



HAL
open science

Système microfluidique pour le contrôle et l'optimisation de l'encapsulation de cellules pour la thérapie du diabète

Claire Authesserre

► To cite this version:

Claire Authesserre. Système microfluidique pour le contrôle et l'optimisation de l'encapsulation de cellules pour la thérapie du diabète. Alimentation et Nutrition. Université Grenoble Alpes, 2016. Français. NNT : 2016GREAS017 . tel-02628493

HAL Id: tel-02628493

<https://theses.hal.science/tel-02628493>

Submitted on 26 May 2020

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **BIS – Biotechnologie, instrumentation, signal et imagerie pour la biologie, la médecine et l'environnement**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Claire AUTHESSERRE

Thèse dirigée par **Pierre-Yves BENHAMOU**
et encadrée par **Florence RIVERA**

préparée au sein du **Laboratoire CEA LETI/DTBS/SBSC/LBCP**
dans l'**École Doctorale EDISCE**

Système microfluidique pour le contrôle et l'optimisation de l'encapsulation de cellules pour la thérapie du diabète

Thèse soutenue publiquement le **18 Novembre 2016**,
devant le jury composé de :

Mr Jean-Christophe BARET

Professeur, Centre de Recherche Paul Pascal, Président du jury

Mme Marie-Caroline JULLIEN

Chargé de recherche CNRS, ESPCI, Rapporteur

Mr Thomas CUBAUD

Associate Professor, Stony Brook University, Rapporteur

Mr Jean-Luc ACHARD

Directeur de recherche CNRS, Université Grenoble Alpes, Examineur

Mme Florence RIVERA

Docteur, CEA LETI, Encadrante de thèse

Mr Pierre-Yves BENHAMOU

Professeur, Université et CHU Grenoble Alpes, Directeur de thèse



Remerciements

*A ma famille,
à ma grand-mère, Manou,*

Résumé

La transplantation de microcapsules contenant des îlots de Langerhans, amas de cellules pancréatiques régulant la glycémie, montre des résultats prometteurs dans le traitement du diabète de type 1. A l'heure actuelle, il existe encore de nombreux challenges pour augmenter la durabilité d'une greffe fonctionnelle. Le manque de standardisation des technologies d'encapsulation actuelles a suscité un intérêt pour les technologies d'encapsulation microfluidique permettant d'apporter précision et automatisation. Cette thèse s'est attachée à faire progresser deux points de limitations actuelles de ces techniques : la productivité du système et l'état de surface des capsules obtenues.

Dans la première partie, nous nous sommes concentrés sur la caractérisation d'un système microfluidique de génération de gouttes à focalisation d'écoulement (MFFD), contrôlé en pression. Des modèles analytiques et numériques ont été développés afin de déterminer les écoulements dans le système. Ensuite, la formation de gouttes a été caractérisée en fonction des paramètres d'entrée du système. Cette étude a abouti à l'obtention de lois permettant de prédire ces paramètres d'entrée afin d'optimiser la fréquence de production de microcapsules d'alginate.

Dans la deuxième partie, nous avons développé un système microfluidique permettant de former des capsules de type cœur-couche, afin d'optimiser l'état de surface des capsules. Des premiers essais d'encapsulation d'îlots de Langerhans ont montré le potentiel de ce système dans la minimisation d'une réaction immunitaire vis-à-vis de ces capsules.

Ce travail est un premier pas vers l'optimisation du système d'encapsulation, qui à terme, permettra de fournir aux cliniciens des capsules répondant à tous les critères exigés pour la transplantation.

Mots clés : microfluidique, gouttes, fluides complexes, modélisation, encapsulation, diabète

Abstract

Transplantation of microcapsules containing pancreatic islets, cell clusters regulating blood sugar, show promising results for type 1 diabetes therapy. However, many challenges remain to improve long-term graft functionality. The lack of standardization of current encapsulation technologies has aroused interest in microfluidic systems that enable more precision and automation.

This thesis focuses on two of the current encapsulation technologies stakes: improving system productivity and microcapsules surface.

In the first part of this thesis, we characterized a pressure-driven microfluidic flow focusing device (MFFD) droplet generation system. Analytical and numerical models were developed in order to determine and predict flow rates. Droplet formation was characterized as a function of the system input parameters. This study led to scaling laws enabling to predict these system input parameters in order to optimize alginate microcapsules production frequency.

In the second part of this thesis, a microfluidic system enabling the production of core-shell microcapsules was developed. First experiments of pancreatic islets encapsulation have shown the ability of this system to minimize the immune reaction towards these capsules.

This work is a first step towards encapsulation system optimization, which eventually, may provide capsules that meet all the capsule requirements for transplantation.

Key words : microfluidics, droplets, complex fluids, modeling, encapsulation, diabetes

Abbréviations et symboles

Liste des abbréviations

AC	Acétate de calcium
AFM	<i>Atomic Force Microscope</i> = Microscope à force atomique
AO	Acide oléique
CV	Coefficient de variation (caractérisation de la polydispersité)
E	Module d'Young
EU	<i>Endotoxin Unit</i> = unité utilisée pour exprimer la concentration d'endotoxines
FDTS	perFluoroDecylTrichloroSilane : $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_7(\text{CH}_2)_2\text{SiCl}_3$
G	acide α -L-guluronique (un des deux monomères de l'alginate)
HEPES	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HG	<i>High-G</i> = alginate à forte proportion de monomères G (>60%)
HP	Huile de paraffine
HS	Huile de soja
IEQ	Ilots équivalents
IG	<i>Intermediate-G</i> = alginate à proportion intermédiaire de monomères G (40-60%)
LG	<i>Low-G</i> = alginate à faible proportion de monomères G (<40%)
M	acide β -D-manuronique (un des deux monomères de l'alginate)
MEB	Microscope Electronique à Balayage
MFFD	<i>Microfluidic Flow Focusing Device</i> = Dispositif microfluidique à focalisation d'écoulement
N1	Premières contraintes normales
PDMS	PolyDiMethylSiloxane
PIV	<i>Particle Image Velocimetry</i> = Velocimétrie par images de particules
ToF-SIMS	<i>Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectroscopy</i> = Spectrométrie de masse d'ions secondaires à temps de vol

Liste des symboles

<i>aval (indice)</i>	Relatif au canal dans lequel co-écoule les phases continue et pré-gélifiante
<i>c</i>	concentration
<i>c (indice)</i>	Relatif à la phase continue
<i>Ca</i>	Nombre capillaire
<i>d</i>	Profondeur d'un canal
<i>d (indice)</i>	Relatif à la phase dispersée
<i>D</i>	Diamètre d'une goutte
<i>f</i>	Fréquence de production de gouttes
<i>G*</i>	Module viscoélastique complexe
<i>G'</i>	Module élastique
<i>G''</i>	Module visqueux
<i>hAC (indice)</i>	Relatif à l'huile pré-gélifiante
<i>L</i>	Longueur d'un canal

Abréviations et symboles

m	Masse
M_v	Masse volumique
λ	Taux de cisaillement de transition entre les régimes Newtonien et non-Newtonien
η	Viscosité dynamique (Pa.s)
$[\eta]$	Viscosité intrinsèque (mL/g)
γ	Tension interfaciale (mN/m)
$\dot{\gamma}$	Taux de cisaillement (s^{-1})
P	Pression
Q	Débit
r	Rayon d'une conduite cylindrique
R	Résistance hydraulique d'un canal
ρ	Densité
Re	Nombre de Reynolds
S_x	Sensibilité du modèle à la variable X
T	Température ($^{\circ}C$)
τ	Temps de relaxation du polymère
U	Vitesse d'un fluide
V	Volume d'une goutte
w	Largeur d'un canal
We	Nombre de Weber

Table des matières

Abbréviations et symboles.....	9
Table des matières.....	11
Introduction générale.....	15
Chapitre 1 Thérapie cellulaire du diabète et encapsulation : état de l'art et challenges actuels	23
1.1 Thérapie cellulaire et microencapsulation.....	25
1.2 Matériaux utilisés pour l'encapsulation cellulaire	34
1.3 Techniques de microencapsulation cellulaire	43
1.4 Bilan et choix pour la thèse.....	53
Chapitre 2 Matériels et méthodes	55
2.1 Systèmes microfluidiques et banc expérimental	57
2.2 Préparation des phases utilisées	62
2.3 Caractérisation des propriétés physico-chimiques des solutions.....	63
2.4 Caractérisation des écoulements.....	65
2.5 Caractérisation des gouttes et capsules	69
2.6 Encapsulation cellulaire	70
PARTIE I CONTROLE DE LA TAILLE ET OPTIMISATION DE LA FREQUENCE DE PRODUCTION DES CAPSULES	73
Chapitre 3 Etat de l'art sur la formation de gouttes en MFFD, positionnement et démarche de l'étude	75
3.1 Etat de l'art sur la formation de gouttes en MFFD.....	77
3.2 Positionnement et démarche de l'étude.....	95

Chapitre 4 Caractérisation physico-chimique des phases dispersées et continues.....	103
4.1 Rhéologie de la phase dispersée.....	105
4.2 Viscosité de la phase continue et tension interfaciale.....	115
4.3 Viscosité de la phase pré-gélifiante	117
4.4 Bilan.....	117
Chapitre 5 Caractérisation et modélisation des écoulements.....	119
5.1 Caractérisation et modélisation du débit de la phase continue.....	122
5.2 Caractérisation et modélisation du débit de la phase dispersée.....	131
5.3 Conclusions et discussion.....	132
Chapitre 6 Etude de la taille et de la fréquence de production de gouttes en MFFD....	133
6.1 Etude préliminaire : formation d'une goutte et taux de cisaillement	136
6.2 Transition reflux/ <i>dripping</i>	140
6.3 Présentation des expériences de caractérisation du <i>dripping</i>	142
6.4 Caractérisation de la taille et de la fréquence de production des gouttes.....	143
6.5 Transition <i>dripping/jetting</i> et optimisation de la fréquence de production.....	156
6.6 Conclusions et discussion.....	158
6.7 Bilan sur le régime de <i>dripping</i>	159
Chapitre 7 Optimisation de la fréquence et prédiction des paramètres d'entrée du système	161
PARTIE II OPTIMISATION DE LA SURFACE DES CASPULES	165
Chapitre 8 Développement d'un système microfluidique d'encapsulation multicouche ..	167
8.1 Techniques d'encapsulation multicouche	169
8.2 Présentation des expériences.....	177
8.3 Régime de formation de gouttes multicouches.....	177
8.4 Confidentiel.....	177
8.5 Fréquence de production des gouttes multicouches	177
8.6 Caractérisation des capsules multicouches	177

8.7 Conclusions et perspectives	178
8.8 Premiers essais d'encapsulation d'îlots de Langerhans humains	178
Conclusion générale	181
Annexe 1 : Proceedings NanoTech 2016	189
Annexe 2 : Proceedings MicroTas 2016.....	191
References	193

INTRODUCTION GENERALE

Le diabète est une des plus grandes crises de santé mondiale. Selon la Fédération Internationale du Diabète, cette maladie toucherait actuellement plus de 400 millions de personnes à travers le monde (1 adulte sur 11). Ce nombre est en constante augmentation et atteindrait les 600 millions d'ici 2040. Cette maladie chronique survient lorsque l'organisme n'est plus capable de réguler le taux de glucose du sang, appelé glycémie. Celle-ci est normalement régulée par une hormone, l'insuline, produite par les cellules β contenues dans des amas de cellules pancréatiques appelés îlots de Langerhans. Le diabète survient soit lorsque la personne ne produit pas suffisamment d'insuline (diabète de type 1), soit lorsque son organisme ne réagit pas correctement à l'insuline (diabète de type 2).

Le diabète de type 1, aussi appelé diabète insulino-dépendant, touche environ 10% de la population diabétique et notamment les enfants et jeunes adultes. Ce type de diabète est une maladie auto-immune au cours de laquelle le système immunitaire du malade détruit les cellules β produisant l'insuline. La très faible quantité voire l'absence d'insuline entraîne alors une forte augmentation du taux de glucose dans le sang (hyperglycémie) pouvant engendrer des complications invalidantes et potentiellement mortelles. Les patients diabétiques de type 1 sont traités par des injections pluriquotidiennes d'insuline exogène. Ce traitement permet de réguler la glycémie à long terme et de réduire certains effets néfastes du diabète. Cependant, ces injections ne permettent pas une régulation aussi fine et rapide que celle réalisée par les cellules β et n'empêchent donc pas les pics d'hyperglycémie ou d'hypoglycémie pouvant entraîner le décès du patient.

La thérapie cellulaire présente aujourd'hui une alternative thérapeutique pour ce type de diabète. Elle consiste à implanter des cellules vivantes chez un patient afin de remplacer les cellules déficientes. Dans le cas du traitement de diabète, des îlots de Langerhans sont isolés du pancréas d'un donneur en état de mort cérébrale et sont transplantés chez le patient diabétique, le plus souvent au niveau du foie par cathétérisme de la veine porte. Ce traitement a montré des résultats prometteurs dans la régulation de la glycémie et la prévention des hypoglycémies sévères. Cependant, il nécessite l'utilisation de traitements immunosuppresseurs pouvant engendrer de graves effets secondaires.

Depuis quelques années, les recherches se sont orientées vers un traitement alternatif : la transplantation d'îlots encapsulés. Le principe de **l'encapsulation cellulaire** est de s'affranchir des traitements immunosuppresseurs en protégeant physiquement les cellules implantées des attaques du système immunitaire du patient, on parle d'**immunoprotection**. Parmi les différentes méthodes d'encapsulation, **la microencapsulation**, consistant à encapsuler les cellules dans une capsule de polymère poreuse de taille submillimétrique, semble la plus performante.

Les résultats des essais de transplantation *in-vivo* d'îlots microencapsulés sont très encourageants. Cependant, les résultats montrent un manque d'oxygénation des îlots, le développement de fibrose et une perte de stabilité mécanique des capsules limitant la fonctionnalité et la durée de vie de la greffe. Cela pourrait être amélioré notamment en réduisant la taille des capsules, en augmentant leur résistance mécanique et en optimisant leur état de surface. Ces essais cliniques soulignent également le manque de

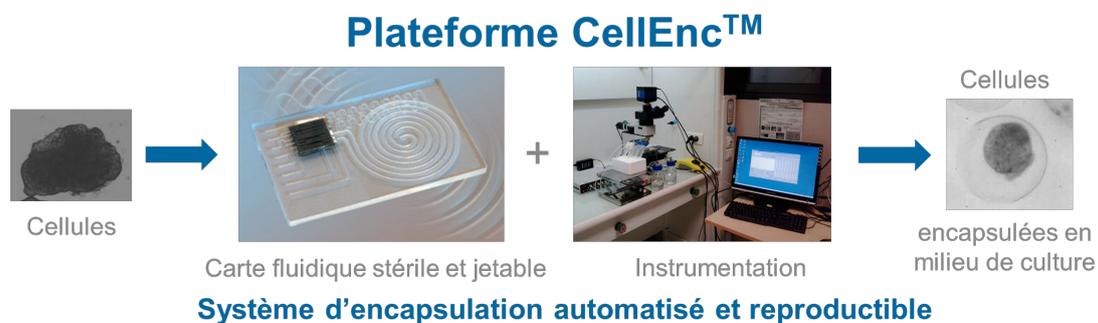
reproductibilité des capsules et de standardisation des procédés. Les développements actuels concernent donc à la fois le matériau et la technique d'encapsulation.

L'alginate est actuellement le polymère le plus utilisé pour l'encapsulation de cellules. Toutefois, il semble difficile de répondre à tous les critères de biocompatibilité, à la fois vis-à-vis des cellules encapsulées et vis-à-vis du milieu dans lequel les capsules sont implantées, en utilisant un seul polymère. Les recherches s'orientent désormais vers la fabrication de capsules « multicouches » composées d'un polymère au centre de la capsule contenant les cellules et d'un polymère en surface, sans cellules, au contact du milieu externe.

En ce qui concerne les techniques d'encapsulation, les méthodes actuelles consistent en un goutte à goutte de solution d'alginate contenant les cellules, tombant dans une solution aqueuse de calcium qui les gélifie. L'inconvénient majeur de ces techniques est la gamme de fonctionnement en termes de taille (>300-500 μm) et de viscosité du matériau (<500 mPa.s). Elles ne permettent pas de réduire la taille des capsules (<200 μm) et encore moins en augmentant la viscosité du matériau, ce qui serait plus favorable pour l'obtention de capsules résistantes mécaniquement. D'autre part, les capsules obtenues après un certain temps de récolte sont ensuite rincées puis transférées manuellement en sérum physiologique ou en milieu de culture. Les capsules présentent donc des temps de gélification variables et sont donc peu reproductibles au sein d'un même lot.

Depuis les années 2000, l'utilisation de la microfluidique pour l'encapsulation de cellules est en plein essor. **La microfluidique** est la science et la technologie de la manipulation des fluides dans des microcanaux (canaux dont au moins une des dimensions est de l'ordre du micromètre). Les dispositifs développés permettent de générer des capsules de taille adaptée à l'encapsulation pour la thérapie cellulaire (<200 μm), quelle que soit la viscosité du matériau d'encapsulation. La microfluidique offre également la possibilité de manipuler les capsules sans intervention manuelle, et ainsi d'automatiser l'enchaînement d'étapes et obtenir des capsules reproductibles.

Au sein du laboratoire, une plateforme microfluidique d'encapsulation automatisée de cellules, appelée carte CellEnc™, a été développée notamment dans le cadre des thèses de S. Le Vot [1] et de P. Dalle [2]. Elle permet, à partir de cellules préalablement mélangées à l'alginate, de produire des cellules encapsulées et de les récolter en solution physiologique ou milieu de culture, de façon automatique et reproductible.



Pour cela, les gouttes d'alginate contenant les cellules sont formées en flux d'huile de soja par une géométrie à focalisation d'écoulement (« *Microfluidic Flow Focusing Device* » : MFFD). Les gouttes sont ensuite pré-gélifiées en phase d'huile (méthode proposée par Kumacheva *et al.* [3]) puis transférées vers

une solution aqueuse de calcium (Ca^{2+}) pour compléter leur gélification. Les capsules sont ensuite transférées en sérum physiologique. L'automatisation de l'enchaînement des étapes est réalisée grâce à deux modules de transfert de phase faisant l'objet d'un brevet (FR 09 02988). Ces modules permettent de contrôler la gélification des gouttes d'alginate et de s'affranchir des transferts manuels, résultant alors dans l'obtention de capsules reproductibles.

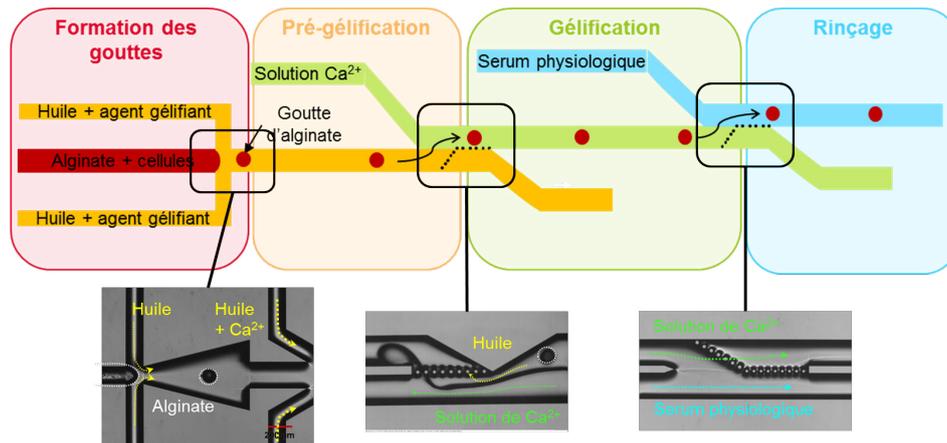


Figure 1-1: Principe de fonctionnement de la carte CellEnc™

Ce système est à notre connaissance le seul système d'encapsulation automatisant toutes les étapes de formation, gélification et transfert en solution physiologique.

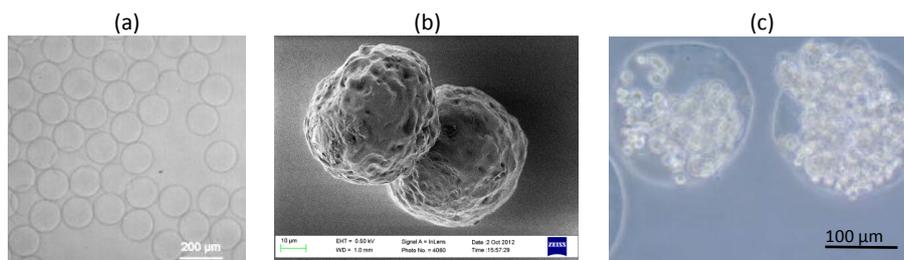


Figure 1-2: Capsules obtenues en sortie de la carte CellEnc™ : les capsules sont monodisperses (a) mais sont cabossées (b) et présentent parfois des protrusions (c). Observations au microscope optique (a,c) et au MEB (b).

Ce système est généralement utilisé avec de l'alginate ultra-pur de forte viscosité (Pronova SLG100 à 3% wt/wt). En sortie du système, les capsules obtenues ont une taille d'environ 150-200 μm et sont monodisperses ($\text{CV} < 3\%$) (Figure 1-2, a, b). Ce procédé d'encapsulation est biocompatible puisque la viabilité est supérieure à 85% jusqu'à au moins 7 jours après encapsulation (dans le cas de fibroblastes 3T3) (Figure 1-3, a). D'autre part, des résultats d'implantation de ces capsules chez la souris ont montré que celles-ci étaient stables mécaniquement pendant au moins 4 semaines [2] (Figure 1-3, b).

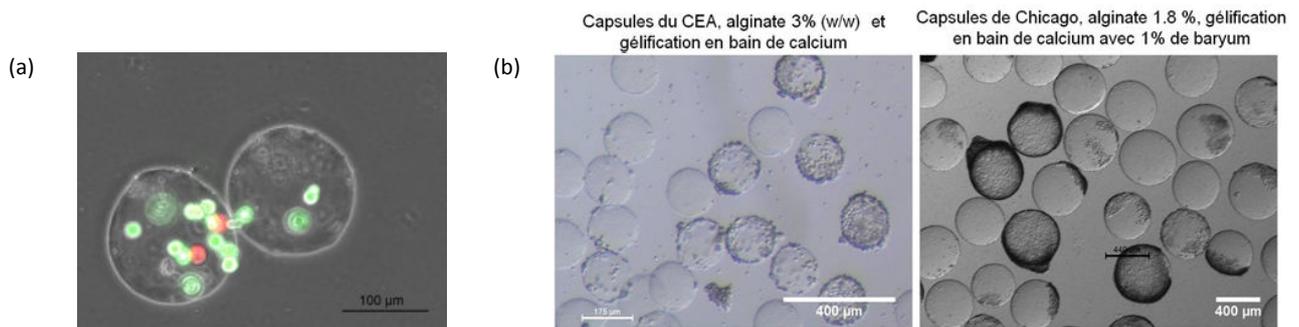


Figure 1-3 : Biocompatibilité des capsules produites par la carte CellEnc™ : (a) Encapsulation de fibroblastes 3T3 : les tests de viabilité cellulaire montrent une viabilité >85%. Marquage FDA/PI. ; (b) Capsules récupérées 4 semaines après implantation chez la souris : les capsules sont intègres et n'induisent pas plus de réaction immunitaire que les capsules de référence produites par extrusion et gélifiées avec 1% de Baryum.

Un des points restant à améliorer est la productivité du système. En effet, le système d'encapsulation doit permettre une production d'environ 11 000 capsules par kg de patient en moins de deux heures. La productivité maximale obtenue avec la carte CellEnc™ en utilisant de l'alginate SLG100 à 3% wt/wt est d'environ 500 capsules/min. Cela nécessite alors une production de capsules pendant environ 25 heures pour atteindre les quantités requises pour un patient de 70 kg. Cette durée est 10 fois trop importante pour que ce système soit utilisé en clinique.

D'autre part, les capsules obtenues sont relativement cabossées (Figure 1-2, c) et présentent parfois des protrusions (Figure 1-2, d) ce qui pourrait entraîner une réaction du système immunitaire lors de l'implantation. Les études ont montré que l'encapsulation multicouche permettrait de pallier ces inconvénients (voir 1.2.3).

Les objectifs de cette thèse sont donc :

- 1) de déterminer les paramètres contrôlant la taille des gouttes et leur fréquence de production dans un système microfluidique de type MFFD, afin d'optimiser la productivité du système pour une taille donnée de capsule.
- 2) d'**optimiser l'état de surface des capsules** obtenues en développant un système d'encapsulation multicouche intégré en microfluidique.

La thèse se concentre donc sur l'optimisation de la technique d'encapsulation, et non sur le matériau employé.

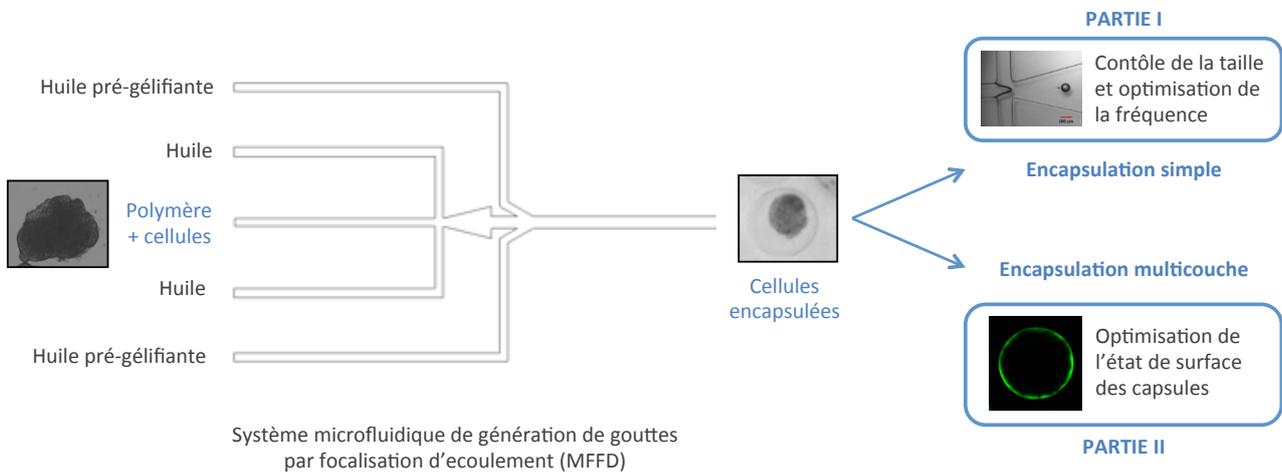
Le manuscrit s'organise comme suit :

- Le **chapitre 1** présente plus en détail les avancées actuelles sur la thérapie cellulaire du diabète et l'encapsulation introduites ici, en mettant en avant l'avantage de la microfluidique. Il énonce également les choix qui en découlent concernant les matériaux et les systèmes utilisés au cours de cette thèse.
- Le **chapitre 2** décrit le matériel utilisé, les protocoles de préparation des solutions ainsi que les méthodes mises en œuvre tout au long de la thèse pour répondre aux objectifs.

