation, which is the bead surface deformation. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



**Fig. 16.** SEM photograph of the inner structure of a Ca-alginate microparticle.

#### 4. Conclusions and perspectives

In this article, we present a microfluidic method of producing monodispersed hydrogel microparticles of Na-/Ca-alginate with controllable sizes (micrometer range) and mechanical properties without using surfactant. Here, our ultimate aim was to produce microparticles that mimic red blood cells (RBCs). *Ex situ* gelation, used for the transformation from Na-alginate to Ca-alginate microparticles, proves key to obtaining the desired microparticle properties, such as insolubility in water and RBC-like mechanical properties. For both Na-alginate and Ca-alginate microparticles, a smooth surface and a porous inner structure are observed under a scanning electron microscope. A platform of microgrippers was successfully developed to manipulate the microparticles. The Young's modulus, measured using an atomic force microscope on the surface of the Ca-alginate microparticles generated, is of the same order as that of RBCs. Combined with size control to micrometer range, this confirms the feasibility of using Ca-alginate microparticles to mimic RBCs and subsequently study the aggregation of RBCs under *in vivo* and *in situ* flow conditions with ultrasonic imaging. Moreover, we describe a simple method of separating Na-alginate and Ca-alginate microparticles from solution by gentle drying at room temperature.

Interesting future perspectives include studying parameters such as the concentration of  $\text{CaCl}_2$  and pH, to determine whether they have an impact on the mechanical properties of Ca-alginate microparticles. This would lead to better understanding and control of microparticle mechanical properties.

#### Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Acknowledgements

First, we are grateful to ANR CUMBA (ANR-15-CE19-0017-03) for its financial support of this work and LABEX Mécanique et Compléxité (Aix-Marseille Université) for financial support of the microgrippers. Second, we would like to thank Michel Maton (Alliance Gums and Industries) for his kind provision of sodium alginate. Third, we are also grateful to Mehdi Lagaize for providing technical support for these experiments and Cecilia Colomes for experimental assistance during her graduate training period. Last but not least, we thank Marjorie Sweetko for English revision.

#### Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ces.2019.115322>.

#### References

- Dulińska, I., Targosz, M., Strojny, W., Lekka, M., Czuba, P., Balwierz, W., Szymoński, M., 2006. Stiffness of normal and pathological erythrocytes studied by means of atomic force microscopy. *J. Biochem. Biophys. Methods* 66, 1–11.
- Freitas, S., Merkle, H.P., Gander, B., 2005. Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. *J. Control. Release* 102, 313–332.
- Girasole, M., Dinarelli, S., Boumis, G., 2012. Structure and function in native and pathological erythrocytes: A quantitative view from the nanoscale. *Micron* 43, 1273–1286.
- Häti, A.G., Bassett, D.C., Ribe, J.M., Sikorski, P., Weitz, D.A., Stokke, B.T., 2016. Versatile, cell and chip friendly method to gel alginate in microfluidic devices. *Lab Chip* 16, 3718–3727.
- Ildelfonso, M., Candoni, N., Veessler, S., 2012. A cheap, easy microfluidic crystallization device ensuring universal solvent compatibility. *Org. Process Res. Dev.* 16, 556–560.



- Lee, K.Y., Mooney, D.J., 2012. Alginate: Properties and biomedical applications. *Prog. Polym. Sci.* 37, 106–126.
- Lee, K.Y., Yuk, S.H., 2007. Polymeric protein delivery systems. *Prog. Polym. Sci.* 32, 669–697.
- Monchy, R.D., Rouyer, J., Destrempe, F., Chayer, B., Cloutier, G., Franceschini, E., 2018. Estimation of polydispersity in aggregating red blood cells by quantitative ultrasound backscatter analysis. *J. Acoust. Soc. Am.* 143, 2207–2216.
- Ouwerx, C., Velings, N., Mestdagh, M.M., Axelos, M.A.V., 1998. Physico-chemical properties and rheology of alginate gel beads formed with various divalent cations. *Polym. Gels Netw.* 6, 393–408.
- Pittermannová, A., Ruberová, Z., Zdražil, A., Bremond, N., Bibette, J., Štěpánek, F., 2016. Microfluidic fabrication of composite hydrogel microparticles in the size range of blood cells. *RSC Adv.* 6, 103532–103540.
- Rondeau, E., Cooper-White, J.J., 2008. Biopolymer microparticle and nanoparticle formation within a microfluidic device. *Langmuir* 24, 6937–6945.
- Stephenson, R., Stuart, J., 1986. Mutual binary solubilities: water-alcohols and water-esters. *J. Chem. Eng. Data* 31, 56–70.
- Sugaya, S., Yamada, M., Hori, A., Seki, M., 2013. Microfluidic production of single micrometer-sized hydrogel beads utilizing droplet dissolution in a polar solvent. *Biomicrofluidics*, 54120.
- Utech, S., Prodanovic, R., Mao, A.S., Ostafe, R., Mooney, D.J., Weitz, D.A., 2015. Microfluidic generation of monodisperse, structurally homogeneous alginate microgels for cell encapsulation and 3D cell culture. *Adv. Healthcare Mater.* 4, 1628–1633.
- Yamada, M., Sugaya, S., Naganuma, Y., Seki, M., 2012. Microfluidic synthesis of chemically and physically anisotropic hydrogel microfibers for guided cell growth and networking. *Soft Matter* 8, 3122–3130.
- Yang, J., Katagiri, D., Mao, S., Zeng, H., Nakajima, H., Uchiyama, K., 2015. Generation of controlled monodisperse porous polymer particles by dipped inkjet injection. *RSC Adv.* 5, 7297–7303.
- Zhang, H., Tumarkin, E., Sullan, R.M.A., Walker, G.C., Kumacheva, E., 2007. Exploring microfluidic routes to microgels of biological polymers. *Macromol. Rapid Commun.* 28, 527–538.
- Zhang, S., Guivier-Curien, C., Veesler, S., Candoni, N., 2015. Prediction of sizes and frequencies of nanoliter-sized droplets in cylindrical T-junction microfluidics. *Chem. Eng. Sci.* 138, 128–139.