Les résultats sont ensuite présentés en deux parties correspondant aux deux objectifs de la thèse :

- La **partie I** se focalise sur le contrôle de la taille et l'optimisation de la fréquence de production des capsules. Cette partie est constituée des **chapitres 3 à 7**, constituant chacun une étape de la démarche de cette étude.
- La **partie II** se concentre sur le développement d'un système d'encapsulation multicouche afin d'optimiser l'état de surface des capsules. Elle est constituée par le **chapitre 8**.

Les compréhensions et développements résultant de cette thèse contribueront à l'optimisation de la plateforme microfluidique CellEnc™ afin de fournir aux cliniciens un système répondant à tous les critères exigés pour la transplantation de cellules encapsulées d'une part en termes de taille, sphéricité, état de surface, propriétés mécaniques et reproductibilité et d'autre part en termes de fréquence de production.



OPTIMISATION DE L'ENCAPSULATION CELLULAIRE EN MICROFLUIDIQUE

Chapitre 1

THERAPIE CELLULAIRE DU DIABETE ET ENCAPSULATION : ETAT DE L'ART ET CHALLENGES ACTUELS

1.1	Thérapie cellulaire et microencapsulation	25
1.1.1	La thérapie cellulaire du diabète de type 1	25
1.1.2	Principe et avantages de l'encapsulation cellulaire	27
1.1.3	Propriétés des microcapsules et critères pour l'encapsulation	30
1.1.4	Résultats cliniques d'implantation <i>in-vivo</i> de cellules microencapsulées	33
1.2	Matériaux utilisés pour l'encapsulation cellulaire	34
1.2.1	Polymères utilisés pour l'encapsulation cellulaire	34
1.2.2	L'alginate	36
1.2.2.1	Composition chimique de l'alginate	36
1.2.2.2	Gélification de l'alginate	36
1.2.2.3	Propriétés physiques des gels d'alginate	37
1.2.2.4	Biocompatibilité de l'alginate	38
1.2.2.5	Choix de l'alginate et du type de gélification pour l'encapsulation de cellules	39
1.2.3	Avantages de l'encapsulation multicouche	41
1.2.3.1	Optimisation de la résistance mécanique et la perméabilité	41
1.2.3.2	Optimisation de l'état de surface	42
1.3	Techniques de microencapsulation cellulaire	43
1.3.1	Techniques classiques	43
1.3.1.1	Formation de gouttes par extrusion ou segmentation d'un jet et gélification externe	43
1.3.1.2	Formation de gouttes par émulsification et gélification interne	45
1.3.2	Techniques microfluidiques	46
1.3.2.1	Dispositifs de génération de gouttes	46
1.3.2.2	Jonction T	47
1.3.2.3	Géométrie à co-écoulement co-axial	47
1.3.2.4	Géométries à focalisation d'écoulement (« Flow Focusing Device »)	48
1.3.2.5	Intégration de la gélification en microsystème	49
1.3.2.6	Transfert en solution physiologique en microsystème	50
1.3.3	Comparaison des techniques et avantages de la microfluidique	51
1.4	Bilan et choix pour la thèse	53

1.1 Thérapie cellulaire et microencapsulation

1.1.1 La thérapie cellulaire du diabète de type 1

Actuellement, les patients diabétiques de type 1 sont traités par injections pluriquotidiennes d'insuline exogène. Ce traitement permet de réguler la glycémie à long terme et de réduire certains effets néfastes du diabète tels que la rétinopathie et la neuropathie. Cependant, ces injections ne permettent pas une régulation aussi fine et rapide que celle réalisée par les cellules β et n'empêchent donc pas les pics d'hyperglycémie ou d'hypoglycémie pouvant entraîner le décès du patient. La thérapie cellulaire présente aujourd'hui une alternative thérapeutique pour ce type de diabète [4].

La thérapie cellulaire consiste à greffer des cellules vivantes chez un patient dans le but de remplacer des cellules déficientes ou d'implanter des cellules sécrétrices de molécules d'intérêt. Les cellules implantées proviennent soit du patient (greffe autologue), soit d'un autre individu (greffe allogénique), soit d'une autre espèce (greffe xénogénique). Dans le cas d'une greffe allogénique ou xénogénique, les cellules implantées sont reconnues par le système immunitaire du receveur comme du « non soi » ce qui déclenche une réponse immunitaire entraînant un rejet de la greffe. La transplantation cellulaire est donc accompagnée de traitements immunosuppresseurs visant à réduire cette réponse immunitaire.

Dans le cas de la thérapie cellulaire du diabète, elle consiste à prélever et isoler des îlots pancréatiques chez des donneurs en état de mort cérébrale et à les implanter chez le patient diabétique, le plus souvent au niveau du foie par cathétérisme de la veine porte.

Depuis 1999, plus de 750 transplantations d'îlots ont été réalisées dans plus de 30 centres de transplantation à travers le monde, notamment grâce à la mise en place du protocole d'Edmonton en 2000 par l'équipe de Shapiro [5]. La fonctionnalité du greffon est alors évaluée par différents facteurs. L'un des meilleurs indicateurs est le taux d'insulino-indépendance, c'est-à-dire le pourcentage de patients n'ayant plus besoin d'injections d'insuline exogène pour réguler leur glycémie pendant une période définie¹. Un autre indicateur est le maintien de la production de C-peptide, qui assure une protection contre le risque d'hypoglycémie sévère, même en l'absence d'insulino-indépendance [4].

L'analyse des résultats du registre international *Collaborative Islet Transplant Registry* (CTIR) [6] indique que la greffe d'îlots permet désormais d'obtenir un taux d'insulino-indépendance de 66% à 1 an et de 44% à 3 ans (contre 10% en 1999) ainsi qu'une diminution du risque d'hypoglycémie sévère chez 90% des receveurs à 5 ans [7][6]. Bellin *et al.* [8] ont montré que l'utilisation de protocoles d'immunosuppression plus puissants permettait d'obtenir 50% d'insulino-indépendance à 5 ans².

¹ Cette période est variable selon les études (7 jours, 14 jours, 1 mois...). Il est donc important de prendre en compte la durée moyenne d'insulino-indépendance dans la comparaison des résultats concernant le taux d'insulino-indépendance.

² L'insulino-indépendance est ici définie pour une période minimale de 14 jours consécutifs. La durée moyenne d'insulino-indépendance est ici définie pour une période minimale de 14 jours consécutifs. La durée moyenne d'insulino-indépendance n'est pas précisée.

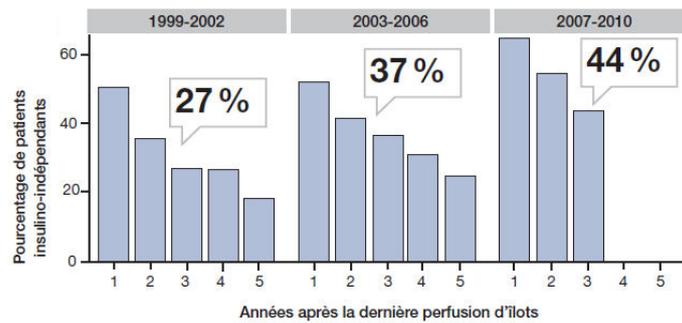


Figure 1-1 : Taux d'insulino-indépendance dans les 5 premières années suivant la dernière greffe d'îlots allogéniques en fonction de la période. Données du registre international Collaborative Islet Transplant Registry (CTIR) [6]

Des résultats plus récents du réseau GRAGIL³ [9], l'un des plus actifs au monde pour la greffe d'îlots, indiquent que 75% des patients ont connu une période d'insulino-indépendance, qui s'est maintenue pendant 5 ans chez 26% des patients⁴ avec une durée médiane d'insulino-indépendance d'environ 19 mois [10]. Même en l'absence d'insulino-indépendance, la greffe permet tout de même une réduction significative de la quantité d'insuline exogène nécessaire à la régulation de la glycémie (Figure 1-2). D'autres essais cliniques sont actuellement en cours et sont recensés dans la revue de Shapiro [11].

Ces essais cliniques ont donc démontré que la transplantation d'îlots est sûre (risque de décès extrêmement faible [7]) et permet d'améliorer la qualité de vie [12], le contrôle métabolique [6] et la prévention des hypoglycémies sévères [13][10] chez les patients diabétiques de Type 1. L'insulino-indépendance, devient désormais comparable à celle obtenue dans le cas de greffe de pancréas entier (73% d'insulino-indépendance à 1 an et 61% à 3 ans) pour laquelle le taux de mortalité est très important (20% à 5 ans) [14][15]. Les résultats de l'essai français multicentrique TRIMECO de phase III évaluant l'impact médico-économique de la transplantation d'îlots pancréatiques allogéniques en comparant son efficacité métabolique à celle de l'insulinothérapie intensive sont attendus pour 2017.

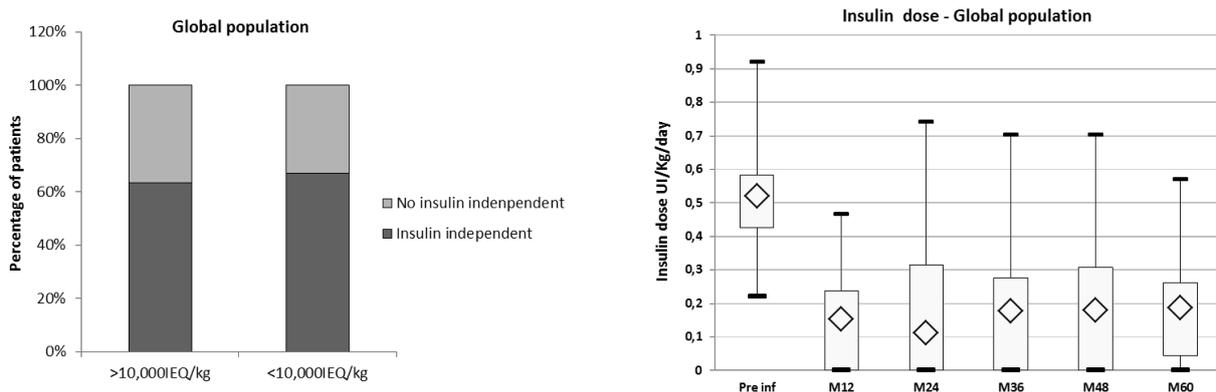


Figure 1-2: Résultats sur 5 ans de la transplantation d'îlots allogéniques obtenus par le réseau GRAGIL, publiés en 2015 [10]. (gauche) Taux d'insulino-indépendance en fonction de la quantité d'îlots transplantés (IEQ), (droite) Dose quotidienne d'insuline exogène injectée chez les patients au cours des 60 mois (M) après transplantation

³ GRAGIL : Groupe Rhin-Rhône-Alpes-Genève pour la transplantation d'îlots de Langerhans

⁴ L'insulino-indépendance est ici définie pour une période minimale de 1 mois.

La thérapie cellulaire est donc une alternative prometteuse dans le traitement du diabète de type 1. Elle montre également de belles perspectives dans le traitement d'autres maladies. Des développements sont notamment en cours pour la transplantation d'hépatocytes pour le traitement des hépatites fulminantes, de cellules souches mésenchymateuses (MSC) pour le traitement de la cirrhose et de neurones dopaminergiques pour le traitement de la maladie de Parkinson [14].

Cependant, la thérapie cellulaire présente encore plusieurs **limites et inconvénients**, notamment dans le cas de la transplantation d'îlots de Langerhans [16] :

- **la faible quantité d'îlots allogéniques disponible**

Le nombre de donneurs est faible comparé au nombre de personnes nécessitant une greffe. De plus, la quantité d'îlots requise pour une greffe (environ 11 000 IEQ⁵/kg de patient [5]) nécessite l'utilisation d'au moins deux pancréas humains. En effet, malgré l'amélioration des protocoles d'isolement, encore 50% des cellules prélevées sont perdues à cause du stress subi au cours de la préparation et de l'implantation (digestion par des enzymes et dommages mécaniques) [4][16]. Plusieurs injections (deux ou trois) sont alors effectuées à plusieurs semaines d'intervalle pour atteindre un nombre suffisant d'îlots fonctionnels transplantés [10]. La greffe d'îlots est donc actuellement réservée uniquement aux patients les plus gravement atteints.

- **l'utilisation de traitements immunosuppresseurs**

L'augmentation du taux de survie des cellules transplantées au cours de ces quinze dernières années est en partie due à l'évolution des traitements immunosuppresseurs accompagnant la greffe [8][17]. Cependant, ces traitements de plus en plus puissants peuvent engendrer de graves effets secondaires (entre autres, des infections fréquentes ou le développement de tumeurs) réduisant l'espérance de vie des patients [18]. Les résultats de 2015 du réseau GRAGIL indiquent que 66% des receveurs ont des effets secondaires dont un tiers est probablement lié à l'immunosuppression [10]. De plus, d'un point de vue économique, ces traitements sont coûteux pour l'assurance maladie.

- **le taux de survie de la greffe après transplantation**

La transplantation déclenche immédiatement une réaction inflammatoire aiguë non spécifique appelée « *Instant blood mediated inflammatory reaction* » (IBMIR) qui se caractérise par l'activation rapide des systèmes de coagulation [19]. Cela entraîne en 15 minutes la formation de caillots autour des îlots et provoque la perte des îlots [19][20]. Une partie des îlots est donc rapidement perdue à cause de cette réaction inflammatoire. A plus long terme, un nombre important d'îlots ne survit pas à la transplantation à cause d'un manque d'oxygénation (hypoxie) et d'une re-vascularisation trop lente [21]–[23].

L'encapsulation des cellules avant transplantation permettrait de pallier la plupart de ces limites.

1.1.2 Principe et avantages de l'encapsulation cellulaire

Le principe de l'encapsulation est de protéger physiquement les cellules implantées des attaques du système immunitaire du receveur en utilisant un matériau semi-perméable empêchant le passage des cellules immunitaires et des anticorps du receveur, mais permettant la diffusion des sécrétions émises par

⁵ IEQ = îlots équivalents : Les îlots étant polydispersés en taille (50 à 400 µm), la quantité d'îlots est évaluée par le nombre équivalent d'îlots de 150 µm de diamètre.

les cellules encapsulées (insuline par exemple) ainsi que des nutriments et de l’oxygène, essentiels au maintien de leur viabilité (Figure 1-3). On parle d’**immunoprotection** ou d’**immunoisolation**.

L’encapsulation permet donc de s’affranchir des traitements immunosuppresseurs. Cette protection physique contre le système immunitaire permet également de transplanter des îlots non humains (xénotransplantation), par exemple porcins, et ainsi d’augmenter les sources de cellules et de pallier le manque d’organes.

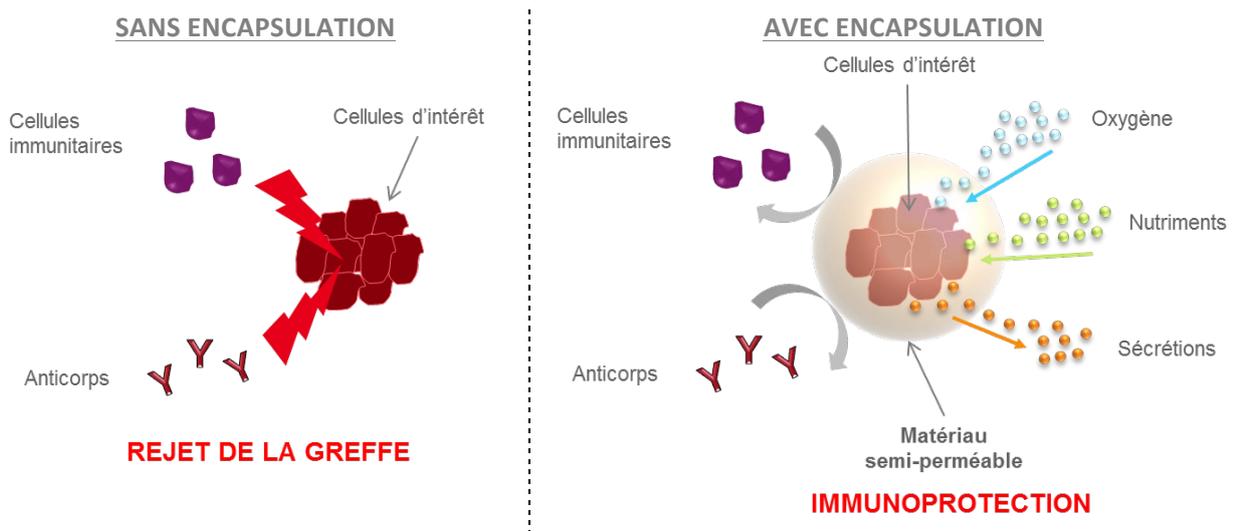


Figure 1-3: Principe et intérêt de l’encapsulation de cellules : (gauche) Sans encapsulation, les cellules implantées sont attaquées par le système immunitaire du receveur de la greffe, ce qui aboutit au rejet de la greffe. (droite) L’encapsulation des cellules dans un matériau semi-perméable permet de protéger les cellules des attaques du système immunitaire (immunoprotection), tout en laissant diffuser au travers du matériau l’oxygène, les nutriments et les sécrétions, permettant ainsi de maintenir la viabilité et la fonctionnalité des cellules encapsulées et de prolonger la survie de la greffe.

Ce concept a été introduit en 1980 par Lim et Sun pour l’encapsulation d’îlots de pancréas [24]. Depuis, la recherche s’est considérablement développée dans ce domaine comme le montre l’évolution du nombre de publications concernant l’encapsulation d’îlots de Langherans sur les 35 dernières années (Figure 1-4).



Figure 1-4: Nombre de publications par année sur l'encapsulation de cellules pour la thérapie cellulaire du diabète au cours des 35 dernières années. Résultats de la recherche « encapsulation AND islet* AND diabet* » sur Scopus.

La majorité des études d’encapsulation de cellules pour la thérapie cellulaire portent sur l’encapsulation d’îlots de Langerhans. Toutefois, des développements sont également en cours sur l’encapsulation de cellules souches [25], [26] ou d’hépatocytes et sur l’utilisation de l’encapsulation cellulaire pour le traitement du cancer [27]–[29] ou de maladies neurologiques telles que la maladie d’Alzheimer ou d’Huntington [30]–[32].

Il existe plusieurs approches d’encapsulation : la macroencapsulation, la microencapsulation et la nanoencapsulation (ou recouvrement conforme). Le Tableau 1-1 compare leurs avantages et inconvénients. La méthode d’encapsulation est d’autant plus favorable qu’elle optimise les échanges entre les cellules et le milieu extérieur. En effet, cela permet alors d’obtenir une réponse rapide aux variations de glucose et d’éviter la nécrose des îlots encapsulés.

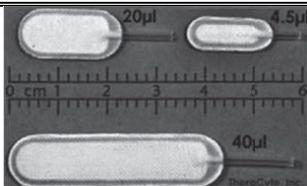
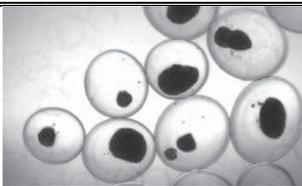
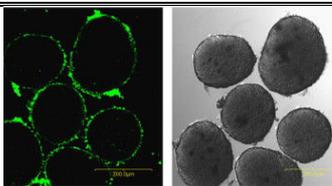
	Macroencapsulation	Microencapsulation	Nanoencapsulation ou recouvrement conforme
Principe	 <p>Chambre de taille macroscopique contenant toutes les cellules (Theracyte, Viacyte/Encaptra®, Defymed/Mailpan®, Living Cell Technologies/DiabeCell®)</p>	 <p>Capsules de polymère sphériques de taille micrométrique (<800 µm) contenant chacune une ou plusieurs cellules</p>	 <p>Recouvrement des îlots par des couches successives de polymères (PEG ou PLL, PAH, PSS,...) [33][34][35]</p>
Diffusion au travers de la capsule	<p>Faible surface d’échange, épaisseur importante de la membrane et forte densité cellulaire [36]</p> <p>—</p>	<p>+ Importante surface d’échange et faible distance [17]</p>	<p>+ Faible distance (épaisseur des couches de polymères)</p>
Volume de l’implant	<p>— Taille de l’ordre du cm</p>	<p>+ Volume raisonnable, dépendant de la taille des capsules</p>	<p>+ Volume des cellules uniquement</p>
Site d’implantation	<p>— Limité : cavité péritonéale mais mal irriguée, peu oxygénée [37] et sujette à une forte réaction immunitaire [38][39]</p>	<p>+ Autres sites plus favorables que la cavité péritonéale</p>	<p>+ Autres sites plus favorables que la cavité péritonéale [33]</p>
Stabilité de l’implant	<p>+ Forte résistance mécanique</p>	<p>+ Stabilité mécanique correcte</p>	<p>— Détérioration des dépôts après quelques jours [33]</p>
Retrait de l’implant en cas de besoin	<p>+ Facilité d’explantation et possibilité de rechargement</p>	<p>— Difficulté d’explantation</p>	<p>— Difficulté d’explantation</p>

Tableau 1-1 : Comparaison des dispositifs d’encapsulation de cellules : avantages (+) et inconvénients (—). Macroencapsulation (Theracyte), Microencapsulation (illustration [40]), Nanoencapsulation (illustration [33]).

Grâce à leurs dimensions favorisant la diffusion au travers de la capsule et permettant d’obtenir un volume raisonnable d’implant ainsi que leur stabilité mécanique, **la majorité des recherches sur l’encapsulation de cellules se porte sur les microcapsules**. Les critères auxquels doivent répondre ces microcapsules pour être biocompatibles sont développés au paragraphe suivant.

1.1.3 Propriétés des microcapsules et critères pour l'encapsulation

Les microcapsules doivent répondre à deux fonctions :

- Sécrétion d'insuline à long terme : elles doivent permettre une sécrétion d'insuline efficace à long terme (2 ans minimum) par les cellules encapsulées.
- Stabilité à long terme : elles doivent conserver leurs propriétés physiques et chimiques à long terme de façon à maintenir une immunoprotection efficace.

La biocompatibilité a été définie en 1987 par Williams comme « la capacité d'un matériau à induire une réponse appropriée de l'hôte dans une application spécifique ». Cette définition prend donc en compte uniquement l'interaction entre le matériau et le tissu environnant de l'hôte. Dans le cas de la greffe de cellules encapsulées, il est primordial de prendre également en compte l'interaction du matériau avec les cellules encapsulées. Le terme de biocompatibilité est donc ici plus large et le terme de biotolérabilité est également utilisé [41].

Les capsules doivent être biocompatibles à la fois vis-à-vis des cellules encapsulées de façon à maintenir leur viabilité et fonctionnalité et à la fois vis-à-vis du milieu dans lequel elles sont implantées pour assurer leur fonction d'immunoprotection de façon efficace et durable.

Les capsules doivent donc permettre une diffusion optimale au travers de la capsule de l'oxygène, des nutriments et des molécules sécrétées tout en empêchant le développement de réaction immunitaire. En effet, lors du déclenchement d'une réaction immunitaire, les cellules du système immunitaire sécrètent des médiateurs inflammatoires qui peuvent diffuser au travers de la capsule et qui sont toxiques pour les cellules transplantées entraînant alors la nécrose des tissus. La réaction inflammatoire se traduit aussi par la formation de tissu fibrotique à la surface des capsules, on parle de fibrose péri-capsulaire. La présence de ce tissu limite la diffusion entre le milieu extérieur et les cellules encapsulées et réduit alors l'oxygénation de la capsule et la viabilité des cellules encapsulées. Les capsules doivent donc répondre à de nombreux critères résumés dans la Figure 1-5 et explicités ci-après :

○ Une perméabilité sélective

La perméabilité des capsules est fondamentale pour la performance des capsules et la préservation de la viabilité et la fonctionnalité des cellules encapsulées. Les capsules doivent empêcher le passage des cellules immunitaires (7 μm), des anticorps ($M_w=150-900$ kDa) et des médiateurs inflammatoires (cytokines, interleukines, $\text{TNF}\alpha$, monoxyde d'azote ; $M_w=17-70$ kDa). Néanmoins, elles doivent être suffisamment perméables pour permettre une diffusion rapide de l'oxygène ($M_w=32$ Da), des nutriments tels que le glucose ($M_w=180$ Da) et des sécrétions émises par les cellules telles que l'insuline ($M_w=6$ kDa).

La perméabilité doit donc être un compromis entre l'exclusion en taille de molécules (anticorps, cellules, médiateurs) et le taux de diffusion d'autres molécules (oxygène, nutriments, sécrétions) [42][4].

La taille d'exclusion appropriée est alors généralement comprise entre 50 et 150 kDa. Calafiore *et al.* [43] recommande une taille critique d'exclusion de 50 à 70 kDa de façon à empêcher le passage d'une partie des cytokines.

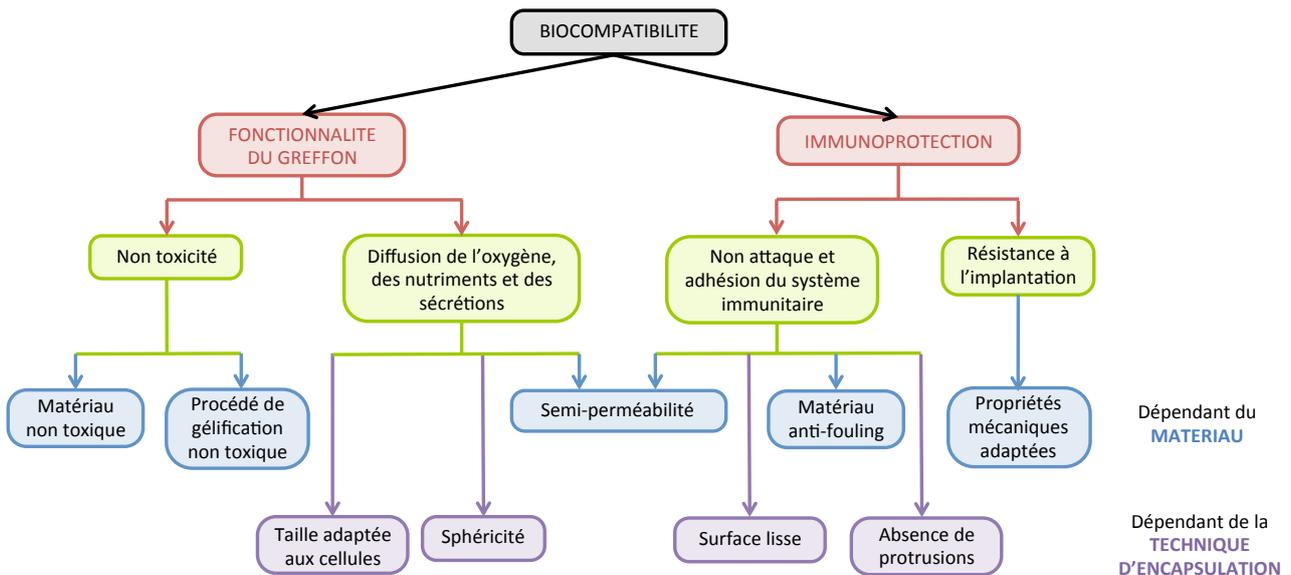


Figure 1-5: Critères auxquels doivent répondre les capsules pour l'encapsulation de cellules pour la thérapie cellulaire. Les critères en bleu dépendent essentiellement du matériau utilisé pour l'encapsulation. Les critères en violet dépendent essentiellement de la technique d'encapsulation.

○ Une surface lisse, sans protrusions

Les propriétés de surface des capsules sont également des facteurs déterminant leurs performances. La surface doit empêcher l'adhésion de protéines et de cellules immunitaires qui d'une part induirait la production des médiateurs inflammatoires et d'autre part entraînerait la formation de fibrose péricapsulaire.

En ce qui concerne la charge de surface, l'adsorption de protéines étant favorisée sur des surfaces présentant une charge positive, il est préférable que la charge de surface des capsules soit négative.

D'autre part, une forte rugosité de surface ou/et la présence de cellules en surface (protrusions) entraînent la reconnaissance des capsules par les macrophages et déclenchent alors une réponse immunitaire contre les capsules [44][45]. **Des capsules monodisperses, lisses et sans protrusions favorisent l'immunoprotection** [46].

○ Des propriétés mécaniques appropriées

La résistance mécanique des capsules est aussi un facteur déterminant dans le succès de la transplantation de cellules encapsulées. Elle doit permettre d'éviter la dissémination des cellules en maintenant l'intégrité des capsules dans le temps [4]. Elle doit donc être suffisamment importante pour que les capsules résistent aux forces subies lors de l'implantation [47]. Cependant, l'augmentation de la résistance mécanique peut influencer négativement d'autres paramètres des capsules tels que la perméabilité ou le microenvironnement cellulaire [42]. En effet, un environnement trop rigide peut entraîner un dérèglement du métabolisme cellulaire et la synthèse de protéines (mécanotransduction), conduisant éventuellement à la mort cellulaire [30]. **Il est donc nécessaire de trouver la résistance mécanique appropriée en fonction du type cellulaire et du site d'implantation** : les capsules implantées dans la cavité péritonéale doivent être plus résistantes que celles implantées dans le cerveau ou en sous-cutanée [47].

○ Un site d'implantation irrigué et oxygéné

Le site d'implantation est également primordial. Il doit permettre un apport régulier et durable d'oxygène et de nutriments aux cellules implantées pour le maintien de la viabilité cellulaire et permettre un échange rapide du glucose et de l'insuline pour répondre rapidement aux variations de glucose. **Les cellules doivent donc être implantées proche de vaisseaux sanguins.**

Les cellules encapsulées sont actuellement implantées dans la cavité péritonéale, seul site permettant d'implanter le volume de capsules nécessaire. Cependant, ce site n'est pas au contact direct des vaisseaux sanguins et est donc mal irrigué et peu oxygéné [37], ce qui entraîne la nécrose des îlots transplantés. De plus, ce site est sujet à une forte réaction immunitaire [39]. Une étude a montré que la réaction inflammatoire provoquée par les capsules est plus faible au niveau des tissus sous-cutanés et des reins [38]. **La taille des capsules, influençant directement le volume de l'implant, est donc un facteur essentiel également pour le choix du site d'implantation.**

○ Des capsules sphériques de taille adaptée aux cellules

La taille et la forme des capsules sont des facteurs essentiels pour la survie et la fonctionnalité des cellules. La taille des capsules doit être adaptée à la taille des cellules de façon à :

- réduire le temps de diffusion de l'oxygène et des nutriments, limitant ainsi la nécrose des cellules encapsulées
- réduire le temps de diffusion du glucose et de l'insuline, permettant alors d'obtenir une réponse rapide aux variations de glucose
- réduire le volume de l'implant, permettant alors d'implanter les capsules dans un site plus propice que la cavité péritonéale

La taille des îlots varie de 50 à 350 μm . Des études ont montré que les gros îlots ($>150 \mu\text{m}$) étaient plus susceptibles de former des nécroses au centre à cause de la diffusion des nutriments de la périphérie vers le centre [48][49]. De plus, les gros îlots produisent des DAMPs (« *Danger-Associated Molecular Patterns* ») qui induiraient une réponse inflammatoire. **Il est donc préférable de transplanter des îlots de petite taille ($<150 \mu\text{m}$) [49] dans des capsules de taille adaptée, c'est-à-dire de l'ordre de 200 μm de diamètre.**

Les îlots forment des agrégats sphéroïdes. **Les capsules doivent donc avoir une forme sphérique de façon à minimiser l'épaisseur de polymère entre l'îlot et le milieu extérieur et ainsi optimiser les échanges.**

○ Une productivité importante

La thérapie cellulaire du diabète nécessite la transplantation d'environ 11 000 IEQ/kg de patient [5]. Cette quantité de cellules doit être encapsulée en moins de deux heures afin de conserver la fonctionnalité des îlots provenant du donneur. **Le système d'encapsulation doit donc avoir une productivité importante.**

○ Un procédé reproductible, standardisé

La technique d'encapsulation doit permettre d'obtenir des **capsules reproductibles de façon à pouvoir mener à bien des essais précliniques et cliniques** [4].

Tous les critères présentés ci-dessus dépendent du matériau utilisé et/ou de la technique d'encapsulation. De très nombreuses recherches ont été menées dans ces deux voies pour mettre au point une capsule optimale répondant à tous ces critères. Certaines capsules montrant des performances prometteuses lors d'essais pré-cliniques chez l'animal ont été testées lors d'essais cliniques.

1.1.4 Résultats cliniques d'implantation *in-vivo* de cellules microencapsulées

La première étude *in vivo* de transplantation allogénique d'îlots microencapsulés a été menée sur le rat par Lim et Sun en 1980 [24]. Cette étude a montré que, en absence d'immunosuppresseurs, les îlots microencapsulés sont viables et fonctionnels pendant 3 semaines alors qu'ils ne le sont que 8 jours dans le cas des îlots non encapsulés. Depuis, de nombreuses études ont été poursuivies chez le rongeur puis chez le gros animal (chiens et primates non humains) permettant de comparer les différents types d'encapsulation (macro- ou micro-encapsulation), de matériaux, la qualité et l'origine des îlots, la dose d'îlots à encapsuler, etc... [17], [40], [50], [51]. **Ces études pré-cliniques ont démontré que la transplantation d'îlots microencapsulés permettait de réduire les effets du diabète, sans utilisation d'immunosuppresseurs.** Ces résultats prometteurs ont ainsi permis de poursuivre la recherche vers des essais cliniques.

Chez l'Homme, la première démonstration du principe d'immunoisolation utilisant des îlots allogéniques microencapsulés a été réalisée en 1994 par Soon-Shiong *et al.* [52] sur un patient qui a montré **une insulino-indépendance pendant 9 mois**. Quelques années plus tard, une étude conduite chez quatre patients a montré une **survie de la greffe sur 3 ans** (aucune production d'anticorps anti-pancréas et aucune réponse immunitaire contre la greffe) accompagnée d'une réduction des besoins en insuline exogène et du risque hypoglycémique [53][54]. En 2007, l'étude clinique menée par Elliot *et al.* [55] a été la première à démontrer la **sûreté de l'utilisation d'îlots non humains transplantés chez l'Homme** (xénotransplantation) en utilisant des îlots porcins microencapsulés. En effet, des cellules viables et fonctionnelles ont été observées dans des capsules récupérées près de 10 ans après transplantation. L'insulino-indépendance n'a pas été atteinte mais les besoins en insuline ont été réduits de 30% après 12 semaines. Cependant, un an après transplantation, le besoin en insuline a de nouveau augmenté, à cause d'un nombre insuffisant d'îlots fonctionnels.

Les résultats de transplantation d'îlots microencapsulés sont donc très encourageants. Cependant, il existe encore des **limitations** telles que :

- l'hypoxie (manque d'oxygène) des îlots encapsulés [56]
- le développement de fibrose péri capsulaire [56] qui limite l'apport en oxygène et nutriments au sein de la capsule [14][50]
- la perte d'immunoprotection causée par la faible stabilité et l'éclatement des capsules
- l'absence de standardisation de la procédure résultant dans l'échec d'une partie des essais cliniques [4][57]

Les challenges de la microencapsulation sont donc de :

- **réduire la taille des capsules** afin d'obtenir de meilleures performances en termes d'oxygénation.
- **optimiser leur état de surface** pour empêcher le développement de fibrose péri capsulaire.
- **augmenter leur résistance mécanique et leur stabilité** pour maintenir la protection physique à long terme.
- **standardiser la procédure** afin d'obtenir des capsules reproductibles et ainsi mener à bien les essais cliniques

Des recherches intensives sont actuellement menées pour définir le matériau idéal, le site d'implantation optimal et mettre au point de nouvelles techniques dans le but d'améliorer les performances des capsules utilisées et les résultats de transplantation. La suite de ce chapitre présente l'état de l'art actuel concernant les matériaux et les techniques d'encapsulation développés et en cours de développement.

BILAN SUR L'ENCAPSULATION POUR LA THERAPIE CELLULAIRE DU DIABETE

- La thérapie cellulaire est une alternative prometteuse dans le traitement du diabète de Type 1 mais est limitée par la faible quantité d'îlots pancréatiques disponibles, la toxicité des traitements immunosuppresseurs et la faible durée de vie de la greffe.
- L'encapsulation des cellules permet de protéger physiquement les cellules encapsulées. Elle permet ainsi de s'affranchir des traitements immunosuppresseurs et d'utiliser des sources de cellules animales.
- Les capsules doivent répondre à de nombreux critères afin de maintenir une greffe fonctionnelle à long terme.
- Les résultats cliniques de transplantation d'îlots microencapsulés sont très encourageants. Toutefois, la transplantation d'îlots encapsulés est limitée par l'hypoxie des îlots, le développement de fibrose péri-capsulaire et la faible stabilité des capsules.
- Les challenges de la microencapsulation sont donc de réduire la taille des capsules, d'optimiser leur état de surface et d'augmenter leur résistance mécanique.

1.2 Matériaux utilisés pour l'encapsulation cellulaire

La durabilité d'une greffe fonctionnelle dépend de nombreux paramètres explicités au paragraphe 1.1.3. Le polymère utilisé pour l'encapsulation est un des facteurs critiques. La première étape dans la production de capsules pour la thérapie cellulaire réside donc dans le choix d'un matériau d'encapsulation biocompatible approprié.

1.2.1 Polymères utilisés pour l'encapsulation cellulaire

Différents polymères ont été utilisés pour l'encapsulation de cellules et en particulier pour l'encapsulation d'îlots de Langerhans. Pour une revue exhaustive, le lecteur pourra se référer à l'article de De Vos *et al.* [49]. Le Tableau 1-2 récapitule les avantages et inconvénients de ces polymères.

Les polymères naturels sont extraits de sources naturelles et présentent donc l'avantage d'être plus facilement acceptés pour les applications biomédicales. Parmi eux, les polysaccharides sont les plus utilisés notamment parce que la majorité forment des hydrogels, polymères contenant une grande quantité d'eau (>90%), souples, mécaniquement stables et qui induisent peu de réponse immunitaire [58][59]. Les hydrogels forment des environnements 3D qui ont une structure et une résistance mécanique proche de la matrice extracellulaire des cellules (MEC) [58], puisque celle-ci en contient en grande quantité. L'utilisation d'hydrogel permet donc de mimer le microenvironnement natif des cellules.

Cependant, leur composition est souvent variable d'une source à l'autre ce qui résulte en une non reproductibilité de la composition du polymère et des propriétés des capsules obtenues. De plus, la plupart de ces polymères contient des impuretés (telles que des protéines, des endotoxines et des polyphénols)

pouvant provoquer de fortes réponses immunitaires [60]. La purification de ces polymères, nécessaire pour les rendre biocompatibles, rend le protocole de préparation beaucoup plus complexe ce qui augmente alors nettement leur prix.

Polymères	Source	Mise en forme Gélfication	Charge	Résistance mécanique	Perméabilité	Biocompatibilité	Références
POLYMERES NATURELS : peu chers, facilement acceptés pour les applications médicales, composition variable, impuretés							
Alginate	Algues brunes (forte abondance)	Gélfication ionique en présence d'ions divalents, à pH et T° physiologiques	Négative	Longue stabilité <i>in</i> <i>vivo</i>	Variable selon le type d'alginate	Variable selon le type d'alginate	[52]
Agarose	Algues rouges (peu reproductible)	Gélfication à T°<15-30°C [40]	Non chargé		Perméable aux cytokines	Induit peu de réactions immunitaires	Iwata [61], Kobayashi [62], De Vos [49]
Chitosan		Soluble à pH<6	Positive			Charge positive induit cytotoxicité et adhésion cellulaire [49]	Zielinski [63]
Collagène	MEC animale (forte abondance)			Faible [64]	Difficile à contrôler [64]	Induit peu de réactions immunitaires [49]	[59]
POLYMERES SYNTHETIQUES : reproductibles, purs, conditions de synthèse et de mise en forme toxiques							
PEG	Synthèse (solvants non toxiques)	Photopolymérisation UV			Faible perméabilité aux nutriments [65]	Photoinitiateurs baissent la fonctionnalité des cellules [66] Faible adsorption de protéines [16]	Weber [67], Cruise [65]
PVA	Synthèse	Gélfication par cycles répétés de gel/dégel				Faible hydrophilie le rend favorable à l'adhésion cellulaire	Emerich [32], [68]
Polyacrylates (PHEMA, HEAMA- MMA)	Synthèse				Faible perméabilité aux nutriments		[69][70]

Tableau 1-2: Polymères utilisés pour l'encapsulation de cellules : avantages (en vert) et inconvénients (en rouge) en termes d'approvisionnement, de méthodes de mise en forme, de propriétés (charge, résistance mécanique, perméabilité) et de biocompatibilité.

Contrairement aux polymères naturels, les polymères synthétiques ont l'avantage d'avoir une chimie bien contrôlée permettant d'obtenir des polymères reproductibles. Il est également possible d'ajuster la chimie du polymère de façon à obtenir les propriétés désirées [49]. Cependant, les procédés de synthèse impliquent généralement l'utilisation de solvants organiques toxiques ainsi que des conditions précises en termes de pH et de température qui peuvent ne pas être compatibles avec l'encapsulation de cellules.

Malgré les recherches intensives et les nombreux polymères testés, il est encore difficile de tirer des conclusions sur le polymère idéal pour l'encapsulation de cellules. De nombreuses équipes travaillent donc encore dans ce sens. A l'heure actuelle, **l'alginate est celui qui montre les performances les plus favorables à l'encapsulation de cellules** [17][49], notamment grâce à :

- son caractère hydrophile et son fort pourcentage en eau (>98%) qui réduisent les forces de frictions entre le polymère et les cellules encapsulées
- sa charge négative de surface qui limite l'adhésion cellulaire
- son procédé de gélfication simple et rapide dans des conditions physiologiques de pH et de température
- sa grande disponibilité et son faible coût de production
- sa biocompatibilité élevée et sa longue stabilité *in vivo* [52]

L'alginate est donc le polymère le plus couramment utilisé et ainsi le plus caractérisé et documenté. Il est actuellement le seul polymère autorisé pour la fabrication de microcapsules destinées à être implantées chez l'Homme [49]. **L'alginate a donc été choisi comme polymère d'encapsulation dans le cadre de cette thèse.** Il est présenté de façon plus approfondie dans le paragraphe suivant.

1.2.2 L'alginate

1.2.2.1 Composition chimique de l'alginate

L'alginate est un polymère naturel anionique, extrait des algues brunes, faisant partie de la famille des polysaccharides. Ce polymère se compose de deux types de monomères : l'acide β -D-manuronique (M) et l'acide α -L-guluronique (G). Ces monomères se lient entre eux de façon linéaire par liaison 1-4 pour former un copolymère à blocs (Figure 1-6). La proportion de chaque monomère et l'arrangement de ces deux monomères en blocs G-G, M-M et/ou M-G varient fortement selon le type d'alginate et déterminent les propriétés physico-chimiques et biologiques du polymère (voir paragraphes 1.2.2.3 et 1.2.2.4).

Les alginates sont alors caractérisés par leur proportion de chaque monomère (rapport G/M), l'arrangement de leurs blocs, leur poids moléculaire (M_w) et leur polydispersité (M_w/M_n , où M_n est la masse molaire moyenne des chaînes du polymère pondérée par le nombre de chaînes de cette longueur). Le poids moléculaire (M_w) peut être caractérisé par des mesures de viscosité intrinsèque ou par chromatographie d'exclusion stérique utilisant une détection par diffusion de la lumière. La composition et la séquence des monomères peuvent être caractérisées par RMN haute résolution [71][72][42]. L'alginate est classé en 3 catégories selon la proportion de monomères G : forte proportion (>60%, noté HG), proportion intermédiaire (40-60%, noté IG) et faible proportion (<40%, noté LG) [30].

1.2.2.2 Gélification de l'alginate

Lorsqu'il est extrait des algues brunes, l'alginate se présente sous la forme d'un sel d'alginate de sodium. Ce sel est soluble en solution aqueuse et gélifie par gélification ionotropique en présence d'ions divalents, tels que les ions calcium (Ca^{2+}), barium (Ba^{2+}), strontium (Sr^{2+}) ou magnésium (Mg^{2+}), qui s'incorporent dans la matrice polymère. Ces ions divalents forment des liaisons ioniques avec les groupements COO^- , OH et les atomes O des monomères, créant ainsi des points de réticulation entre chaînes de polymère. L'affinité de l'ion pour la chaîne de polymère dépend fortement de l'ion utilisé et de la composition de l'alginate : elle augmente selon les ions dans l'ordre suivant $Mg^{2+} \ll Ca^{2+} < Sr^{2+} < Ba^{2+}$ [73] et lorsque la proportion de monomères G augmente [74].

La grande différence d'affinité des ions divalents pour l'alginate indique que les liaisons formées entre les ions divalents et les monomères G ne sont pas purement électrostatiques [72]. Le mécanisme de gélification de l'alginate a été expliqué par le modèle de la boîte à œufs [75]: les ions divalents se placent dans les cavités formées par les monomères G et se lient aux monomères qui les entourent (Figure 1-6). Toutefois, Mørch *et al.* [72] ont montré que le Ca^{2+} se fixait aux blocs G et MG, le Ba^{2+} aux blocs G et M et que le Sr^{2+} se fixait uniquement aux blocs G.

La gélification de l'alginate est un procédé coopératif : lorsque le premier ion divalent s'est lié à deux monomères G, la liaison des autres ions est énergétiquement plus favorable. La formation d'une liaison stable nécessite 8 à 20 monomères G pour un ion Ca^{2+} [76][77]. Ce nombre diminue lorsque l'affinité de

l'ion pour l'alginate augmente [77]. La proportion de monomères G et leur répartition conditionnent donc la gélification et par conséquent les propriétés physiques des gels d'alginate obtenus.

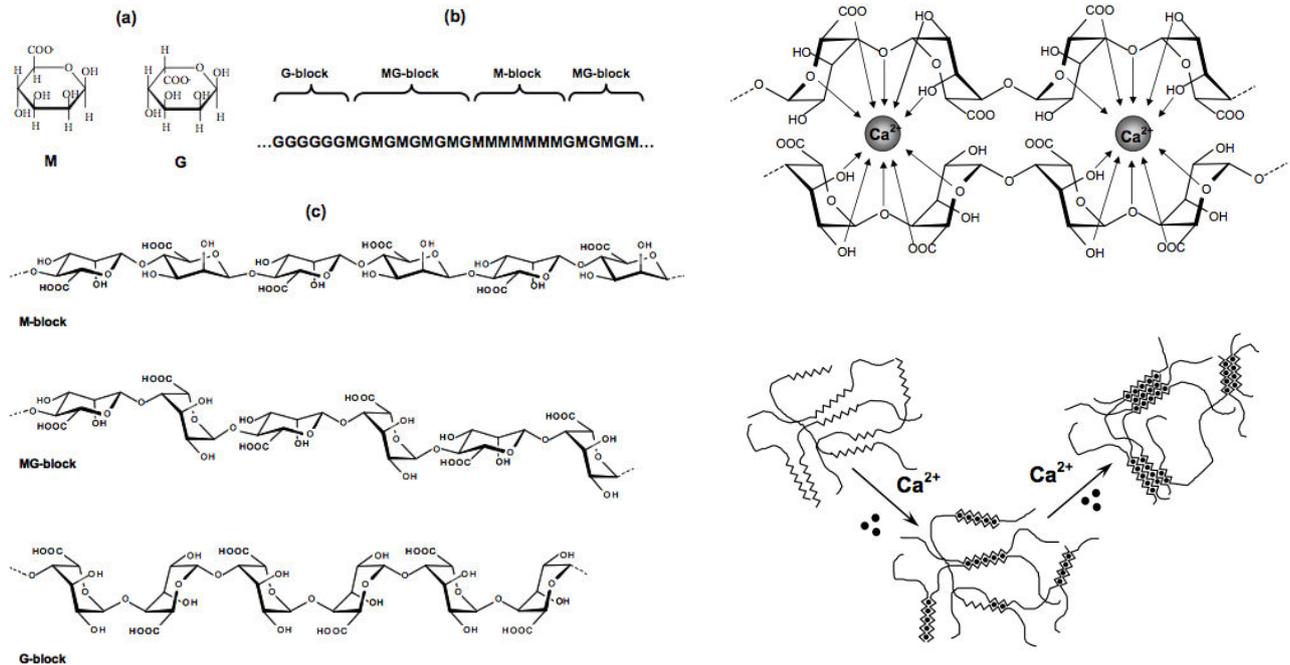


Figure 1-6: L'alginate : composition, structure et gélification. (Gauche) L'alginate se compose de deux monomères M et G (a) qui se lient entre eux pour former des chaînes polymériques linéaires composées de blocs M, MG et G (b,c). (Droite) L'alginate gélifie par gélification ionique en présence d'ions divalents suivant le modèle de la boîte à œufs (haut) et selon un procédé coopératif (bas).

1.2.2.3 Propriétés physiques des gels d'alginate

Les propriétés physiques des gels d'alginate (résistance, élasticité, gonflement et perméabilité) dépendent fortement des chaînes d'alginate (rapport G/M, séquence, poids moléculaire et polydispersité), de la concentration en alginate de la solution et des ions divalents utilisés pour la gélification [4], [16], [30], [72], [78]. Les propriétés physiques sont décrites et définies ci-dessous.

La résistance mécanique peut être décrite par deux paramètres :

- La rigidité (résistance à la déformation) de l'alginate est mesurée par le module d'Young (E), coefficient de proportionnalité entre la contrainte appliquée au matériau et la déformation engendrée.
- La dureté (résistance à la rupture) de l'alginate permet également de décrire les propriétés mécaniques des gels d'alginate. Contrairement à E qui est déterminé à faible déformation, la force de rupture donne une information sur le comportement du gel à forte déformation.

En général, la force de rupture augmente avec E mais ces deux paramètres ne sont pas nécessairement reliés. En effet, les gels d'alginate riches en monomères M ayant un module d'Young faible ont une forte résistance à la rupture (ils sont fortement élastiques), alors que les gels d'alginate riches en monomères G ayant un module d'Young élevé ont une faible résistance à la rupture (ils sont cassants) [30], [79].

L'élasticité est la capacité du matériau à se déformer et à revenir à sa forme initiale après déformation. Elle peut être définie comme le temps nécessaire pour atteindre une déformation donnée en appliquant une contrainte constante [80].

Le gonflement des gels d'alginate est observé lorsque les gels sont transférés en solution ayant une faible concentration en ions gélifiants. Ce gonflement, appelé gonflement osmotique [81], résulte de l'équilibre thermodynamique (équilibre des concentrations en ions mobiles et des charges) entre le solvant du gel et la solution extérieure dans laquelle il est placé. En effet, les concentrations en ions et en charges positives étant élevées au sein du gel (pression osmotique élevée), pour équilibrer ces deux solutions, il y a une sortie des ions divalents gélifiants et une entrée d'eau et d'ions monovalents (tels que des ions sodium Na^+) non gélifiants dans le gel. Cette entrée d'eau provoque le gonflement du gel (Figure 1-7).

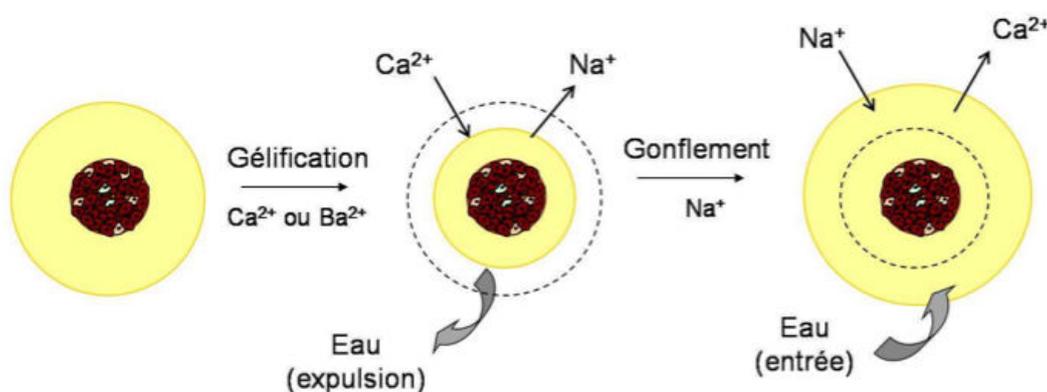


Figure 1-7: Variation de la taille des capsules lors de la gélification et du transfert en solution non gélifiante par équilibre osmotique. Lors de la gélification l'incorporation des ions divalents au sein de la matrice polymère entraîne une expulsion d'une partie de l'eau du gel provoquant alors son rétrécissement. Lors du transfert des capsules en solution non gélifiante (faible concentration d'ions divalents), l'équilibre osmotique entraîne l'échange des ions divalents par des ions monovalents et l'entrée d'eau dans la matrice polymère provoquant alors le gonflement dit osmotique des capsules.

Le gonflement est également observé lorsque le gel est placé dans une solution contenant des ions chélateurs du Ca^{2+} tels que le citrate de sodium ou l'EDTA [82]. Dans ce cas, les ions Ca^{2+} présents dans le gel sortent du gel pour se lier aux ions chélateurs pour lesquels ils ont plus d'affinité qu'avec l'alginate.

Le gonflement se traduit par une augmentation de la porosité et une diminution de la résistance mécanique des gels. Il est donc important de limiter et maîtriser ce gonflement osmotique dans le cadre de l'utilisation des gels d'alginate pour la formation de capsules pour l'encapsulation cellulaire.

La perméabilité est la capacité du matériau à se laisser traverser par un gaz ou un liquide, elle est directement liée à la taille des pores de la matrice de polymère.

Les influences des caractéristiques des chaînes d'alginate et de la gélification sur ces propriétés sont résumées dans le Tableau 1-3.

1.2.2.4 Biocompatibilité de l'alginate

La gélification de l'alginate se fait dans des conditions physiologiques de pH et de température, ce qui rend ce polymère biocompatible et adapté pour des applications d'encapsulation cellulaire. De plus, ce polymère étant chargé négativement, l'adhésion de protéines sur sa surface n'est pas favorable à cause des effets

électrostatiques [83]. Toutefois, le degré de biocompatibilité de l'alginate dépend de sa composition et de sa pureté.

Influence de la composition de l'alginate

De façon générale, l'augmentation de la résistance mécanique améliore l'immunoprotection en permettant une encapsulation durable. Tous les paramètres influençant la résistance mécanique des capsules (décrits au paragraphe 1.2.2.3) ont donc une influence sur la biocompatibilité des capsules. Peu d'études ont été réalisées pour déterminer les critères précis auxquels doivent répondre les gels d'alginate pour être biocompatibles. Une étude récente a été publiée par Bhujbal *et al.* [80] à ce sujet. Les conclusions des études sont regroupées dans le Tableau 1-3.

Influence de la pureté de l'alginate

L'alginate contient naturellement des polyphénols, des endotoxines (lipo-polysaccharides) et des protéines qui, lorsqu'ils sont présents dans l'alginate des capsules implantées, sont reconnus par le système immunitaire du receveur et entraînent la formation de fibroses [84][60][85][86]. De Vos *et al.* [86] ont démontré que la réponse immunitaire était bien provoquée par les contaminants et non par l'alginate lui-même.

Différentes équipes ont donc focalisé leurs recherches sur la purification de l'alginate [87][60][88]. De façon générale, les protocoles développés réduisent de manière efficace la quantité de polyphénols et d'endotoxines, ce qui permet alors de réduire la réponse immunitaire contre les capsules [60][86] et d'augmenter la viabilité des cellules encapsulées [89]. Toutefois, l'élimination des protéines est nettement moins efficace et les contaminants toujours présents affectent la biocompatibilité [85].

Selon la FDA, dans le cas d'implantation de matériel, la quantité d'endotoxines doit être inférieure à 350 EU⁶ par patient. **L'alginate « ultra-pur » commercialisé par FCM Biopolymer NovaMatrix contient moins de 100 EU/g et un faible pourcentage de protéines (<0.3%) [90].**

1.2.2.5 Choix de l'alginate et du type de gélification pour l'encapsulation de cellules

Pour répondre aux critères énoncés au paragraphe 1.1.3, les capsules d'alginate gélifiées doivent être biocompatibles, avoir une forte stabilité, une résistance mécanique et une élasticité importante et une taille de pores définie avec une distribution de taille de pores faible. Le Tableau 1-3 résume l'influence des caractéristiques de l'alginate et de la gélification sur les propriétés physiques et la biocompatibilité des gels obtenus.

A l'heure actuelle, le polymère idéal pour l'encapsulation de cellules pour la thérapie cellulaire n'a pas été déterminé. Malgré les nombreuses études, il est difficile de conclure sur les critères précis concernant les caractéristiques auxquelles doivent répondre les alginates, notamment parce que dans la plupart des études de biocompatibilité et les essais cliniques, les alginates utilisés et les capsules obtenues sont peu caractérisés [41]. D'autre part, les propriétés requises, et en particulier la résistance mécanique, vont dépendre du site d'implantation et du type cellulaire encapsulé. Aussi, il est important de prendre en compte la présence de cellules dans les capsules lors de la définition du cahier des charges des capsules puisque la présence de cellules affecte négativement la résistance mécanique [80].

⁶ EU = « Endotoxin Units » : unité utilisée pour exprimer la concentration d'endotoxines

Toutefois, l'obtention d'une forte résistance mécanique et d'un gonflement osmotique faible semble permise par l'utilisation d'alginate avec une forte proportion de monomères G (HG), un poids moléculaire élevé et une concentration élevée. L'augmentation de la proportion de monomères G augmente la perméabilité [79][72] mais celle-ci diminue avec la concentration de l'alginate ; l'ajustement de ces deux paramètres permet donc *a priori* d'obtenir la porosité désirée. D'autre part, pour limiter l'adhésion de cellules et protéines en surface il semble préférable d'utiliser des ions Ca^{2+} avec de l'alginate ayant un fort pourcentage en G [30].

	Résistance à la déformation (rigidité)	Résistance à la rupture (dureté)	Elasticité	Gonflement osmotique	Perméabilité	Biocompatibilité
Composition	Augmente avec la proportion de G [80]	Augmente avec la proportion de M [30], [79]	Augmente avec la proportion de M [30], [79]	Diminue avec la proportion de G [79][91]	Augmente avec la proportion de G et de longs blocs G [79][92]	Résultats contradictoires : <ul style="list-style-type: none"> • Monomères M stimulent la production de marqueurs inflammatoires [93][94] • Pas d'influence [95] • Réponse immunitaire significativement réduite [96] et meilleure viabilité [30] avec IG plutôt que HG
Poids moléculaire (M_w)	Augmente avec M_w jusqu'à une certaine valeur puis devient indépendante de M_w [79]	Augmente avec M_w				Pas d'influence [95]
Concentration (c_{alg})	E proportionnel à c_{alg}^2 [78], [79]				Diminue avec c_{alg} (taille des pores proportionnel le à $1/c^3$) [72]	Augmente avec c_{alg} (de 0,75% à 1,5%) [97]
Type d'ion gélifiant	$\text{Ba}^{2+} > \text{Ca}^{2+}$ [98][99]		$\text{Ba}^{2+} < \text{Ca}^{2+} < \text{Sr}^{2+}$	Ba^{2+} ou $\text{Sr}^{2+} < \text{Ca}^{2+}$ [100][91]	Dépend de la composition de l'alginate [98]	Meilleure avec Ca^{2+} que Ba^{2+} (toxique) [99] [101]
Concentration en ion gélifiant (c_{ions})	Augmente avec c_{ions} [79]				Augmente avec c_{ions} [102]	
Temps de gélification	Résultats contradictoires : <ul style="list-style-type: none"> • Diminue après 20 min [30] [103] • Augmente au cours de la 1^{ère} heure puis se stabilise [79] 	Pas d'influence (entre 5 et 20 min) [80]			Pas d'influence dans le cas du Ba^{2+} [103]	

Tableau 1-3: Influence des caractéristiques de l'alginate et de la gélification sur les propriétés et la biocompatibilité des gels d'alginate obtenus

La viscosité de la solution d'alginate augmentant avec la concentration, la proportion en monomères G et le poids moléculaire, **il semble donc qu'il soit préférable de produire les caspules d'alginate à partir d'un alginate de haute viscosité (HV)** [80].

Malgré les efforts des équipes de recherche, la plupart des microcapsules d'alginate présente encore une faible stabilité mécanique, la présence de cellules en surface et une rugosité de surface qui limitent leur application clinique. En effet, **il est difficile de trouver un unique polymère répondant à tous les critères requis pour l'encapsulation et la transplantation**. Les développements se tournent alors vers la fabrication de capsules combinant plusieurs polymères, un polymère au contact des cellules et un polymère en surface au contact avec le milieu d'implantation. Ces capsules sont dites « cœur-coque » ou « multicouche »⁷.

1.2.3 Avantages de l'encapsulation multicouche

L'encapsulation multicouche consiste à utiliser un polymère central dans lequel sont encapsulées les cellules et à ajouter une ou plusieurs couches de polymère en périphérie. Ce type d'encapsulation présente alors des avantages dans l'optimisation des propriétés des capsules.

1.2.3.1 Optimisation de la résistance mécanique et la perméabilité

Les capsules d'alginate doivent être assez rigides pour résister à l'implantation. Toutefois, l'utilisation d'alginate très rigide peut entraîner la mort cellulaire [30]. L'utilisation d'une couche de polymère plus résistante en surface des capsules permet alors d'augmenter la résistance mécanique globale des capsules sans modifier la résistance mécanique du polymère contenant les cellules. Plusieurs types de polymères ont été utilisés à cet effet :

○ Polyélectrolytes

La résistance mécanique des capsules peut être renforcée en ajoutant une ou plusieurs couches de polyélectrolytes tels que la poly-L-Lysine (PLL), la poly-D-Lysine (PDL), la poly-L-ornithine (PLO) et la poly-L-arginine (PLA) [80]. Cependant, des études ont montré que ces polycations ont une biocompatibilité médiocre puisqu'ils entraînent l'activation des macrophages [104][105] et l'apparition de fibrose pericapsulaire [104], résultant en la diminution de la fonctionnalité de la greffe *in vivo*. La toxicité peut être réduite en recouvrant ces capsules d'une couche d'alginate, formant alors entre autres des capsules alginate-PLL-alginate appelées APA ou alginate-PLO-alginate appelées APO. C'est ce type de capsules (APA ou APO) qui a été utilisé lors des essais cliniques présentés au paragraphe 1.1.4. Cependant, avec les procédés actuels, ces polyélectrolytes ne sont pas totalement recouverts par l'alginate [106]. Une étude menée par Wilson *et al.* [107] a également montré que la toxicité pouvait être réduite par l'ajout de chaînes de PEG mais ce type de capsule n'a pas été testé lors d'essais cliniques.

Outre le fait qu'ils augmentent la résistance mécanique et la stabilité des capsules, les couches de polyélectrolytes ont également pour effet de réduire la porosité des capsules qui peut être ajustée avec le nombre de couches déposées. Ces couches permettent aussi de limiter le gonflement osmotique des capsules car les complexes formés sont stables en solution physiologique.

○ Alginate rigide

L'utilisation d'un alginate rigide (fort pourcentage en G) comme polymère de recouvrement des capsules permet également d'augmenter leur résistance mécanique globale sans nuire aux cellules encapsulées [30].

⁷ Les termes de « double encapsulation » ou d'« encapsulation multiple » pourraient s'appliquer à ce type de capsules, cependant ces termes sont majoritairement utilisés pour désigner des capsules alternant des couches hydrophiles et hydrophobes (émulsions multiples) qui sortent du cadre de cette thèse.

○ Chitosan

Des études ont montré que le chitosan peut également apporter la résistance mécanique nécessaire à l'encapsulation [108] et que des capsules d'alginate-chitosan-alginate (ACA) pouvaient être une alternative aux capsules APA [108] [109] [110]. En ce qui concerne la perméabilité, Zhang *et al.* [109] ont montré que les capsules ACA bloquent le passage des anticorps (160 kDa) tout en permettant une diffusion efficace au travers des capsules de l'oxygène et des nutriments nécessaires à la survie des cellules.

1.2.3.2 Optimisation de l'état de surface

La rugosité de surface favorise l'adsorption des protéines, l'adhésion des cellules du système immunitaire et la formation de fibrose [111][112], limitant les échanges au travers de la capsule et entraînant alors la nécrose de cellules encapsulées. Les cellules présentes en surface (protrusions) peuvent attirer le système immunitaire et déclencher une réponse immunitaire contre les capsules entraînant le rejet de la greffe.

L'ajout d'une couche de polymère sans cellules permet de recouvrir les cellules présentes en surface (protrusions) et d'augmenter ainsi la fonctionnalité de la greffe [113][30]. Ma *et al.* [113] et Bhujbal *et al.* [30] montrent ainsi que l'ajout d'une coque d'alginate sans cellules permet d'éliminer totalement les protrusions. Dans l'étude de Ma *et al.* [113], des tests *in vivo* chez des souris diabétiques ont montré que ces capsules « cœur-coque » permettent de maintenir une fonctionnalité des cellules sur plus de 80 jours après transplantation contre 20 jours dans le cas de capsules d'alginate simple (dont 30% présentent des protrusions).

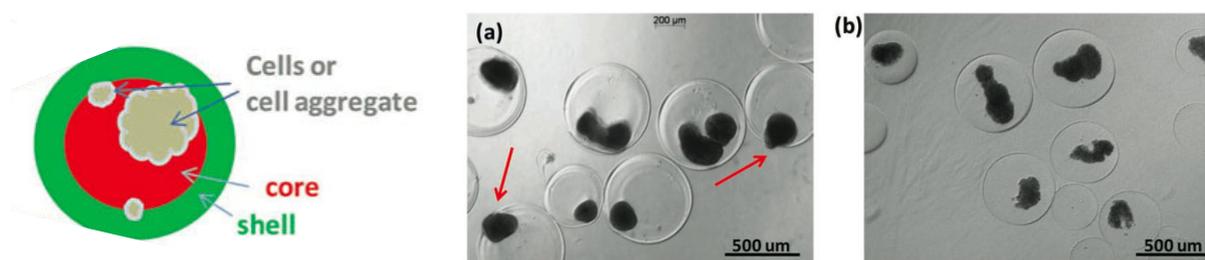


Figure 1-8: Encapsulation de cellules dans des capsules multicouches d'alginate d'après Ma *et al.* [113]. (a) L'encapsulation de cellules dans des capsules monocouche d'alginate entraîne la présence de protrusions sur 30% des capsules. (b) L'ajout d'une couche d'alginate sans cellules en surface permet d'éliminer totalement les protrusions.

La couche de polymère ajoutée en surface, en plus de recouvrir les cellules en périphérie, peut également avoir des propriétés limitant l'adsorption de protéines et réduisant la formation de fibrose [114].

Des études ont notamment montré que l'utilisation de chitosan pouvait réduire la rugosité de surface de capsules ACA [115]. Aussi, l'ajout de chaînes de PEG sur des capsules ACA a permis de réduire considérablement (61%) l'adsorption de protéines à la surface des capsules [116][117].

L'encapsulation multicouche permet donc d'améliorer les performances des microcapsules. Dans ce type de capsule, le cœur des capsules n'est pas au contact direct avec le milieu extérieur. Ceci **permet donc de pouvoir optimiser indépendamment la biocompatibilité du polymère au contact avec les cellules de la biocompatibilité du polymère au contact avec le milieu extérieur**, ce qui permet ainsi d'éviter les compromis qui sont nécessaires dans le cas d'une encapsulation simple.

L'état de l'art sur les techniques d'encapsulation multicouche sera présenté au Chapitre 8.

BILAN SUR LE CHOIX DU MATERIAU POUR L'ENCAPSULATION

- L'alginate est le polymère qui montre les performances les plus favorables à l'encapsulation de cellules.
- A l'heure actuelle, la composition idéale de l'alginate pour l'encapsulation de cellules pour la thérapie cellulaire n'a pas été déterminée. Toutefois, il semble préférable d'utiliser un alginate de forte viscosité (HV) (>500 mPa.s).
- Il est toutefois difficile de trouver un unique polymère répondant à tous les critères d'encapsulation.
- L'encapsulation multicouche permet d'optimiser indépendamment la biocompatibilité du polymère au contact avec les cellules de la biocompatibilité du polymère au contact avec le milieu extérieur, et ainsi d'éviter les compromis nécessaires dans le cas d'une encapsulation simple.

1.3 Techniques de microencapsulation cellulaire

Quelle que soit la technique employée, l'encapsulation cellulaire se déroule en trois étapes :

1) la formation des gouttes de polymère contenant les cellules

Les cellules sont au préalable incorporées de façon homogène dans la matrice polymère.

2) la gélification des gouttes préalablement formées pour obtenir des capsules

Cette étape détermine la morphologie, l'état de surface et les propriétés mécaniques finales des capsules et ne doit pas affecter la viabilité des cellules encapsulées. La méthode de gélification détermine donc les performances des capsules et leur biocompatibilité.

3) le transfert des cellules encapsulées en solution physiologique ou milieu de culture cellulaire

Cette étape a pour but d'arrêter la gélification et de conserver les capsules dans une solution biocompatible. En effet, une solution gélifiante ayant une forte concentration en calcium est toxique pour les cellules à long terme.

Dans ce paragraphe sont présentées les différentes techniques employées pour ces étapes.

1.3.1 Techniques classiques

1.3.1.1 Formation de gouttes par extrusion ou segmentation d'un jet et gélification externe

La technique d'extrusion (*dripping*) est la technique la plus couramment utilisée pour l'encapsulation de cellules. Dans cette technique, les gouttes sont formées à l'extrémité d'une aiguille (*nozzle*) et se détachent de l'aiguille sous l'effet de la gravité, lorsque leur poids devient supérieur aux forces de tension de surface qui retiennent les gouttes à l'embouchure de l'aiguille. Le diamètre des gouttes produites par extrusion simple est de l'ordre de 2000 μm [118]. Pour un fluide donné, la taille minimale des gouttes obtenues est limitée par la taille de l'aiguille.

Différentes méthodes permettent de faciliter et contrôler le détachement des gouttes permettant ainsi de réduire leur taille et d'augmenter leur fréquence de production. Ces méthodes sont présentées et comparées dans le Tableau 1-4.

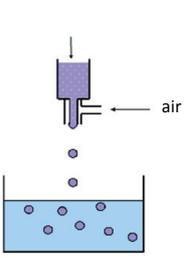
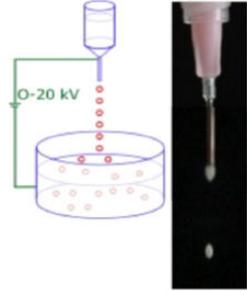
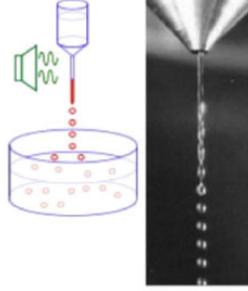
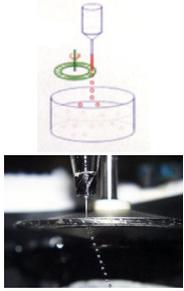
	Extrusion facilitée		Segmentation d'un jet	
	Fux d'air co-axial	Potentiel électrostatique	Vibrations	Jet cutter technology
Description	 Flux d'air co-axial au niveau de l'embouchure de l'aiguille.	 Potentiel électrostatique entre l'aiguille et le bain de collecte.	 Segmentation d'un jet soumis à des vibrations de fréquence contrôlée [119][120]	 Disque rotatif constitué de fils coupants.
Principe	La force créée par le flux s'ajoute à la pesanteur et facilite le détachement de la goutte avant qu'elle n'atteigne sa taille définitive.	La différence de potentiel générée entraîne l'accumulation de charges à la surface des gouttes, ce qui réduit la tension de surface et permet ainsi de réduire la taille des gouttes produites. [121][122]	Sous l'effet des vibrations, le jet se rompt spontanément en gouttes de taille uniforme, à une fréquence déterminée par la vitesse du fluide et la longueur d'onde de vibration [123][118].	Segmentation d'un jet de liquide par un disque rotatif constitué de fils coupants.
Taille des gouttes	500 - 800 µm [124][125]	200 – 800 µm [126][128] 100 µm (20kV) [126]	200 - 800 µm [127][128]	300 – 800 µm [128][127]
Polydispersité	CV ≈ 10-15 %	CV < 10 %	CV ≈ 10%	CV > 15 %
Viscosité	< 400 mPa.s	< 400 mPa.s	< 500 mPa.s [125]	Jusqu'à 110 Pa.s (1 mm)
Productivité	1900 gouttes/min (800 µm) [125] 6000 gouttes/min (300 µm) [118] 2400 gouttes/min [127]	1900 gouttes/min (800 µm) [125] 6000 gouttes/min (300 µm) [118]	Jusqu'à 40 000 gouttes/min (800 µm)	Jusqu'à 10 000 gouttes/s (200 µm) [129]
Remarques	Le flux d'air peut entraîner la formation de bulles d'air dans les gouttes de polymère formées [123]		La présence des cellules dans le liquide perturbe le jet et les gouttes produites sont alors polydisperses.	Le disque tournant peut endommager les cellules contenues dans le jet [118], ce qui réduit la viabilité des cellules encapsulées [125]
Commercialisation	Nisco [127]	Nisco [127]	Nisco [127], Buchi [130]	Genialab [129], Nisco [127]

Tableau 1-4 : Comparaison des performances des techniques d'extrusion. Illustrations [118]

Les gouttes de polymère sont ensuite récoltées dans une solution d'ions gélifiants (solution de calcium dans le cas de gouttes d'alginate) qui diffusent au sein de la goutte entraînant ainsi leur réticulation. On parle de gélification externe.

Ces techniques présentent l'avantage d'être faciles à mettre en œuvre, relativement peu chères et permettent une productivité importante. La productivité peut également être augmentée en utilisant des « *multiple nozzle* » (Nisco). Elle dépend toutefois de la viscosité et de la taille des gouttes.

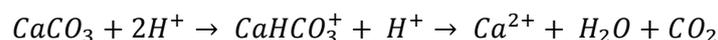
Cependant, ces méthodes présentent **plusieurs inconvénients majeurs** :

- **la gamme de viscosité utilisable** : la formation des gouttes devient difficile voire impossible lorsque la viscosité devient très élevée (>500 mPa.s). En effet, la viscosité agit comme une force stabilisant le jet empêchant sa rupture. La technique du jet cutter est celle permettant d'utiliser les viscosités les plus élevées (jusqu'à 110 Pa.s) mais cette technique peut être néfaste pour les cellules.
- **la taille des gouttes produites** : des tailles de gouttes de 200-300 µm ne peuvent être atteintes qu'à très faible viscosité. Lorsque la viscosité augmente, la taille minimale des gouttes augmente.
- **la polydispersité** : elle est relativement élevée (CV>10%) et augmente lorsque la taille diminue.

1.3.1.2 Formation de gouttes par émulsification et gélification interne

La formation de gouttes par émulsification permet d'obtenir des gouttes plus petites que par les techniques d'extrusion. L'émulsification consiste à mélanger deux phases non miscibles pour former des gouttes d'une phase dite dispersée dans une phase dite continue. Cela nécessite l'apport d'une grande quantité d'énergie pour former les interfaces entre les deux phases ainsi que l'utilisation de tensioactifs (molécules amphiphiles) afin de stabiliser les interfaces créées. La stabilité de l'émulsion et la taille des gouttes formées dépendent de la technique de mélange apportant l'énergie, de la température, du rapport des volumes des deux phases, du type et de la quantité de tensioactifs. L'apport d'énergie peut se faire par agitation mécanique, vortex, homogénéisation ou sonication.

Les gouttes sont ensuite solidifiées par gélification interne. Cette méthode a été proposée par Poncelet *et al.* [131], [132] et également utilisée par Hoesli *et al.* [133] pour la formation de capsules d'alginate. La méthode consiste à incorporer des nanocristaux de carbonate de calcium (CaCO₃) dans la matrice polymère puis à former les gouttes de polymère. Une fois les gouttes formées, de l'acide acétique est ajouté à la phase huileuse de façon à réduire le pH. L'abaissement de pH (pH<6,5 [3]) provoque la dissolution des cristaux de CaCO₃ et par conséquent la libération des ions calcium (voir équation ci-dessous), permettant ainsi la gélification de l'alginate.



La taille des gouttes varie de 200 µm à 1000 µm selon les paramètres d'agitation. Cependant, les gouttes obtenues par cette technique sont très polydisperses (CV>30%) et la polydispersité augmente lorsque la taille des gouttes diminue. Aussi, les capsules gélifiées ont tendance à s'agglomérer dans la phase d'huile.

Après un certain temps de récolte ou d'émulsification, les capsules produites sont récupérées, rincées et transférées manuellement en solution physiologique ou milieu de culture cellulaire. Dans chacune de ces techniques, la production se fait donc par lot et non en continu.

Comme énoncé dans les paragraphes 1.1.3 et 1.2, l'encapsulation de cellules nécessite des capsules monodisperses (CV<5%), de taille adaptée à la taille des cellules (<200 µm) et produites à partir d'alginate

plutôt visqueux (>500 mPa.s). **Ces techniques classiques ne sont donc pas adaptées à l'encapsulation de cellules pour la thérapie cellulaire.**

Dans le cas de la gélification externe, la production de gouttes se fait en continu mais la récupération et le transfert des capsules se fait par lot. Les premières gouttes tombant dans le bain gélifiant restent donc plus longtemps que les dernières, ce qui entraîne une **variabilité de la gélification des capsules** au sein d'un même lot.

Aussi, toutes les manipulations manuelles effectuées pour les rinçages et transfert en solution physiologique sont coûteuses en temps et dépendantes de l'expérimentateur. Elles peuvent également amener à des contaminations et affecter la viabilité des cellules encapsulées. **Ces techniques sont donc peu reproductibles, ce qui est un inconvénient pour mener à bien des essais pré-cliniques et cliniques.**

1.3.2 Techniques microfluidiques

La microfluidique est la science et la technologie de la manipulation de fluides dans des microcanaux (canaux dont au moins une des dimensions est de l'ordre de la centaine de micromètres ou plus petit). Du fait des dimensions des canaux et de la vitesse des fluides (de l'ordre du cm/s), les écoulements sont laminaires avec des forces visqueuses et capillaires qui prédominent sur les forces inertielles.

Depuis les années 2000, la microfluidique a été très utilisée pour la formation d'émulsions. Dans ces systèmes, les gouttes sont générées en continu en introduisant la phase constituant les gouttes, appelée phase dispersée dans une phase non miscible, appelée phase continue. Ce domaine est notamment en forte expansion pour les applications d'encapsulation de cellules, comme l'atteste le nombre de publications sur ce sujet lors de ces dernières années (Figure 1-9).

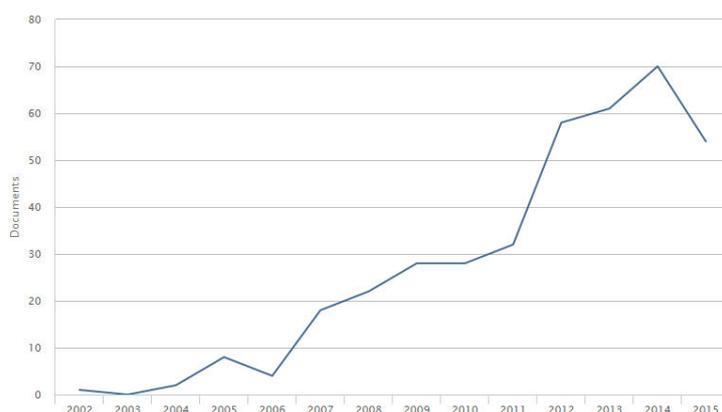


Figure 1-9: Nombre de publications sur l'encapsulation de cellules en microfluidique lors des 15 dernières années. Résultats de la recherche « microfluidics AND cell AND encapsulation » sur Scopus

1.3.2.1 Dispositifs de génération de gouttes

Plusieurs systèmes ont été développés pour la formation d'émulsion qui diffèrent dans la géométrie de la jonction où les deux phases entrent en contact [120]. Le principe commun de ces systèmes est que le flux

de phase continue cisaille la phase dispersée résultant dans l'amincissement de la phase dispersée puis la formation d'une goutte.

1.3.2.2 Jonction T

Une des géométries la plus couramment utilisée pour la formation d'émulsion en microfluidique est la géométrie introduite en 2001 par Thorsen *et al.* [134], appelée jonction T. Dans cette géométrie, la phase continue est introduite dans un canal perpendiculaire à celui de la phase dispersée. Lorsque la phase dispersée pénètre dans le canal de phase continue, la goutte en formation est cisailée par le flux de phase continue, ce qui résulte dans l'amincissement puis la rupture de la phase dispersée formant ainsi une goutte.

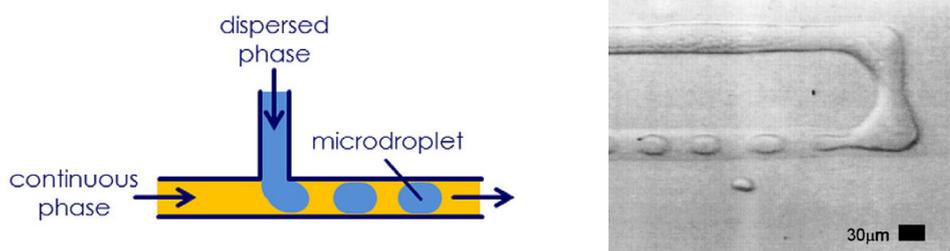


Figure 1-10: Géométrie en jonction T pour la formation d'émulsions en microfluidique proposée par Thorsen *et al.* [134]

1.3.2.3 Géométrie à co-écoulement co-axial

Dans cette géométrie, la phase dispersée est introduite dans la phase continue de façon à créer un écoulement co-axial des deux phases [135][136]. Cette géométrie est réalisée en emboîtant un capillaire de section circulaire, dans lequel circule la phase dispersée, dans un autre capillaire de section circulaire ou dans un canal de section carré, dans lequel circule la phase continue. Le co-écoulement des deux fluides non miscibles provoque la formation de gouttes (Figure 1-11).

Le grand avantage des dispositifs co-axiaux est qu'ils permettent la formation d'écoulement en trois dimensions. Cette géométrie est très utilisée par le groupe de Weitz *et al.* [136]. Dans ces dispositifs, la largeur du canal de section carrée est généralement égale au diamètre du capillaire interne de façon à permettre un emboîtement précis des deux capillaires. La fabrication de tels dispositifs nécessite toutefois une bonne maîtrise et expertise dans la procédure et **les dispositifs sont généralement peu reproductibles.**

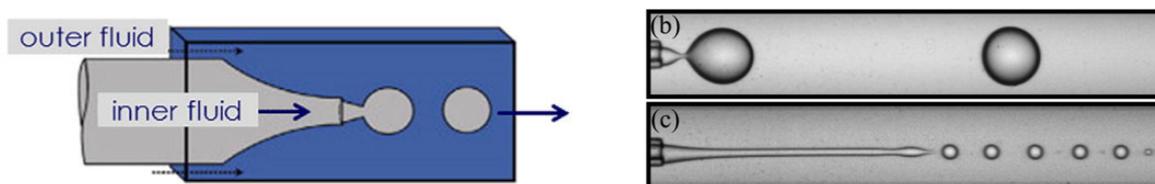


Figure 1-11: Géométrie à écoulement co-axial pour la formation d'émulsions en microfluidique : schéma du dispositif (a), formation de gouttes à l'extrémité d'un capillaire en régime de « dripping » (b) et de « jetting » (c) [137]

1.3.2.4 Géométries à focalisation d'écoulement (« Flow Focusing Device »)

La géométrie à focalisation d'écoulement a initialement été proposée en 1998 par Gañan-Calvo *et al.* pour la formation de gouttes de liquide en flux d'air [138] et de bulles d'air dans un liquide [139] puis a été plus largement utilisée pour la formation d'émulsions. Il existe deux types de dispositifs à focalisation d'écoulement selon la géométrie plane ou tri-dimensionnelle du dispositif :

- Géométrie plane : MFFD (« Microfluidic Flow Focusing Device »)

Dans cette géométrie, la phase dispersée s'écoule dans un canal central et la phase continue s'écoule par deux canaux latéraux perpendiculaires de part et d'autre du canal central. La phase continue focalise ainsi la phase dispersée et favorise le détachement des gouttes. Le diamètre des gouttes est de l'ordre de la largeur du canal de phase dispersée.

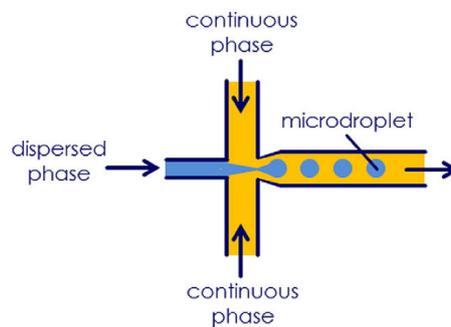


Figure 1-12: Principe de la formation de gouttes par focalisation d'écoulement (MFFD)

La focalisation de la phase dispersée par la phase continue peut être accentuée par la présence d'une restriction géométrique située juste après la jonction entre les deux phases, ce qui favorise davantage la formation des gouttes (Figure 1-13, gauche). Ce type de système a été proposé en 2003 par Anna *et al.* [140] puis a été très utilisé notamment par Garstecki *et al.* [141] pour la formation de bulles d'air.

Une autre géométrie à focalisation d'écoulement a été proposée par Tan *et al.* [142]. Dans ce dispositif, la jonction entre les deux phases est directement suivie par une chambre triangulaire (Figure 1-13, droite). Selon les auteurs, cette géométrie triangulaire permet la focalisation du cisaillement au niveau de la jonction et **permet ainsi d'améliorer la monodispersité des gouttes produites.**

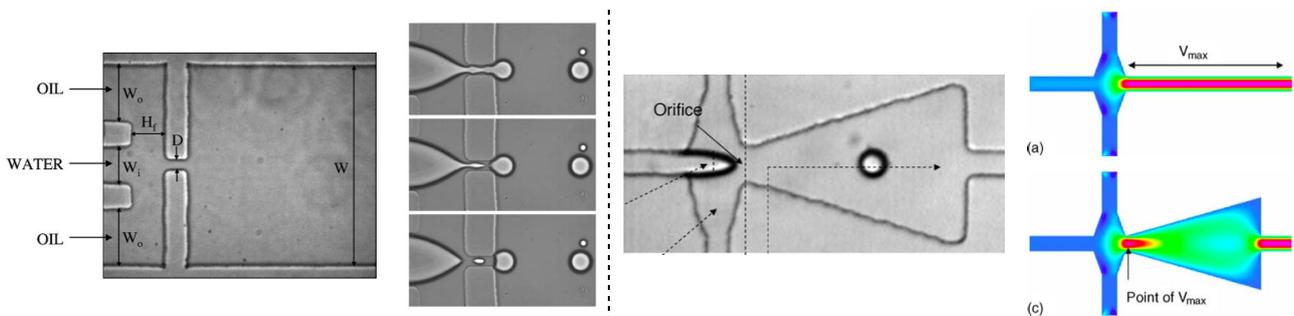


Figure 1-13: Géométries planes à focalisation d'écoulement (MFFD) : (gauche) Géométrie proposée par Anna *et al.* [140] : la restriction géométrique focalise la phase dispersée et augmente le cisaillement exercé par la phase continue sur la phase dispersée; (droite) Géométrie proposée par Tan *et al.* [142] : la chambre triangulaire située juste après la jonction permet la focalisation du cisaillement au niveau de la jonction.

○ Géométrie tridimensionnelle : AFFD (« Axisymmetric Flow Focusing Device »)

Le principe de la focalisation d'écoulement a également été utilisé pour les systèmes co-axiaux. Takeuchi *et al.* [143] ont développé un système dans lequel un orifice permet la focalisation en trois dimensions de la phase dispersée (Figure 1-14, gauche). Dans la géométrie développée par Weitz *et al.* [136], la phase dispersée et la phase continue sont toutes les deux introduites dans le canal externe par les extrémités opposées (Figure 1-14, droite). L'extrémité du capillaire circulaire interne permet de focaliser la phase dispersée et de favoriser la formation de gouttes. Les gouttes produites peuvent alors avoir un diamètre très inférieur au diamètre du capillaire, contrairement à celles obtenues avec les dispositifs co-axiaux où les deux phases circulent dans les mêmes directions. Toutefois, comme pour ces derniers, la fabrication nécessite une expertise dans la procédure et **les dispositifs sont généralement peu reproductibles**.

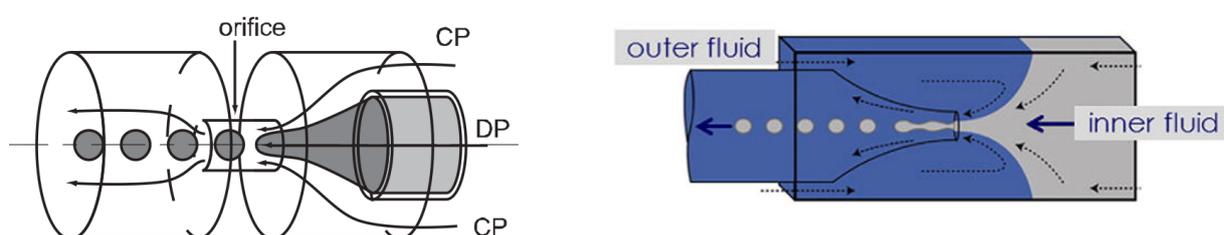


Figure 1-14: Géométries co-axiales à focalisation d'écoulement : (gauche) Géométrie développée par Takeuchi *et al.* [143] : la phase dispersée est confinée au centre du canal par la présence d'un orifice ; (droite) Géométrie développée par Weitz *et al.* [136] : les phases dispersée et continue sont introduites dans le canal externe par les extrémités opposées et le capillaire interne permet la focalisation de la phase dispersée.

Dans tous ces dispositifs, les gouttes formées ont une taille précisément contrôlée par la taille des canaux ou capillaires. **Les gouttes sont donc de taille micrométrique et fortement monodisperses (CV<3%), quelle que soit la viscosité de la phase dispersée. La microfluidique est donc appropriée pour l'encapsulation de cellules pour la thérapie cellulaire.**

1.3.2.5 Intégration de la gélification en microsystème

Les deux méthodes de gélification externe et interne utilisées dans les techniques macroscopiques classiques ont été intégrées dans des systèmes microfluidiques. Le Tableau 1-5 récapitule les différentes méthodes de gélification de capsules d'alginate en microsystème.

Les meilleures performances ont été obtenues par Agarwal *et al.* [144] qui produisent des capsules lisses et sphériques où les cellules encapsulées ont une viabilité supérieure à 92%. Cependant, leur méthode utilise des tensioactifs qui peuvent être toxiques pour les cellules. Leur méthode n'est donc pas applicable pour la thérapie cellulaire. **Il n'existe pas encore à l'heure actuelle de méthodes de gélification permettant d'obtenir à la fois des capsules monodisperses, lisses et sphériques avec un procédé non toxique sans l'utilisation de tensioactifs.**

La méthode proposée par Kumacheva *et al.* [3] consistant à disperser des cristaux d'acétate de calcium (AC) dans de l'huile de soja (HS) (Figure 1-15) est actuellement la méthode la plus adaptée pour satisfaire la viabilité des cellules.

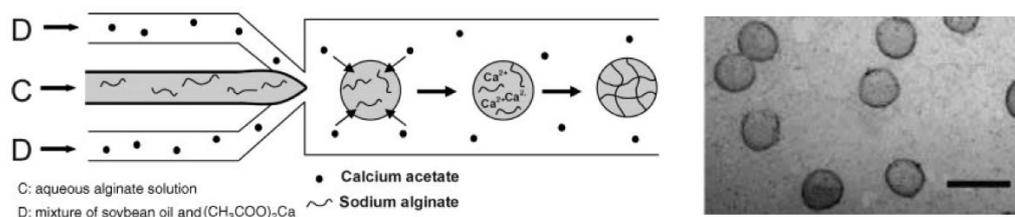


Figure 1-15: Gélification par des cristaux d'acétate de calcium dispersés en huile de soja [3]. (gauche) Principe : les cristaux d'acétate de calcium non solubles dans l'huile de soja se dissolvent au contact des gouttes d'alginate, permettant alors la libération du calcium et la gélification des gouttes d'alginate. (droite) Capsules obtenues. La barre d'échelle correspond à 100 μm .

Méthode	Agent gélifiant	Milieu contenant l'agent gélifiant	Forme des capsules	Polydispersité (CV)	Biocompatibilité (viabilité)	Référence
GELIFICATION INTERNE						
<i>Gélification interne</i>	CaCO ₃	alginate	sphérique	<3% (fortement dépendante de la concentration en CaCO ₃ et en acide acétique)	<75%	Workman [145], [146], Tan [147], Capretto [148], Akbari [149]
GELIFICATION EXTERNE						
<i>Coalescence des gouttes d'alginate avec des gouttes de solution gélifiante</i>	CaCl ₂	gouttes de solution aqueuse	non sphérique		Viabilité non affectée	Hong [150], Shintaku [151], Um [152]
	CaCl ₂	gouttes de solution aqueuse	sphérique et ellipsoïdale	>11% sans cellules, 28% avec cellules	70%	Sugiura [153]
	CaCl ₂	gouttes de solution aqueuse	sphérique	<3,6%	--	Liu [154], [155]
<i>Mélange au niveau de la jonction</i>	CaCl ₂	solution aqueuse	sphérique	<2,5%		Rondeau [156], Choi [157]
<i>Co-écoulement</i>	CaCl ₂	solution aqueuse	sphérique	<2%		Xu [158]
<i>Agent gélifiant en phase organique</i>	Acétate de calcium (cristaux)	huile de soja	cabossée		Viabilité non affectée	Kumacheva [3]
	CaI ₂ (cristaux)	undecanol	sphérique			Zhang [159]
	CaCl ₂ (dissout)	acide oléique	sphérique		25 à 90%	Kim [160], [161], Lee [162]
	CaCl ₂ (dissout)	Huile minérale + tensioactifs	sphérique, lisse		>92%	Agarwal [144]

Tableau 1-5: Récapitulatif des méthodes de gélification en microsystèmes : avantages (en vert) et inconvénients (en rouge)

1.3.2.6 Transfert en solution physiologique en microsystème

Plusieurs systèmes ont été développés permettant le transfert des capsules de la phase organique vers une phase de solution aqueuse biocompatible [163][164][165] (Figure 1-16). L'intégration du transfert en microsystème permet d'une part de contrôler les temps de gélification et d'autre part d'automatiser le procédé en s'affranchissant des nombreuses étapes de transfert manuel effectuées classiquement. **Grâce à l'automatisation, ces systèmes permettent donc d'augmenter la reproductibilité des capsules.**

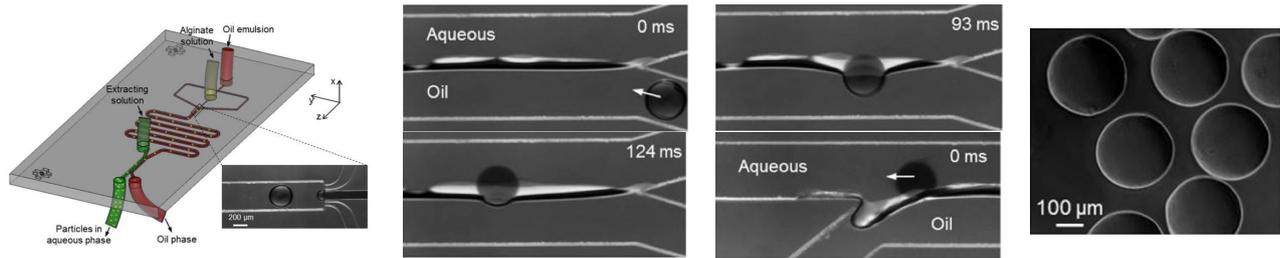


Figure 1-16: Transfert de phase développé par Huang *et al.* [165] : les capsules sont transférées de l’huile vers la solution grâce à des dimensions particulières des canaux et à la tension interfaciale. Les capsules obtenues semblent sphériques et monodisperses.

1.3.3 Comparaison des techniques et avantages de la microfluidique

Le Tableau 1-6 et la Figure 1-17 comparent les techniques classiques et microfluidiques décrites précédemment.

	Techniques classiques		Techniques microfluidiques
	Extrusion ou segmentation d’un jet et gélification externe	Emulsification et gélification interne	
Taille	200 – 300 µm — uniquement à très faible viscosité	200 – 1000 µm	+ 5 – 500 µm précisément contrôlée
Polydispersité	— CV > 10 %	— CV > 30 %	+ CV < 3 %
Viscosité	— < 500 mPa.s		+ > 20 Pa.s
Productivité	+ Très élevée (≈ 6000 capsules/min) mais viscosité très faible	+	+ 400 capsules/min — (200 µm, 4 Pa.s)
Gélification	+ Biocompatibilité — Variabilité du temps de gélification au sein d’un lot	— à pH < 6 — Agglomération des capsules lors de la gélification	+ Biocompatibilité dépendante de la méthode utilisée Contrôle et reproductibilité du temps de gélification
Rincage et transfert en solution physiologique	— Transferts manuels (coûteux en temps et dépendant de l’expérimentateur)	— Transferts manuels (coûteux en temps et dépendant de l’expérimentateur)	+ Automatisation des changements de phases

Tableau 1-6 : Comparaison des techniques classiques et microfluidiques d’encapsulation : avantages (+) et inconvénients (—).

Contrairement aux techniques classiques, la microfluidique permet de générer des gouttes d’alginate de taille inférieure à 200 µm, monodisperses (CV<3%), à partir de solutions très visqueuses (Figure 1-17), permettant alors d’obtenir des **capsules adaptées à l’encapsulation de cellules**. L’intégration de la gélification et du transfert en solution physiologique au sein du microsystème permet un contrôle du temps de gélification et une automatisation du rinçage et du transfert des capsules permettant ainsi d’obtenir un **procédé en continu, automatique et reproductible**.

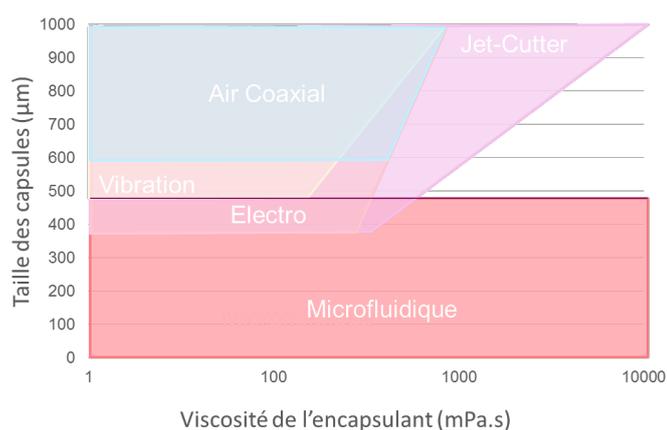


Figure 1-17 : Régimes de fonctionnement des différentes techniques d'encapsulation : gamme de tailles de gouttes en fonction de la viscosité du polymère d'encapsulation

Toutefois, la productivité des systèmes actuels ne permet pas d'atteindre les performances nécessaires à la production de cellules encapsulées pour la thérapie cellulaire du diabète ($\approx 11\ 000$ capsules/kg de patient en 2h). **L'augmentation de la fréquence de production est donc l'un des challenges de la production de capsules en microfluidique.**

D'autre part, les procédés de gélification en microsystèmes ne permettent pas à l'heure actuelle d'obtenir des capsules répondant aux critères de sphéricité requis tout en utilisant un procédé biocompatible. La mise au point des procédés est donc encore en cours de développement.

BILAN SUR LES TECHNIQUES D'ENCAPSULATION

- Les techniques classiques ont une productivité importante mais la taille, la polydispersité et la viscosité maximale ne sont pas adaptés à l'encapsulation de cellules.
- Les techniques microfluidiques permettent de produire des gouttes de taille adaptée à l'encapsulation de cellules, quelle que soit la viscosité de la phase dispersée.
- La microfluidique présente également l'avantage de permettre l'automatisation des différentes étapes de fabrication des capsules (formation, gélification, transfert en solution physiologique).
- Toutefois, la productivité des systèmes actuels ne permet pas d'atteindre les performances nécessaires à la production de cellules encapsulées pour la thérapie cellulaire du diabète ($\approx 11\ 000$ capsules/kg de patient en 2h).
- Les challenges résident donc dans l'augmentation de la productivité et l'optimisation des procédés de gélification intégrés en microsystèmes.

1.4 Bilan et choix pour la thèse

Les premiers résultats d'essais cliniques d'implantation d'îlots de Langerhans microencapsulés ont démontré la faisabilité de la greffe d'îlots, humains et non humains, sans utilisation d'immunosuppresseurs, prouvant ainsi l'intérêt de l'encapsulation. Toutefois, la transplantation d'îlots microencapsulés présente encore des limitations. **Les challenges actuels sont donc de réduire la taille des capsules, d'optimiser leur état de surface et d'augmenter leur résistance mécanique afin d'améliorer leur biocompatibilité et leur fonctionnalité.** Les recherches et développements actuels portent alors à la fois sur le matériau et sur la technique d'encapsulation.

Autour de la plateforme microfluidique d'encapsulation cellulaire développée au laboratoire, cette thèse se focalise sur deux aspects de la technique d'encapsulation : l'optimisation de la productivité de génération de gouttes et l'encapsulation multicouche.

En ce qui concerne le matériau d'encapsulation, nous avons choisi celui qui montre à l'heure actuelle les performances les plus favorables : l'alginate. Toutefois, le type d'alginate idéal pour l'encapsulation de cellules pour la thérapie cellulaire n'a pas encore été déterminé. Il semble néanmoins préférable de produire les capsules à partir d'un alginate de forte viscosité (HV) (>500 mPa.s) afin d'obtenir une biocompatibilité et des propriétés mécaniques appropriées. D'autre part, les études montrent qu'il est nécessaire que l'alginate soit purifié. L'alginate ultra-pur NovaMatrix est à l'heure actuelle l'alginate commercial le plus pur disponible sur le marché. **L'alginate Pronova™ SLG100, ultra-pur et de haute viscosité (G/M<1, viscosité 100-300 mPa.s à 1%, M_w 150-250 kDa), commercialisé par NovaMatrix a donc été choisi comme polymère d'encapsulation dans le cadre de cette thèse.**

Pour la gélification des capsules, nous avons sélectionné la méthode qui est actuellement la plus adaptée pour satisfaire la viabilité des cellules : la méthode proposée par Kumacheva *et al.* [3] consistant à disperser des cristaux d'acétate de calcium (AC) dans de l'huile de soja (HS). **Il a donc été choisi de former les gouttes d'alginate en huile de soja puis de les pré-gélifier en introduisant de l'huile de soja contenant 3% w/w d'acétate de calcium, avant que ces dernières complètent leur gélification en bain de calcium.**

Parmi les différents dispositifs microfluidiques de génération de gouttes, la géométrie MFFD et notamment celle proposée par Tan *et al.* [142] montre les performances les plus favorables en termes de monodispersité de la taille des gouttes et de reproductibilité de fabrication des dispositifs. **Une géométrie MFFD semblable à celle de Tan *et al.* [142] a donc été choisie pour la formation de gouttes dans le cadre de cette thèse.**

Chapitre 2

MATERIELS ET METHODES

2.1	Systèmes microfluidiques et banc expérimental	57
2.1.1	Géométries employées pour la formation de gouttes et de capsules	57
2.1.2	Fabrication des puces microfluidiques	58
2.1.3	Traitement de surface	59
2.1.4	Banc expérimental	60
2.1.4.1	Contrôle fluidique	60
2.1.4.2	Connectiques	61
2.1.4.3	Microscopes et caméra	61
2.2	Préparation des phases utilisées	62
2.2.1	Phases dispersées utilisées	62
2.2.2	Phases continues	62
2.2.3	Phase pré-gélifiante	63
2.2.4	Bain de calcium et sérum physiologique	63
2.3	Caractérisation des propriétés physico-chimiques des solutions	63
2.3.1	Caractérisation rhéologique des phases dispersées	63
2.3.2	Viscosité des phases continue et pré-gélifiante	64
2.3.3	Tension interfaciale entre les deux phases	65
2.4	Caractérisation des écoulements	65
2.4.1	Mesure expérimentale des débits de phase continue	65
2.4.2	Micro-PIV (<i>Particle Image Velocimetry</i>)	66
2.4.3	Confidentiel	68
2.5	Caractérisation des gouttes et capsules	69
2.5.1	Taille des gouttes	69
2.5.2	Fréquence de production des gouttes	69
2.5.3	Caractérisation de la couche dans le cas de l'encapsulation multicouche	69
2.6	Encapsulation cellulaire	70
2.6.1	Préparation préalable du banc expérimental	70
2.6.2	Préparation des solutions tampons	70
2.6.3	Préparation des phases de polymère avec et sans cellules	70
2.6.4	Récolte des capsules et conservation	71

Ce chapitre décrit les systèmes microfluidiques et les fluides employés au cours de cette thèse ainsi que les méthodes expérimentales utilisées.

2.1 Systèmes microfluidiques et banc expérimental

2.1.1 Géométries employées pour la formation de gouttes et de capsules

La géométrie employée dans le cadre de cette thèse est identique à la géométrie employée dans la plateforme CellEnc® élaborée dans le laboratoire (Figure 2-1). Cette géométrie est constituée par :

- **un module de génération de gouttes de type MFFD** semblable à la géométrie de Tan *et al.* [142]. Dans cette géométrie, la phase dispersée, formant les gouttes, s'écoule dans un canal central et une phase continue, non miscible avec la phase dispersée, s'écoule dans deux canaux perpendiculaires. La jonction entre les deux phases, où sont formées les gouttes, est suivie d'une chambre triangulaire permettant de focaliser la rupture des gouttes au niveau de la jonction.
- **un module de pré-gélification**, à la suite du MFFD, constitué de deux canaux périphériques de part et d'autre du canal central. Dans ces canaux s'écoule de l'huile contenant un agent gélifiant. L'introduction de cette huile pré-gélifiante permet de commencer à gélifier les gouttes d'alginate au sein du microsystème, avant qu'elles ne soient transférées en bain de calcium afin de les gélifier entièrement. Cette pré-gélification est nécessaire pour ne pas que les capsules soient déformées lors du passage de l'interface entre la phase continue et le bain de calcium.

(a)

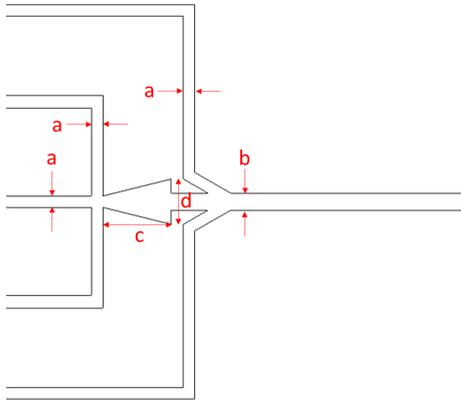
(b)

CONFIDENTIEL

CONFIDENTIEL

Figure 2-1 : Système microfluidique de génération de capsules utilisé dans le cadre de cette thèse : (a) module de génération de gouttes ; (b) module de pré-gélification des capsules

Au cours de ce travail, deux géométries de ce type (A et B), qui diffèrent par la largeur des canaux, ont été utilisées. Les dimensions principales sont données dans le Tableau 2-1. La profondeur des canaux est de 200 μm pour les deux géométries.



	Géométrie A	Géométrie B
a	CONFIDENTIEL	
b		
c		
d		

Tableau 2-1 : Dimensions des canaux des géométries utilisées

La géométrie développée pour l'encapsulation multicouche et étudiée dans la partie II de cette thèse sera présentée au Chapitre 8.

2.1.2 Fabrication des puces microfluidiques

Les puces microfluidiques ont été fabriquées en polydiméthylsiloxane (PDMS) par les techniques standard de micro-fabrication. Cette technique consiste à couler du PDMS (élastomère) non réticulé sur un moule en résine ou un film sec. Le PDMS est ensuite réticulé puis démoulé. Le PDMS est enfin collé sur un substrat plan par activation des surfaces par traitement plasma.

Dans cette thèse, le moule a été réalisé en utilisant un film sec photosensible, l'Ordyl® (Elga Europe). Ce film est laminé sur un wafer en silicium (épaisseur de 200 μm) puis structuré par les techniques standard de photolithographie en utilisant un masque souple sur lequel sont imprimés les motifs des canaux.

Le protocole de fabrication des puces PDMS est alors le suivant :

- le PDMS (Sylgard® 184, Base, Dow Corning) est mélangé avec un agent réticulant (Sylgard® 184, Curing agent, Dow Corning) (1/10 en masse)
- ce mélange est coulé sur le moule puis placé sous une cloche à vide afin d'éliminer les bulles d'air emprisonnées dans le PDMS non réticulé
- le moule contenant le PDMS est placé dans une étuve à 80°C pendant un minimum de deux heures afin de réticuler le PDMS par activation thermique
- après réticulation, le PDMS est délicatement démoulé. Les canaux microfluidiques sont alors répliqués dans le PDMS. Les trous pour les entrées et sorties des canaux sont percés à l'aide d'un poinçon.
- la surface du PDMS sur laquelle les canaux sont présents ainsi que la lame de verre servant de substrat sont activées par un traitement plasma à oxygène (2 min à 200 W).

- Après traitement plasma, les deux surfaces sont rapidement mises en contact. Le collage est alors quasi-instantané.
- Le collage est ensuite consolidé par un recuit de 1 nuit à 80°C.

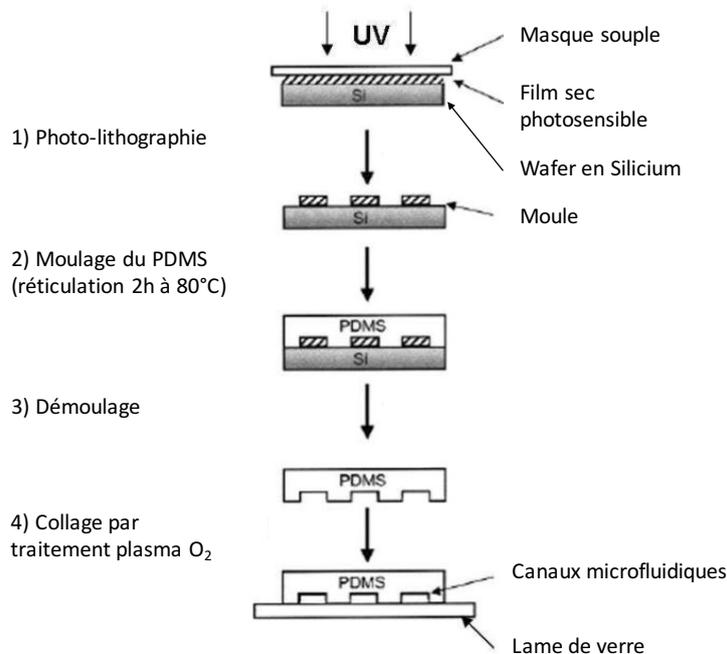


Figure 2-2 : Etapes de fabrication des puces en PDMS (d'après MacDonald *et al.* [166])

2.1.3 Traitement de surface

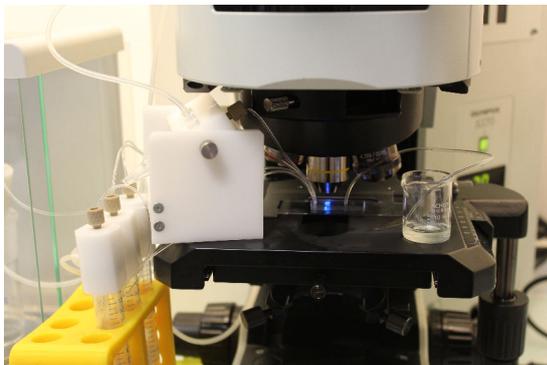
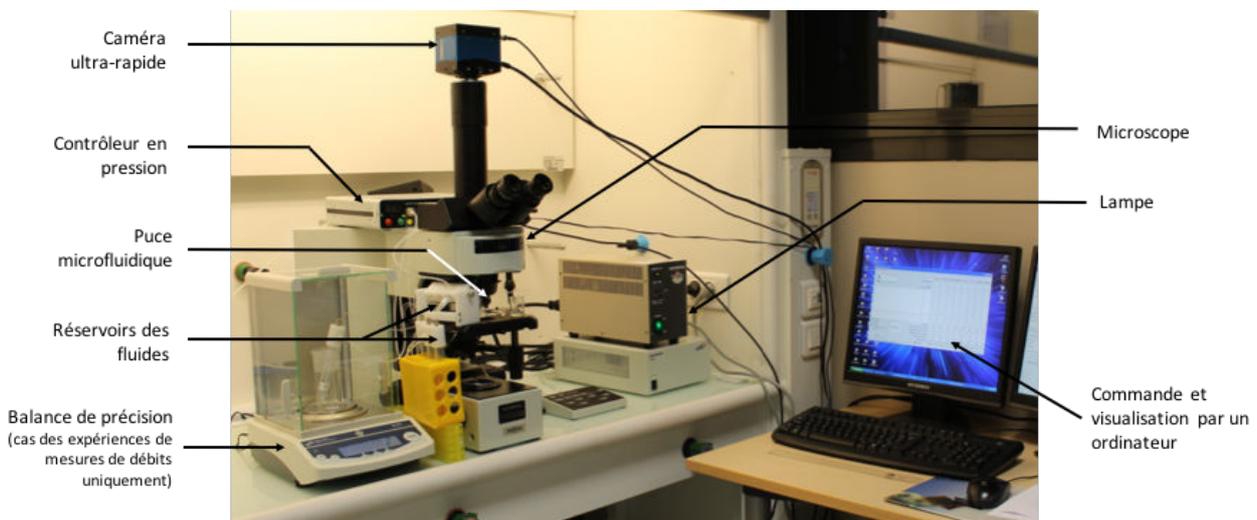
La mouillabilité des parois des canaux est un paramètre important pour favoriser le détachement des gouttes et la formation de gouttes monodisperses. Pour cela, il est nécessaire que la phase dispersée ne mouille pas les parois. Dans le cas de formation de gouttes de solution aqueuse dans de l'huile, il est donc nécessaire que la surface des canaux soit hydrophobe. La mouillabilité appropriée peut être obtenue soit par l'utilisation de tensioactifs soit par des chimies de fonctionnalisation de surface.

CONFIDENTIEL

2.1.4 Banc expérimental

L'ensemble des éléments composant le banc expérimental sont représentés sur la Figure 2-3 et détaillés dans ce paragraphe. Le banc expérimental se compose par :

- la puce microfluidique décrite précédemment
- un système de contrôle des fluides (contrôleur en pression)
- des réservoirs contenant les fluides et les connectiques reliant ces réservoirs à la puce
- un microscope et une caméra pour le suivi des expériences
- un ordinateur pour la visualisation et la commande du contrôleur en pression



CONFIDENTIEL

Figure 2-3 : Banc expérimental : banc complet, zoom sur la plateforme du microscope et zoom sur la puce microfluidique

Dans le cas des expériences de formation de gouttes présentées dans la partie I, les capsules ne sont pas conservées : le tube de sortie est mis dans un bécher de récupération. Dans le cas des expériences d'encapsulation multicouche, les capsules produites sont récupérées dans un tube Eppendorf de 2 mL contenant 500 μ L de bain gélifiant (solution de calcium).

2.1.4.1 Contrôle fluidique

Dans la plupart des systèmes microfluidiques décrits dans la littérature, les fluides sont mis en mouvement par des pousses-seringues, imposant un débit. Cependant, ce type de contrôle implique des fluctuations du

débit autour de la valeur consigne. Dans le cas des systèmes de contrôle en pression, les fluctuations autour de la pression imposée sont négligeables et les temps de réponse sont très courts. C'est ce type de contrôle qui est utilisé dans la plateforme CellEnc et qui est donc également utilisé dans le cadre de cette thèse.

La mise en mouvement des fluides est ici contrôlée à l'aide d'un contrôleur en pression commercialisé par la société Fluigent. Le modèle utilisé comporte 8 voies pouvant délivrer entre 0 et 1 bar (MFCS-8C, 0-1 bar). Une interface logicielle permet de commander individuellement la pression appliquée à chacune des 8 voies. Le principe est le suivant (Figure 2-4). Le contrôleur en pression est relié aux réservoirs contenant les fluides à mettre en mouvement. La pression délivrée P_F est appliquée à la surface du fluide dans le réservoir et pousse le fluide dans le tube de connectique reliant le réservoir à la puce microfluidique.

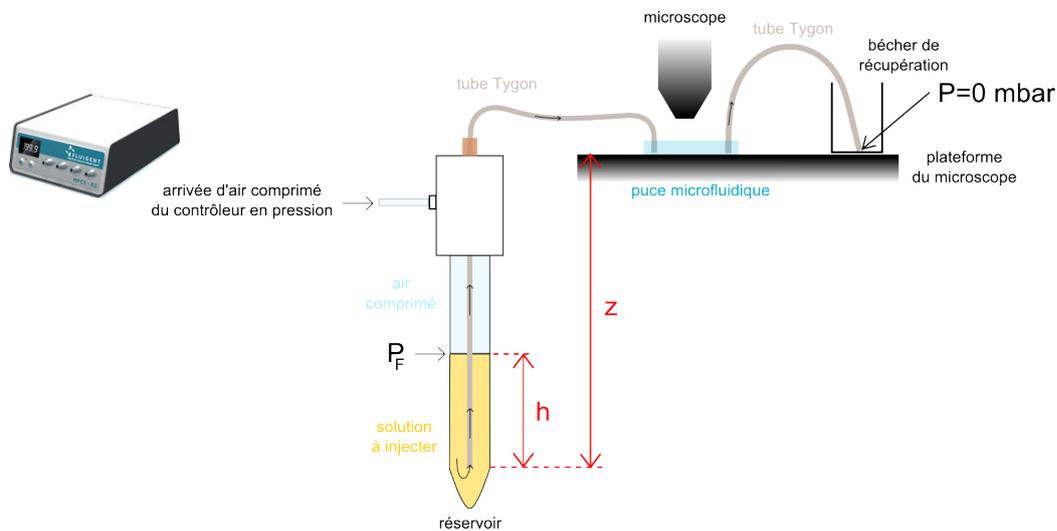


Figure 2-4 : Principe de fonctionnement du contrôleur en pression

2.1.4.2 Connectiques

Les tubes de connectiques sont des tubes Tygon® (S-54-HL) de diamètre interne $510 \mu\text{m}$. La longueur des tubes reliant les réservoirs de phase continue et d'huile pré-gélifiante à la puce est de 30 cm dans le cas général et de 45 cm dans le cas des expériences de mesure expérimentale de débit de la phase continue. Le tube reliant le réservoir de phase dispersée à la puce microfluidique a une longueur de 16 cm. Dans le cas des expériences de formation de gouttes présentées dans la partie I de la thèse, la longueur du tube de sortie est de 20 cm pour la géométrie A et de 40 cm pour la géométrie B. Dans le cas des expériences d'encapsulation multicouche, cette longueur est de 40 cm. Lors des expériences d'encapsulation de cellules présentées au Chapitre 8, cette longueur a été ajustée selon les expériences afin d'obtenir des capsules correctement gélifiées.

2.1.4.3 Microscopes et caméra

La visualisation des expériences a été réalisée en utilisant un microscope Olympus PROVIS AX70 muni d'un adaptateur Olympus U-CMAD-2 et d'objectifs Olympus 5x et 10x, d'une lampe et d'une caméra ultra-rapide

Mikrotron (GmbH, MotionBlitz EoSens) capable d'enregistrer jusqu'à 1400 images/s pour la fenêtre d'observation utilisée.

Dans le cas des expériences en fluorescence décrites pour l'encapsulation multicouche, il a été utilisé le microscope Olympus BX 60 muni d'un filtre FITC, une lampe à vapeur de mercure et une caméra Mightex (BTE-B050-U) avec un temps d'acquisition de 30 à 100 ms.

Dans le cas des expériences d'encapsulation de cellules, les expériences ont été suivies en utilisant un microscope Olympus IX50 muni de la caméra ultra-rapide Mikrotron.

2.2 Préparation des phases utilisées

2.2.1 Phases dispersées utilisées

Le polymère choisi pour l'encapsulation dans le cadre de cette thèse est l'alginate ultra-pur Pronova™ SLG100 commercialisé par NovaMatrix. Ce polymère est conditionné en bouteille stérile de 250 mg.

Dans le cadre de l'étude de la partie I, cet alginate a été utilisé aux concentrations suivantes : 1%, 2%, 3% et 4% wt/wt. Les solutions ont été préparées en solubilisant cet alginate dans une solution aqueuse de NaCl (Sigma-Aldrich, S9625) à 150 mM et HEPES (Gibco®, 15630-056) à 10 mM préalablement ajustée à pH=7,4 puis filtrée à l'aide de filtres 0,22 µm (Millipore, Millex®-GV Hydrophilic PDVF, 0.22 µm). Les solutions ont été mises sous agitation magnétique à température ambiante pendant 4 heures minimum, de façon à bien solubiliser le polymère.

Dans la partie I, des solutions de Ficoll (Ficoll® PM 400, Sigma-Aldrich) ont également été utilisées. Le Ficoll est un polymère de sucrose de haut poids moléculaire, formé par co-polymérisation de sucrose et d'épichlorohydrine. Les solutions de Ficoll ont été préparées dans de l'eau déionisée à des concentrations comprises entre 0,20 g/mL et 1,33 g/mL. Les solutions ont été mises sous agitation magnétique à température ambiante ou T=50°C (cas de la solution à 1,33 g/mL) pendant une durée pouvant aller d'un jour à 1 semaine selon la concentration.

Dans le cadre de l'étude de la partie II, des solutions fluorescentes d'alginate ont été utilisées. Pour cela, de l'alginate greffé avec de la fluoresceine (AL-501, Creative PegWorks) a été mélangé à l'alginate SLG100 dans une proportion de 1/20 en masse. Les solutions ont ensuite été préparées comme les solutions non fluorescentes d'alginate, par dissolution du mélange de polymère dans la solution de NaCl à 15 mM et HEPES à 10 mM.

Par la suite, les concentrations d'alginate solutions d'alginate sont exprimées en %. Cette notation sous-entend % wt/wt.

2.2.2 Phases continues

La phase continue choisie pour l'encapsulation est l'huile de soja (Super-refined soybean oil, USP EP LQ MH, Croda), notée HS.

Dans le cadre de l'étude de la partie I, de l'acide oléique (75096, Sigma-Aldrich), noté AO, et de l'huile de paraffine (18-512, Sigma-Aldrich), notée HP, ont également été utilisées afin d'étudier l'influence de la

viscosité de la phase continue sur la formation des gouttes. Des solutions de HS contenant 0 à 0,5% wt/wt de tensioactifs Span™ 80 (Span80™ V Pharma, Croda) ont également été utilisées pour étudier l'influence de la tension interfaciale sur la formation des gouttes.

2.2.3 Phase pré-gélifiante

La phase pré-gélifiante est une solution d'huile de soja contenant 3% wt/wt de cristaux d'acétate de calcium (AC) (Calcium Acetate FCC/poudre, Macco Organiques Inc., 08-125). Cette solution est notée HS+3%AC.

CONFIDENTIEL

2.2.4 Bain de calcium et sérum physiologique

La solution gélifiante (bain de calcium) et la solution de rinçage et conservation des capsules (sérum physiologique) sont composées de NaCl (Sigma-Aldrich, S9625), CaCl₂ (Sigma-Aldrich, C1016) et HEPES (Gibco®, 15630-056) dans les concentrations décrites dans le Tableau 2-2.

	NaCl	CaCl ₂	HEPES
Bain de Calcium	80 mM	100 mM	25 mM
Sérum physiologique	150 mM	2 mM	10 mM

Tableau 2-2 : Composition chimique des solutions de bain de calcium et sérum physiologique

Le pH de ces solutions est ajusté à pH=7,4 par ajout de quelques gouttes de solution de NaOH et l'utilisation d'un pHmètre (MeterLab®, PHM220). Les solutions sont ensuite filtrées (Pall, Acrodisc® Syringe Filter Supor® Membrane, 0.2 µm, PN4602).

2.3 Caractérisation des propriétés physico-chimiques des solutions

2.3.1 Caractérisation rhéologique des phases dispersées

Les propriétés rhéologiques (viscosité de cisaillement, modules élastiques et visqueux) des différentes phases dispersées utilisées ont été caractérisées au rhéomètre (Malvern Bohlin Gemini) muni d'un cône 1/60 (1°, 60 mm de diamètre) (Figure 2-5). Les mesures ont été effectuées sur un volume d'échantillon de 1,5 mL. La plateforme sur laquelle est déposée la solution est réglée en température. Les mesures ont été effectuées à 20°C, 22,5°C, 25°C ou 37°C.

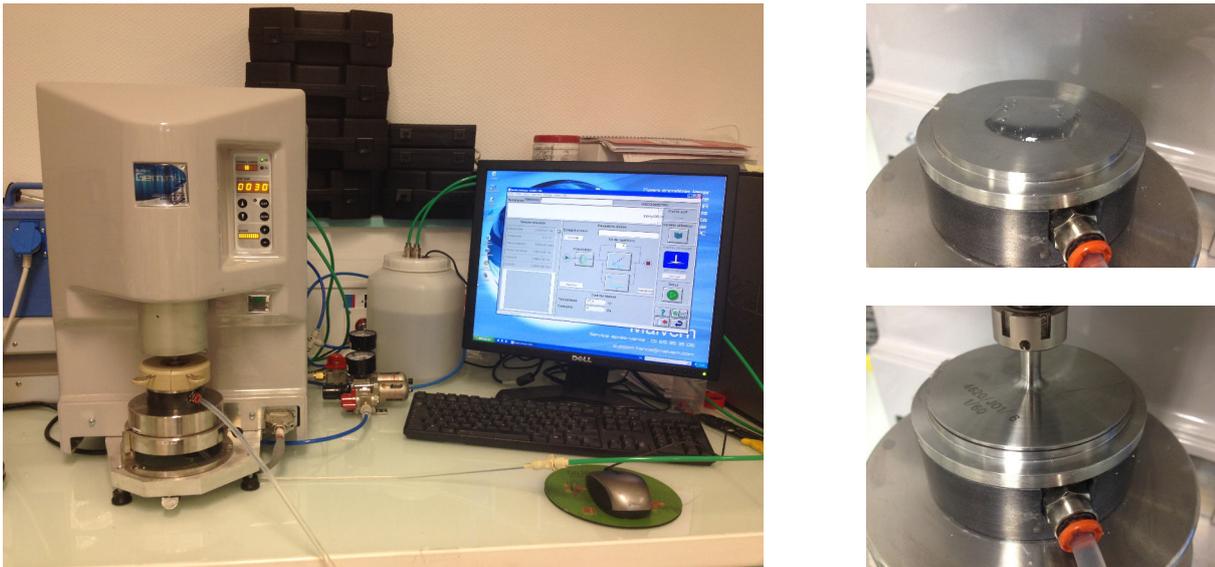


Figure 2-5 : Rhéomètre cône-plan pour la caractérisation rhéologique des phases dispersées

Pour les mesures de viscosité dynamique de cisaillement, il a été utilisé le mode « Viscosimétrie » et une gamme de cisaillement allant de $0,001 \text{ s}^{-1}$ à 1000 s^{-1} (cisaillement maximal permettant d'obtenir une mesure fiable). Par mesure d'économie, les mesures à différentes températures ont été effectuées sur un même échantillon de 1,5 mL de solution.

Pour les mesures des modules élastique et visqueux, il a été utilisé le mode « Oscillation ». Ces mesures ont été effectuées sur la solution d'alginate à 4% et sur la solution de Ficoll à 1,33 g/mL. Dans un premier temps, il a été effectué des mesures en oscillation avec balayage en déformation (de 0,1% à 100%) à fréquence imposée (0,1 Hz, 1 Hz ou 10 Hz) afin de déterminer le taux de déformation pour lequel la solution de polymère répond correctement à la sollicitation et la viscoélasticité est linéaire. Pour les deux solutions, le taux de déformation choisi est 10%. Ensuite, des mesures en oscillation avec balayage en fréquence (de 0,1 Hz à 100 Hz) à 10% de déformation ont été réalisées. Par mesure d'économie, les différentes mesures avec balayage en fréquence et balayage en déformation ont été réalisées sur le même échantillon de 1,5 mL de solution.

Les résultats des mesures sont présentés au Chapitre 4.

2.3.2 Viscosité des phases continue et pré-gélifiante

La viscosité des solutions utilisées comme phase continue a été mesurée grâce au viscosimètre Brookfield DVII Pro+ muni du cône SP45. Chaque mesure a été effectuée sur un volume d'huile de 200 μL . La mesure a été effectuée deux fois sur un même échantillon de 200 μL et a été répétée au minimum sur $n=3$ échantillons d'une même solution. Les valeurs présentées correspondent à la moyenne des 2 fois n valeurs obtenues. La barre d'erreur correspond à l'écart type calculé sur les moyennes obtenues pour chacun des n échantillons.

Les valeurs de viscosité des différentes phases continues et de la phase pré-gélifiante sont présentées au Chapitre 4.

2.3.3 Tension interfaciale entre les deux phases

Les mesures de tension interfaciale ont été réalisées grâce à l'équipement Kruss DSA100 en utilisant la méthode de la goutte pendante. Les différentes huiles ont été déposées dans des cuves en plastique utilisées pour la spectroscopie. L'eau déionisée ou les solutions aqueuses d'alginate et de Ficoll ont été introduites dans une seringue (500 μL , Gastight 1750 PLL, Hamilton®) munie d'une aiguille de diamètre interne 0,25 mm et de diamètre externe 0,52 (gauge 25, PN 7018345, EDF Nordson®). Pour les mesures avec l'alginate 4% et le Ficoll 1,33 g/mL, une aiguille de diamètre interne 1,54 mm et de diamètre externe 1,83 (gauge 14, PN 7018043, EDF Nordson®) a été employée.

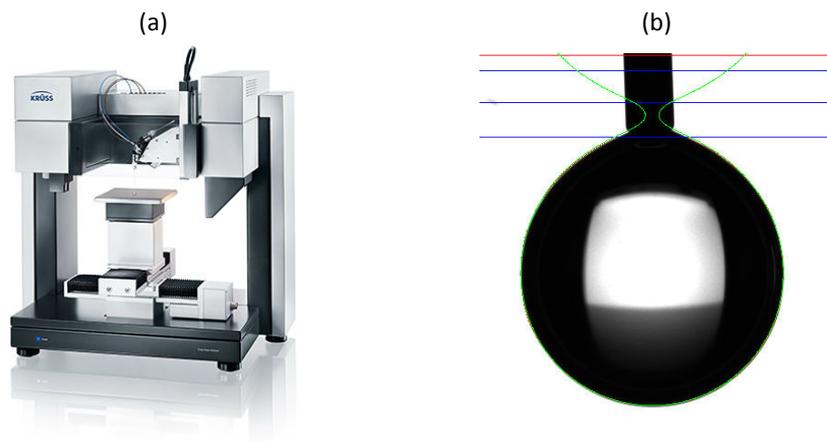


Figure 2-6 : Mesure de tension interfaciale : (a) Equipement Kruss DSA100 ; (b) Mesure par la méthode de la goutte pendante

Pour chaque huile, le volume de la goutte formée a été ajusté de façon à optimiser la mesure (ajustement de la courbe du modèle sur le contour de la goutte, Figure 2-6 (b)). La mesure de tension interfaciale a été effectuée toutes les 30 s pendant 2 min sur une même goutte de solution aqueuse. Cette mesure a été répétée au minimum sur $n=5$ gouttes de solution aqueuse pour chaque huile. Les valeurs présentées correspondent à la moyenne des valeurs obtenues sur les différentes gouttes formées pour une même huile. Les barres d'erreur représentées correspondent à l'écart-type calculé sur les n moyennes obtenues pour chaque goutte (et non sur les valeurs obtenues pendant les 2 min sur une même goutte).

2.4 Caractérisation des écoulements

2.4.1 Mesure expérimentale des débits de phase continue

Des expériences de mesures expérimentales de débits de phase continue ont été réalisées dans le but d'étudier la validité des différents modèles analytique et numériques mis en place (Chapitre 5).

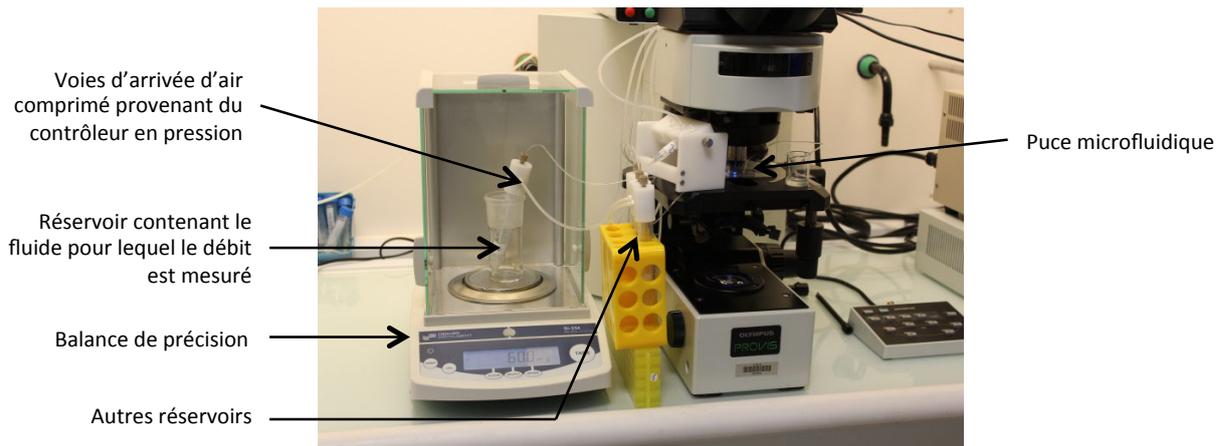


Figure 2-7 : Banc expérimental mis en place pour les mesures de débits

Pour cela, il a été effectué des mesures de perte de masse d'un des réservoirs d'entrée (de phase continue ou pré-gélifiante) en fonction du temps (Figure 2-7). De façon pratique, ce dernier est disposé sur une balance de précision, en s'assurant qu'il soit à la même hauteur que les autres réservoirs utilisés (cf. Chapitre 4). Les pressions testées sont appliquées au système puis au temps $t=0$ min, la balance est tarée et le chronomètre est déclenché. Au temps t_i , la perte de masse m_i est relevée et le débit est calculé par la relation suivante :

$$Q_i = \frac{(m_i - m_{i-1})}{M_v * (t_i - t_{i-1})} * 10^{-3}$$

où Q_i est le débit mesuré (en $\mu\text{L}/\text{min}$) entre le temps t_{i-1} et t_i , m_i est la perte de masse mesurée (en g) sur la balance au temps t_i (exprimé en min) et M_v est la masse volumique de l'huile de soja ($M_v = 0,922$ g/mL).

2.4.2 Micro-PIV (*Particle Image Velocimetry*)

Des expériences de micro-vélocimétrie par image de particules (micro-PIV) ont été effectuées dans le but de déterminer les champs de vitesse des phases dispersée et continue lors de la génération de gouttes, afin de caractériser le taux de cisaillement. Le principe de cette technique est de suivre le déplacement de particules fluorescentes introduites dans la solution dont on souhaite déterminer le champ de vitesse, sur une durée précise. Pour cela, les particules fluorescentes sont imagées à haute fréquence puis les images, acquises dans un même plan de l'écoulement, sont corrélées grâce à un algorithme de façon à déterminer leur déplacement entre deux images. Les vitesses sont alors déduites du déplacement connaissant le délai entre deux acquisitions d'images. Elles correspondent à la moyenne des vitesses dans l'épaisseur du plan focal.

Ces expériences ont été réalisées avec de l'alginate 3% et du Ficoll 1,174 g/mL comme phase dispersée, de l'huile de soja comme phase continue et une solution de HS+3%AC comme phase pré-gélifiante.

Des billes fluorescentes (Ex 468/Em 508 nm) de 3 μm de diamètre (G0300, Duke Scientific) ont été suspendues dans les solutions d'alginate, de Ficoll et d'huile de soja. Dans le cas de l'alginate et du Ficoll, 20 μL de solution mère de billes (à $6,7 \cdot 10^8$ billes/mL) ont été filtrés puis incorporés directement dans 1 mL de ces solutions. Dans le cas de l'huile de soja, 400 μL de solution mère de billes ont été filtrés puis rincés 2 fois avec 400 μL de méthanol. Les billes filtrées ont ensuite été incorporées dans 20 mL d'huile de soja. La

solution a été vortexée puis placée dans un bain à ultrasons chauffé à 30°C pendant 10 min afin de bien disperser les billes.

Ces expériences ont été réalisées en utilisant la géométrie A décrite au paragraphe 2.1.1. Il a été utilisé un microscope Nikon Eclipse Ti muni d'un objectif 20x et d'un cube de filtres « FITC » (Ex 472/30, Em 520/35, DM 495). L'acquisition des images a été effectuée avec une caméra ultra-rapide Photron Fastcam SA 1.1 en utilisant une fréquence d'acquisition de $f = 5400$ images/s et un temps d'acquisition de $1/f \approx 0,18$ ms. La source lumineuse utilisée est une source fibrée Nikon Intensilight® avec une lampe à mercure et un générateur C-HGFI. La Figure 2-8 présente le banc expérimental. Les images ont été acquises dans le plan focal à mi-hauteur du canal, là où le champ de vitesse est maximal.

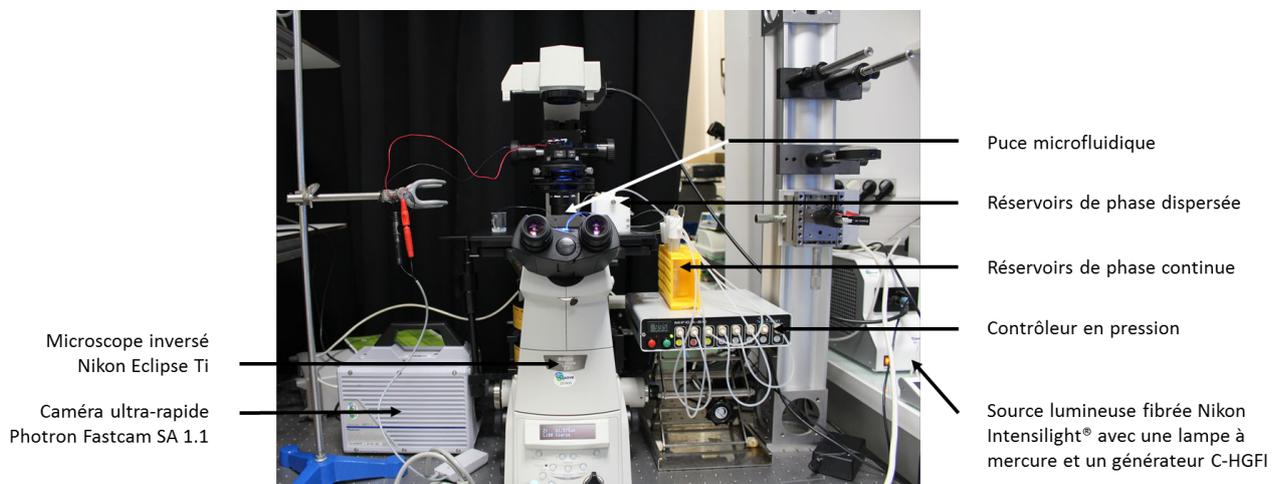


Figure 2-8 : Banc expérimental lors des expériences de micro-PIV

Les champs de vitesse ont été obtenus grâce au logiciel CleanVec (développé par S.M. Soloff et C.D. Meinhart, en libre accès) à partir des images acquises par la caméra ultra-rapide. Pour chaque étape de formation d'une goutte, nous avons sélectionné les 40 images acquises autour d'un temps $t=t_i$ ainsi que celles obtenues autour des temps $t=t_i+n*T$ où T est la période entre deux gouttes (inverse de la fréquence de production) et n est le nombre de gouttes prises en compte. Pour chacune de ces étapes, le calcul de champ de vitesse a alors été effectué sur 250 à 1600 images selon les conditions (alginate ou Ficoll, pressions appliquées à la phase dispersée). Le principe du traitement est alors le suivant. Les images sont découpées en zones appelées fenêtres d'interrogation, sur lesquelles la corrélation est effectuée. Sur chacune de ces fenêtres, le pic maximum de corrélation correspond au déplacement moyen en pixels des particules contenues dans cette fenêtre. Dans nos expériences, une fenêtre d'interrogation de 32×32 pixels a été utilisée. Un vecteur est alors associé à chaque fenêtre d'interrogation de l'image en considérant la calibration spatiale de l'image ($1.01 \mu\text{m}/\text{pixel}$) et le délai entre deux images successives ($1/5400$ s).

Un programme Matlab (développé par S.Wereley, utilisé avec permission) a ensuite été utilisé pour calculer le taux de cisaillement à partir des données de champ de vitesse. De façon simplifiée, le taux de cisaillement est calculé comme le rapport de la différence de vitesse entre deux points du champ de vitesse par la distance qui les sépare (taille de la fenêtre d'interrogation définie à l'étape précédente).

La Figure 2-9 résume les différentes étapes du traitement d'image en présentant les images typiquement obtenue à chaque étape. L'image (1) correspond à l'image obtenue par la caméra rapide en lumière blanche. L'image (2) est celle obtenue en fluorescence au même moment de la formation de la goutte. Pour l'illustration, le contraste de l'image a été accentué. Toutefois, les images brutes sur lesquelles n'apparaissent que les points blancs correspondant aux particules fluorescentes ont été utilisées pour l'analyse du déplacement des particules. L'illustration (3) correspond au champ de vitesse déterminé avec CleanVec à partir des images précédantes. Enfin, l'image (4) représente la cartographie du taux de cisaillement typiquement obtenue grâce au programme Matlab. Il faut noter que le taux de cisaillement étant calculé grâce à la différence de vitesse entre deux points de l'image (3), il en résulte que pour les contours du champ de vitesse entraînent artificiellement une valeur de taux de cisaillement très élevée sur l'image résultante. Ces contours de l'image de taux de cisaillement ne sont pas à considérer.

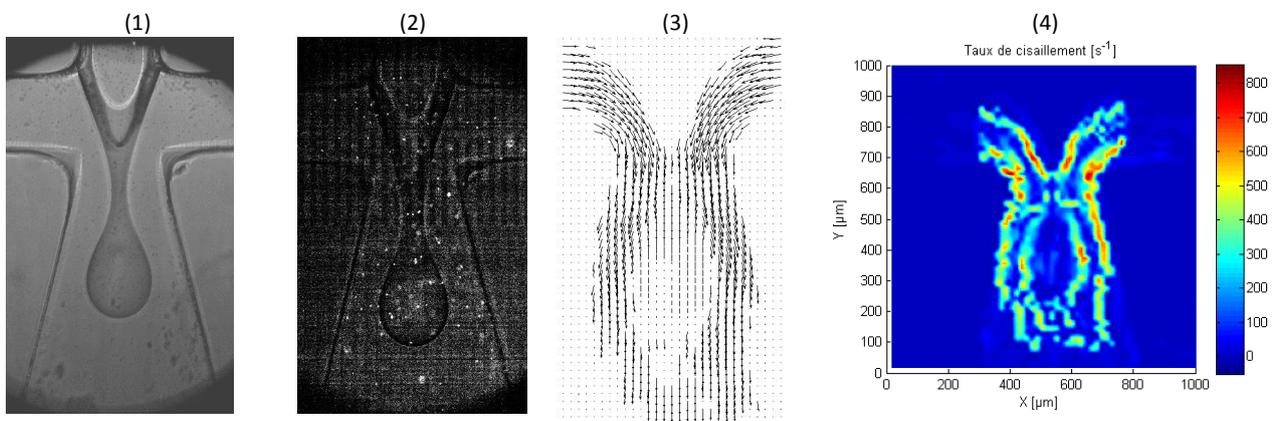


Figure 2-9 : Etapes de traitement des images de micro-PIV : (1) image en lumière blanche ; (2) image en fluorescence dont le contraste a été accentué pour l'illustration ; (3) Champ de vitesse correspondant ; (4) Cartographie du taux de cisaillement correspondante.

Les résultats des ces expériences seront présentés au Chapitre 6.

2.4.3 Confidentiel

CONFIDENTIEL

2.5 Caractérisation des gouttes et capsules

2.5.1 Taille des gouttes

Le diamètre des gouttes a été mesuré à partir des images acquises lors de la formation des gouttes au MFFD en utilisant le logiciel Image J et la fonctionnalité de détection de particules. Lorsque le diamètre D mesuré est inférieur à la profondeur d des canaux de la puce microfluidique, alors le volume est calculé par :

$$V = \frac{4}{3}\pi \left(\frac{D}{2}\right)^3$$

Lorsque le diamètre mesuré est supérieur à la profondeur d des canaux (200 μm), cela signifie que la goutte est confinée dans la profondeur du canal. Le volume de la goutte est alors approché par la formule de Nie *et al.* [167] suivante :

$$V = \frac{\pi}{12} (2D^3 - (D - d)^2(2D + d))$$

Cette relation considère que la goutte est au contact des parois supérieures et inférieures du canal. En réalité, les canaux étant traités pour être hydrophobes, il y a une fine épaisseur d'huile entre la paroi du canal et la surface de la goutte. Cette épaisseur est négligée dans ce calcul. Si l'épaisseur de cette couche d'huile est de l'ordre de 10 μm alors l'erreur sur le volume est de l'ordre de 3%.

2.5.2 Fréquence de production des gouttes

La fréquence de production des gouttes a été calculée à partir des images acquises par la caméra rapide en considérant le nombre d'images acquises entre 2 gouttes produites et la fréquence d'acquisition de la caméra.

2.5.3 Caractérisation de la couche dans le cas de l'encapsulation multicouche

CONFIDENTIEL

2.6 Encapsulation cellulaire

Les expériences d'encapsulation d'îlots de Langerhans ont été réalisées en utilisant le système d'encapsulation multicouche développé dans cette thèse. Elles ont été effectuées dans un laboratoire de classe de confinement L2. Les îlots de Langerhans nous ont été fournis par l'Etablissement Français du Sang (EFS).

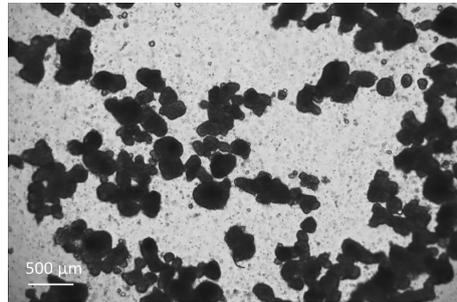


Figure 2-10 : Îlots de Langerhans en milieu de culture

2.6.1 Préparation préalable du banc expérimental

La veille de l'expérience, tout le matériel microfluidique nécessaire (puces, connectiques, support de réservoirs) a été nettoyé à l'éthanol puis avec un détergent (Anios). Ce matériel a été déposé sous un poste de sécurité microbiologique (PSM) et a été exposé aux UV pendant 20 min.

2.6.2 Préparation des solutions tampons

Dans le cas des expériences d'encapsulation de cellules, les solutions tampons d'alginate, de bain de calcium et de sérum physiologique ont été préparées sous un PSM, avec des composés contenant de faibles quantités d'endotoxines. Les références de ces composés sont les suivantes :

- NaCl : Merk Millipore, CAS 7647-14-5
- CaCl₂ : Merk Millipore, CAS 10035-04-8
- HEPES : PAN Biotech, P05-01100

Les solutions ont alors été préparées aux mêmes concentrations que celles présentées aux paragraphes 2.2.1 et 2.2.4, puis ajustées à pH=7,4.

2.6.3 Préparation des phases de polymère avec et sans cellules

Ces expériences d'encapsulation d'îlots de Langerhans ont été réalisées en utilisant :

CONFIDENTIEL

Les îlots de Langerhans ont été réceptionnés en milieu de culture le matin de l'expérience. Avant d'être incorporés dans l'alginate, les îlots ont tout d'abord été rincés avec la solution tampon servant à solubiliser l'alginate (NaCl 150 mM, HEPES 25 mM, pH=7,4). Pour cela, les îlots sont centrifugés 5 min à 900 rpm, le surnageant est retiré puis le culot cellulaire est resuspendu dans la solution tampon. Ces étapes ont été

répétées 3 fois. Après la dernière centrifugation, le culot cellulaire a été resuspendu dans 100 μL de solution tampon. Ces 100 μL de solution cellulaire ont été incorporés dans 300 μL d'une solution d'alginate SLG100.

2.6.4 Récolte des capsules et conservation

En sortie du système microfluidique, les capsules ont été récupérées en bain de Calcium. Après un certain temps de récolte puis de sédimentation, le bain de Calcium a été retiré et les capsules ont été rincées en sérum physiologique. Elles ont ensuite été transférées dans des flasques contenant du milieu de culture puis conservées à l'incubateur (37°C).

PARTIE I

CONTROLE DE LA TAILLE ET OPTIMISATION DE
LA FREQUENCE DE PRODUCTION DES CAPSULES

Chapitre 3

ETAT DE L'ART SUR LA FORMATION DE GOUTTES EN
MFFD, POSITIONNEMENT ET DEMARCHE DE L'ETUDE

3.1	Etat de l'art sur la formation de gouttes en MFFD.....	77
3.1.1	Régimes observés en géométrie MFFD.....	77
3.1.2	Mécanisme de formation et rupture des gouttes en régime de <i>dripping</i>	81
3.1.2.1	Etapes de formation des gouttes	81
3.1.2.2	Forces mises en jeu et grandeurs adimensionnées.....	82
3.1.2.3	Mécanisme de rupture	86
3.1.3	Taille des gouttes et de fréquence de production en régime de <i>dripping</i>	89
3.1.3.1	Influence des paramètres géométriques.....	89
3.1.3.2	Influence des débits des fluides	89
3.1.3.3	Influence des propriétés des fluides	92
3.1.4	Transition dripping/jetting.....	95
3.1.5	Bilan.....	95
3.2	Positionnement et démarche de l'étude.....	95
3.2.1	Régime de production de gouttes et diagramme en pression	96
3.2.2	Bilan, objectif et démarche de l'étude.....	99

Les dispositifs microfluidiques de production de capsules, et en particulier les dispositifs de type MFFD, permettent d’encapsuler des cellules dans des capsules de taille adaptée et de façon automatique et reproductible (voir 1.3.2). Cependant, les systèmes actuels ne permettent pas d’atteindre les fréquences de production nécessaire à la transplantation d’îlots pour la thérapie cellulaire du diabète (environ 10 000 capsules/kg de patient en moins de deux heures) (voir 1.1.3). L’un des challenges majeurs est donc d’optimiser la productivité de ces systèmes, pour une taille de capsule donnée. La première partie de la thèse porte sur le contrôle de la taille et l’optimisation de la fréquence de production des capsules dans ce type de dispositif.

Ce chapitre présente dans un premier temps l’état de l’art sur la formation de gouttes en MFFD. Il se focalise en particulier sur les différents régimes observés, les modèles décrivant le mécanisme de formation des gouttes ainsi que l’état de l’art sur la caractérisation de la taille, de la fréquence de production et des limites entre les régimes en fonction des paramètres du système.

Ce chapitre présente ensuite les tendances observées concernant la taille, la fréquence et les limites du régime de production de gouttes dans le cas de notre dispositif MFFD et du polymère typiquement utilisé pour l’encapsulation, l’alginate. Il met en évidence l’intérêt de la mise en place d’un modèle afin de prédire la nature des fluides, la géométrie du système et les paramètres fluidiques à utiliser dans le but de maximiser la fréquence de production, pour un polymère d’encapsulation donné. La démarche de l’étude, permettant d’aboutir à ce modèle, est alors présentée.

3.1 Etat de l’art sur la formation de gouttes en MFFD

Depuis les années 2000, la microfluidique est très utilisée pour la formation d’émulsions. Les différents types de géométrie utilisés ont été présentés dans la section 1.3.2 du Chapitre 1. La géométrie MFFD a été choisie dans le cadre de cette étude.

Pour rappel (Chapitre 1), en géométrie MFFD, la phase dispersée s’écoule dans un canal central et la phase continue s’écoule dans deux canaux perpendiculaires de part et d’autre du canal central. Les canaux forment donc une jonction en croix au niveau de laquelle la phase continue focalise la phase dispersée au centre du canal principal. La focalisation peut être accentuée par la présence d’une restriction (orifice) juste après la jonction, comme initialement proposé par Anna *et al.* [168] en 2003 (appelée type Anna) ou par l’utilisation d’une chambre triangulaire juste après la jonction, comme proposé par Tan *et al.* [142] (appelée type Tan).

3.1.1 Régimes observés en géométrie MFFD

Les écoulements sont contrôlés soit en débit grâce à l’utilisation d’un pousse-seringue, soit en pression grâce à l’utilisation d’un contrôleur de pression. Dans les deux cas, plusieurs régimes de fonctionnement ont été observés en fonction des débits ou pressions appliqués aux deux phases lors d’expérimentation [1], [168]–[172] ou de simulation numérique [173].

Les régimes observés varient légèrement selon la géométrie du MFFD : avec restriction (type Anna, Figure 3-1), avec jonction en croix (Figure 3-2) ou avec chambre triangulaire après la jonction (type Tan, Figure 3-3).

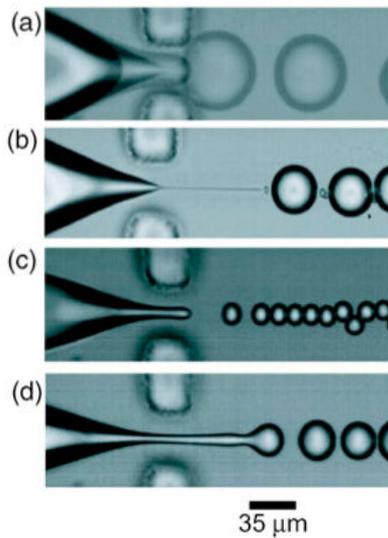


Figure 3-1 : Régimes observés dans le cas d’un dispositif MFFD avec restriction (type Anna) [174] (a) Production de gouttes de taille supérieure à la taille de l’orifice (*geometry-controlled*), (b) Régime de *thread formation/tipstreaming* uniquement en présence d’une concentration élevée de tensioactifs, (c) Régime de *dripping*, (d) Régime de *jetting*

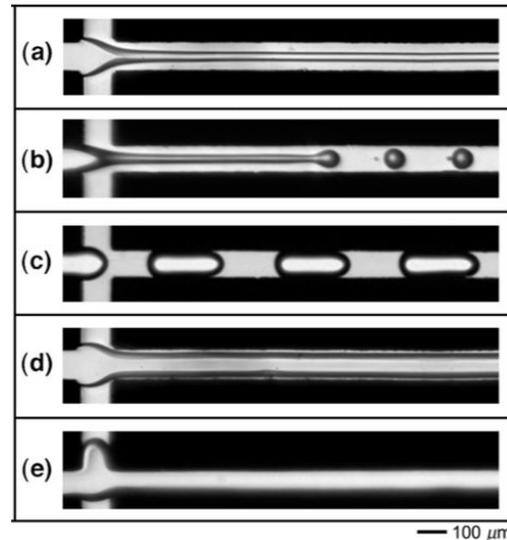


Figure 3-2 : Régimes observés dans le cas d’un dispositif MFFD avec jonction en croix [171]. (a) *threading* : formation d’un jet de phase dispersée sans production de gouttes, (b) *jetting* : formation d’un jet de phase dispersée avec production de gouttes loin en aval de la jonction, (c) *dripping* : production de gouttes au niveau de la jonction, (d) *tubing* : formation d’un tube de phase dispersée, (e) *viscous displacement* : la phase dispersée envahit le canal de phase continue

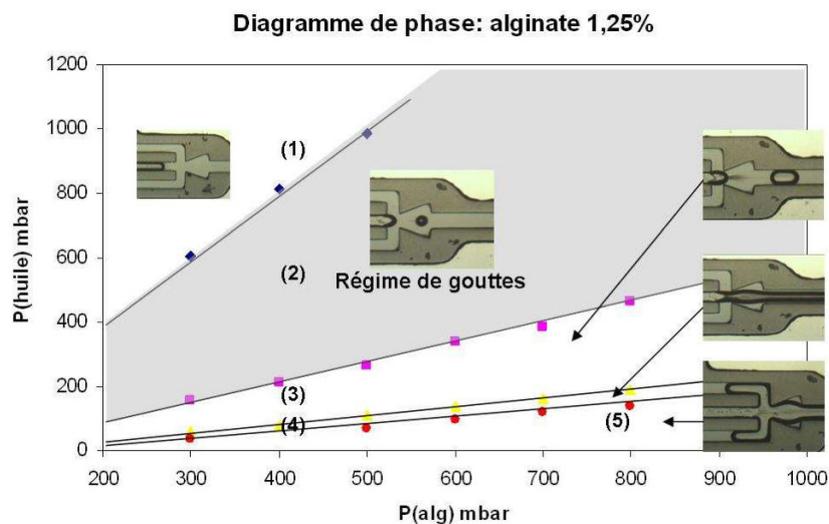


Figure 3-3 : Régimes observés dans le cas d’un dispositif MFFD utilisant une chambre triangulaire (type Tan) et contrôlé en pression [1] en fonction des pressions appliquées à la phase dispersée (alginate 1,25%) et à la phase continue (huile minérale contenant 1% de Span80) : (1) Reflux de la phase dispersée, (2) *Dripping* : production de gouttes, (3) Formation de plugs, (4) *Jetting* : formation d’un jet de phase dispersée, (5) Reflux de la phase continue.

De façon générale, lorsque le débit ou la pression de la phase dispersée augmente, les régimes suivants ont été observés successivement [168][175] :

○ Régime de reflux de la phase dispersée

Ce régime est observé uniquement dans le cas d’un contrôle en pression (Figure 3-3, (1)) [1], [176]. Dans ce régime, la phase dispersée ne s’écoule pas jusqu’à la jonction et la phase continue entre dans le canal de phase dispersée. La pression appliquée à la phase dispersée est trop faible pour qu’il y ait formation de gouttes.

○ Régime de *dripping*

Ce régime est caractérisé par la **formation de gouttes dont la rupture a lieu à un point fixe au niveau de l’orifice**. Les gouttes obtenues sont **très monodisperses ($CV < 2-3\%$)** et de **taille proche ou supérieure à la taille de l’orifice** [177].

Au sein de ce régime, plusieurs régimes ont été distingués dont la dénomination est variable selon les auteurs ou la géométrie utilisée [172], [174], [177], [178] :

- un régime dit de *squeezing* ou de *plugs*, observé à faibles débits, caractérisé par le fait qu’après le détachement de la goutte, **la langue de phase dispersée se rétracte** en amont de l’orifice (Figure 3-1, (a)). Les gouttes obtenues ont une taille proche ou supérieure à celle de l’orifice. Dans une géométrie de type Tan [1] ou jonction en croix [172], les gouttes sont alors confinées dans le canal en aval de la jonction, formant ce qui est appelé des plugs (Figure 3-3, (3)). La taille des gouttes est alors généralement caractérisée non pas par leur diamètre mais par la longueur du plug relativement à la largeur du canal.
- un régime de *dripping* observé à débits plus élevés, dans lequel **la langue de phase dispersée ne se rétracte pas** après détachement de la goutte, mais la rupture a tout de même lieu à un point fixe au niveau de l’orifice (Figure 3-1 (c), Figure 3-3 (2)). **Les gouttes sont légèrement plus petites que la taille de l’orifice et sont souvent suivies de gouttes satellites**, de taille très inférieure à la goutte principale, formées lors de la rupture du filament de phase dispersée [172].
- un régime de *tipstreaming* ou *thread formation*, apparaissant entre le régime de rupture contrôlée par la géométrie et le régime de *dripping* uniquement **en présence d’une concentration élevée de tensioactifs** (supérieure à la concentration micellaire critique) et lorsque le fluide de phase dispersée s’écoule très lentement par rapport au fluide de phase continue. Ce régime a été mis en évidence par Anna *et al.* [174]. Il est caractérisé par le fait qu’entre chaque goutte produite, de taille équivalente à celle produite en régime de *squeezing*, la langue de phase dispersée s’allonge de nouveau en prenant une forme pointue triangulaire et forme un **filament long et très fin** qui se rompt en **gouttes de taille significativement plus petites que la goutte principale (taille submicrométrique)**. Après rupture du filament, l’extrémité de la langue s’arrondit pour former une nouvelle goutte principale (Figure 3-1, (b)).

Les régimes de *squeezing/plug* et *dripping* ne sont pas toujours distingués et le terme de *dripping* est souvent utilisé pour désigner ces deux régimes [171] (Figure 3-2, (c)). Par la suite, lorsque le

squeezing/plugs ne sera pas mentionné, le régime de *dripping* désignera indépendamment le régime de *dripping* proprement dit et le régime de *squeezing/plugs*.

○ Régime de *jetting*

Ce régime est caractérisé par la formation d’un **jet de phase dispersée** qui s’étend en aval de l’orifice, à l’extrémité duquel des gouttes sont formées (Figure 3-1 (d), Figure 3-2 (a) et (b), Figure 3-3 (4)). Les gouttes sont de taille inférieure à la taille de l’orifice mais plus **polydisperses** qu’en régime de *dripping* ($CV > 3\%$) [178]. Cubaud *et al.* [171] font la distinction entre un régime de *threading* (Figure 3-2 (a)) où le jet est stable sur une distance d’au moins $L = 20h$, avec h la largeur et profondeur des canaux, et un régime de *jetting* (Figure 3-2 (b)) où le détachement des gouttes a lieu à une distance $L < 20h$. Par la suite, ces deux régimes ne seront pas distingués et seront tout deux appelés *jetting*.

○ Régime de reflux de la phase continue

Dans ce régime, la phase continue ne s’écoule pas jusqu’à la jonction et la phase dispersée envahit les canaux de phase continue. Le débit ou la pression appliquée à la phase dispersée est trop élevée pour qu’il y ait formation de gouttes (Figure 3-2 (e), Figure 3-3 (5)) [1].

Le Tableau 3-1 résume les caractéristiques de chaque régime. Ces différents régimes ont également été observés lors de simulation numérique [173].

	Fort confinement	Faible confinement	
	<i>Squeezing ou plugs</i>	<i>Dripping</i>	<i>Jetting</i>
Débits Q_d et Q_c	faibles	modérés	élevés
Point de rupture	Au niveau de l’orifice	Au niveau ou proche de l’orifice	Loin en aval de l’orifice
Taille des gouttes	Supérieure à la taille de l’orifice	De l’ordre de la largeur de l’orifice	Inférieure à la taille de l’orifice
Distribution de taille	$CV < 3\%$	$CV < 3\%$	$CV < 8\%$

Tableau 3-1 : Principaux régimes de formation de gouttes en MFFD. Adapté de [178].

L’encapsulation de cellules nécessite la formation de capsules monodisperses de taille adaptée à la taille des cellules, c’est-à-dire de l’ordre de la centaine de micromètres. Les régimes de *dripping* et de *jetting* permettent tous deux de former des gouttes de cette taille, toutefois la monodispersité est meilleure ($CV < 3\%$) en régime de *dripping* [177]. De plus, parmi tous les régimes décrits, la fréquence de production des gouttes est maximale en régime de *dripping* [174]. **Le régime le plus adapté pour notre application est donc le régime de *dripping*, pour la taille, la monodispersité et la fréquence des gouttes produites.** Nous focaliserons donc notre étude sur la formation de gouttes en régime de *dripping*.

3.1.2 Mécanisme de formation et rupture des gouttes en régime de *dripping*

3.1.2.1 Etapes de formation des gouttes

La Figure 3-4 présente les séquences d’images obtenues lors de la formation et rupture de gouttes en régime de *dripping* dans le cas d’un dispositif MFFD avec jonction en croix (« cross-junction ») [171] et d’un dispositif MFFD avec restriction à la jonction (type Anna) [179] (Chapitre 1).

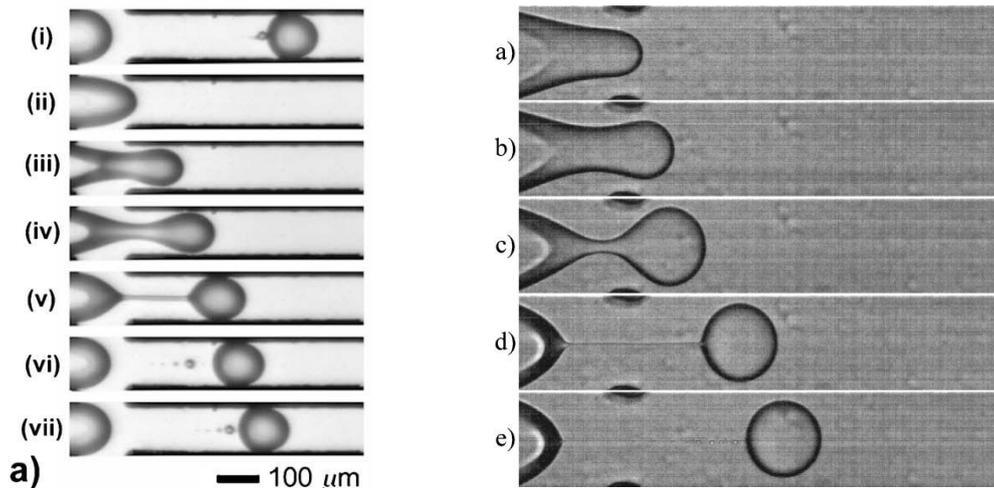


Figure 3-4 : Successions d’images représentant la dynamique de formation d’une goutte en régime de *dripping* : (gauche) Formation d’une goutte de glycérol dans de l’huile PDMS, dans un dispositif MFFD en jonction croix [171] ; (droite) Formation d’une goutte de polymère PEO dans de l’huile minérale contenant du Span80, dans un dispositif MFFD de type Anna [179]

Quels que soient le type de géométrie MFFD ou les solutions utilisées, la formation de gouttes se déroule en cinq étapes [172] :

- **Etape 1 : Formation d’une langue de phase dispersée** (de (i) à (ii) – (a))

La phase dispersée avance dans la phase continue et forme une « langue » de phase dispersée.

- **Etape 2 : Blocage de l’orifice par la langue de phase dispersée** (de (ii) à (iii) – de (a) à (b))

Lorsque la langue de phase dispersée arrive au niveau de l’orifice (début du canal de sortie dans le cas de la géométrie en croix ou restriction dans le cas de la géométrie de type Anna), elle bloque partiellement le passage de la phase continue.

- **Etape 3 : Pincement de la phase dispersée par la phase continue** (de (iii) à (iv) – de (b) à (c))

Lorsque la phase dispersée bloque partiellement l’orifice, le passage de la phase continue au niveau de l’orifice est très resserré ce qui entraîne le pincement de la phase dispersée par la phase continue et le début de formation de la goutte à l’extrémité de la phase dispersée. La partie de phase dispersée reliant la goutte en formation à la jonction est appelé « cou » de phase dispersée.

- **Etape 4 : Formation d’un filament de phase dispersée** (de (iv) à (v) – de (c) à (d))

Cette goutte en formation est alors entraînée en aval par la phase continue, ce qui a pour effet d’étirer le cou formant alors un filament de phase dispersée.

- Etape 5 : Rupture du filament et détachement de la goutte (de (v) à (vi) – de (d) à (e))

Lorsque le filament devient très fin, celui-ci se rompt ce qui entraîne le détachement de la goutte et la formation d’une ou plusieurs gouttes appelées gouttes satellites issues du filament, de taille très inférieure à la goutte principale.

La suite de ce paragraphe présente les forces mises en jeu lors de ces différentes étapes et les différents modèles décrits dans la littérature expliquant le mécanisme conduisant à la formation d’une goutte.

3.1.2.2 Forces mises en jeu et grandeurs adimensionnées

De façon générale, les écoulements sont déterminés par **l’équilibre entre les forces d’inertie et les forces visqueuses**. Dans le cas de systèmes diphasiques tels que les systèmes de génération de gouttes, les **forces interfaciales** entrent en jeu. Les **forces élastiques** interviennent également dans le cas d’écoulement de fluides viscoélastiques. Les différentes forces mises en jeu sont décrites ici :

- La force d’inertie

Dans le cas d’un écoulement stationnaire, la force d’inertie par unité de volume s’exprime :

$$F_{iner} \sim \rho U^2$$

où ρ est la densité (kg/m³) et U la vitesse caractéristique du fluide (m/s).

- Les forces visqueuses

Les forces de cisaillement visqueux s’exerçant sur une surface S à l’interface des deux phases s’expriment :

$$F_{visq} \sim \eta \dot{\gamma} S \sim \frac{\eta U}{L} S$$

où η est la viscosité dynamique du fluide (Pa.s), $\dot{\gamma}$ est le taux de cisaillement égal au rapport de la vitesse caractéristique U du fluide (m/s) et de la longueur caractéristique L de l’écoulement. Lors de la formation des gouttes, cette force a tendance à déformer l’interface entre les deux phases.

Lors de la formation des gouttes, le fluide de phase dispersée est entraîné par la phase continue (à l’étape 4 décrite précédemment). L’écoulement est alors également élongationnel [1]. Les contraintes élongationnelles s’exprime par :

$$\sigma_{elong} = \mu \dot{\epsilon} \quad \text{où } \mu \text{ est la viscosité élongationnelle et } \dot{\epsilon} \text{ est le taux d'élongation}$$

- La force de tension interfaciale ou force capillaire

La force de tension interfaciale est présente dans le cas d’une interface entre deux fluides non miscibles. La force s’appliquant sur une surface S s’écrit :

$$F_{cap} \sim \sigma \kappa S$$

où σ est la tension interfaciale entre les deux phases (N.m⁻¹), S est la surface de l’interface (m²) et κ est la courbure de l’interface (m⁻¹). Dans le cas d’une goutte sphérique de rayon R , $\kappa = 1/R$. Dans le cas d’une

goutte confinée dans un canal rectangulaire, $\kappa = 2/h+2/w$ où h et w sont respectivement la profondeur et la largeur du canal.

La tension interfaciale est caractéristique des fluides utilisés et reste donc constante lors de la formation des gouttes. Le rayon de courbure est quant à lui très variable au cours des différentes étapes de formation des gouttes.

La formation d’une interface entre deux fluides non miscibles représente un coût énergétique pour le système. L’état d’équilibre correspondant à l’état du minimum d’énergie, le système tend donc à minimiser la surface d’interface entre les deux fluides lors de la formation des gouttes.

Les écoulements étant déterminés par la compétition entre ces forces, **plusieurs nombres adimensionnés ont été définis pour décrire ces écoulements** [169], [180] :

- Le nombre de Reynolds

Le nombre de Reynolds compare les forces d’inertie aux forces visqueuses. Il est défini par :

$$Re = \frac{F_{iner}}{F_{visq}} = \frac{\rho UL}{\eta}$$

où ρ est la densité (kg/m³), U est la vitesse caractéristique du fluide, L est la longueur caractéristique du système (m) et η est la viscosité dynamique du fluide (Pa.s).

En microfluidique, le nombre de Reynolds est très inférieur à 1, les forces d’inertie sont donc négligeables et les écoulements résultent donc de l’équilibre entre les forces visqueuses et interfaciales.

- Le nombre Capillaire

Le nombre Capillaire compare les forces visqueuses aux forces de tension interfaciale. Il est défini pour la phase dispersée ou pour la phase continue par la relation suivante :

$$Ca = \frac{F_{visq}}{F_{cap}} = \frac{\eta U}{\sigma} = \frac{\eta Q}{\sigma S}$$

où η , U et Q sont respectivement la viscosité, la vitesse et le débit de la phase considérée (dispersée ou continue), σ est la tension interfaciale et S est la section du canal.

Anna *et al.* [177] définissent le nombre Capillaire de la phase continue en termes de vitesse de déformation effective G au niveau de la restriction. Ce nombre dépend alors des dimensions au niveau de la jonction entre les deux phases (voir Figure 3-5). Il est défini par la relation suivante :

$$Ca_c = \frac{\eta G}{\sigma} = \frac{\eta Q_c a}{\sigma h \Delta z} \left[\frac{1}{w_{or}} - \frac{1}{2w_c} \right]$$

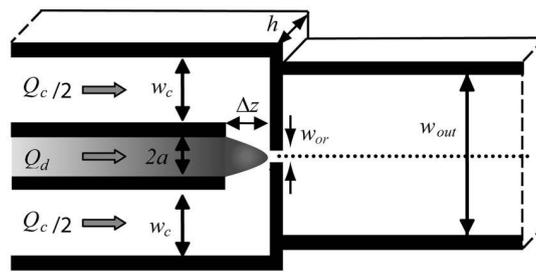


Figure 3-5 : Schéma de la géométrie MFFD utilisée Anna et al. [177]

En microfluidique, les effets inertiels étant négligeables, **le nombre Capillaire est alors le plus approprié pour décrire les écoulements et en particulier le mécanisme de génération de gouttes**. Il prend typiquement des valeurs de 10^{-3} à 10 [169], [175] signifiant que les forces capillaires peuvent être alternativement dominantes, comparables ou négligeables devant les forces visqueuses.

- Le nombre de Weber

Le nombre de Weber compare les effets inertiels à la tension interfaciale. Il est généralement défini pour la phase dispersée. Il devient important lorsque les forces d’inertie deviennent non négligeables devant les forces visqueuses, notamment lors du régime de *jetting* [175]. Il est égal au produit du nombre de Reynolds et du nombre Capillaire.

$$We = \frac{F_{iner}}{F_{cap}} = \frac{\rho LU^2}{\sigma} = Re \times Ca$$

Dans le cas de la formation de gouttes à partir d’une phase dispersée viscoélastique (cas des polymères), l’élasticité doit également être prise en compte. Dans ce cas, les forces qui gouvernent la rupture sont les forces visqueuses, les forces de tension interfaciale et les forces élastiques. D’autres grandeurs sont alors utilisées pour mesurer l’importance de l’élasticité dans l’écoulement [179], [181]:

- Le nombre de Weissenberg

Ce nombre compare les forces visqueuses aux forces élastiques. Il est défini par le rapport du temps de relaxation τ du polymère sur un temps caractéristique de déformation de l’écoulement. Il existe deux expressions selon la nature de l’écoulement [1] :

$$Wi = \frac{F_{visq}}{F_{elas}} = \tau_{cis} \dot{\gamma} \quad \text{dans le cas d’un écoulement dominé par les effets de cisaillement}$$

$$Wi = \frac{F_{elong}}{F_{elas}} = \tau_{el} \dot{\epsilon} \quad \text{dans le cas d’un écoulement dominé par les effets élongationnels}$$

où $\dot{\gamma}$ est le taux de cisaillement, $\dot{\epsilon}$ est le taux d’élongation et τ_{cis} et τ_{el} sont respectivement les temps de relaxation caractéristique du polymère dans le cas d’un écoulement de cisaillement ou d’un écoulement élongationnel.

Si $Wi < 1$ cela signifie que le polymère a le temps de revenir dans sa conformation d’équilibre avant que l’écoulement ne perturbe sa conformation tridimensionnelle, l’écoulement est alors principalement

visqueux. Lorsque Wi est proche de l’unité ou supérieur, le polymère n’a plus le temps de relaxer et l’écoulement perturbe significativement sa conformation : la solution a alors un comportement élastique. Pour un fluide purement visqueux, $Wi=0$.

- Le nombre de Deborah

Le nombre de Deborah caractérise l’effet de l’élasticité au cours du mécanisme de formation de gouttes. De façon générale, il est défini comme le rapport du temps de relaxation τ du polymère sur un temps caractéristique de l’expérience (temps d’observation). Dans le cas de la formation de gouttes le temps caractéristique d’observation correspond au temps de Rayleigh τ_R qui est le temps caractéristique associé à la croissance d’une perturbation à la surface d’un cylindre de fluide [181].

$$De = \frac{\tau}{\tau_R} = \tau \left(\frac{\sigma}{R_{max}^3 \rho} \right)^{1/2}$$

où ρ est la densité de la phase dispersée, σ est la tension interfaciale et R_{max} est le rayon du filament de phase dispersée avant rupture.

Si $De < 1$ alors l’élasticité a peu d’effet sur le mécanisme de rupture de la goutte. Si $De > 1$ alors l’élasticité devient non négligeable au cours de la formation des gouttes. Pour un fluide purement visqueux, $De=0$.

Le nombre de Weissenberg et le nombre de Deborah sont souvent confondus car dans certains cas le temps d’observation correspond au temps caractéristique de déformation de l’écoulement. Dans le cas de la formation de gouttes en microfluidique, ces deux temps sont différents et le nombre de Deborah est alors plus approprié pour caractériser les écoulements.

- Le nombre élastocapillaire

Ce nombre caractérise l’élasticité en présence d’une interface. Il prend en compte à la fois les effets élastiques, visqueux et interfaciaux. Il mesure l’importance relative des contraintes élastiques et de tension interfaciale comparée aux contraintes visqueuses. Il est défini par le rapport du temps caractéristique de relaxation du polymère τ sur un temps caractéristique de déformation d’une interface τ_T :

$$E_c = \frac{\tau}{\tau_T} = \frac{\tau \sigma}{\eta_0 R_{max}}$$

où η_0 est la viscosité à cisaillement nul du polymère, σ est la tension interfaciale et R_{max} est le rayon du filament de phase dispersée avant rupture. Le temps τ_T est déterminé par les forces visqueuses et capillaires et est appelé temps viscocapillaire ou temps de Tomotoka.

Il dépend uniquement de la rhéologie du fluide et de la géométrie du système [181].

Lorsque $E_c < 1$ cela signifie que les effets capillaires et visqueux dominent les effets élastiques. Lorsque $E_c > 1$, l’écoulement est alors dominé par les effets élastiques.

- Le nombre élastique

Ce nombre caractérise l’importance relative des forces visqueuses et des forces élastiques [181]. Il est défini par le rapport du nombre de Weissenberg et du nombre de Reynolds :

$$E = \frac{Wi}{Re}$$

Ces nombres adimensionnés sont utilisés pour identifier les forces impliquées lors des différentes étapes de formation des gouttes et ainsi comprendre le mécanisme de formation et rupture.

3.1.2.3 Mécanisme de rupture

Lors du co-écoulement de deux fluides non miscibles en milieu totalement non confiné, la formation de gouttes résulte de l’instabilité capillaire de Rayleigh-Plateau. Dans le cas de la formation de gouttes dans un système microfluidique, le mécanisme est plus complexe.

Le mécanisme de rupture des gouttes en régime de *dripping* a été étudié principalement en analysant la dépendance de la taille des gouttes avec les paramètres du système, notamment les débits et les propriétés des fluides. Le mécanisme a été étudié expérimentalement [169], [175], [178] et par simulation numérique [173], [182]–[184].

A la suite des études expérimentales, principalement deux modèles ont été proposés selon le confinement, c’est à dire la taille des gouttes par rapport à la taille des canaux [175][185] :

- Fort confinement : mécanisme de rupture en régime de *squeezing* ou de *plugs*

A faibles débits et faibles nombres Capillaires (typiquement <0,01 [180]), la phase dispersée touche les parois du canal et les gouttes ont un diamètre proche ou supérieur à la largeur de l’orifice.

Dans le cas d’un MFFD avec restriction, la taille des gouttes est contrôlée par le rapport de débit entre les deux phases [178]. A rapport de débit fixe, la taille est quasiment constante en fonction du nombre Capillaire de la phase continue [174]. Cela suggère que **la rupture n’est pas due à la tension interfaciale et aux instabilités capillaires [186] mais aux forces hydrodynamiques.**

Le mécanisme a initialement été expliqué par Garstecki *et al.* [141], [186] pour la formation de bulles d’air en flux d’eau ou glycérol dans un dispositif MFFD avec restriction. Li *et al.* [172] ont également étudié ce mécanisme en détails, grâce à l’analyse du champ de vitesse autour d’une goutte en formation par micro-PIV, dans le cas de la formation de gouttes d’huile dans l’eau dans une jonction en croix.

Dans ce régime, la phase dispersée avance au niveau de l’orifice, réduisant la largeur du flux de phase continue. Le débit étant maintenu constant, ceci implique une augmentation de pression de la phase continue en amont de la jonction de façon à maintenir le débit dans la zone plus étroite. L’augmentation de pression entraîne le pincement de la phase dispersée qui se rompt pour former une goutte. Garstecki *et al.* [141], [186] précisent que des évolutions similaires ont été observées lorsque le flux de phase continue est contrôlé en pression. Dans ce cas, c’est le débit de la phase continue qui varie au cours de la rupture. Nie *et al.* [178] ont confirmé ces observations dans le cas d’une phase dispersée liquide de faible viscosité (<10 mPa.s).

Ce mécanisme est appelé **mécanisme de rupture contrôlée par la géométrie (*geometry-controlled breakup*) ou mécanisme de rupture contrôlée par les débits (*flow-rate controlled breakup*).**

Dans le cas d’une jonction en croix, les gouttes sont quasiment toujours de taille supérieure à la largeur des canaux, elles sont donc confinées. Toutefois, la formation des gouttes ne semble pas être expliquée par le

même mécanisme. En effet, les résultats de Cubaud *et al.* [171] et Li *et al.* [172] montrent que la taille des gouttes est déterminée à la fois par le rapport de débit et par le nombre Capillaire de la phase continue. Aussi, les auteurs obtiennent des lois différentes selon la taille des gouttes par rapport à la profondeur des canaux. Ces résultats suggèrent alors que **la dynamique de rupture serait contrôlée à la fois par la géométrie et par le cisaillement.**

- Faible confinement : mécanisme de rupture en régime de *dripping*

Lorsque les débits augmentent (débits modérés), les contraintes visqueuses de cisaillement commencent à jouer un rôle important dans le processus. Elles déforment l’interface émergente, la phase dispersée s’affine et forme un cou de largeur inférieure à la taille de l’orifice [174]. Le confinement de la phase dispersée est alors plus faible que dans le cas du *squeezing* et les gouttes résultantes ont un diamètre inférieur à la taille de l’orifice.

Les études expérimentales s’accordent sur le fait qu’à rapport de débit fixe, le volume V des gouttes est relié à l’inverse du nombre Capillaire de la phase continue par $V \propto Ca_c^{-\beta}$ avec $\beta \leq 1$ [177], [178], [180]. Le nombre Capillaire étant le nombre qui compare les effets visqueux aux effets capillaires, cela suggère que **le mécanisme de formation des gouttes est contrôlé par l’équilibre entre les forces visqueuses et les forces de tension interfaciale.** Toutefois, un mécanisme de rupture contrôlée par le cisaillement est exclu puisque qu’un modèle de cisaillement pur d’un fluide non confiné prédit $V \propto Q_c^{-3}$ soit $V \propto Ca_c^{-3}$. Nie *et al.* [178] suggère que cette plus faible dépendance à Ca_c soit due au confinement.

Le mécanisme de formation des gouttes est donc complexe. Des études numériques réalisées sur une géométrie de type Anna ont aidé à comprendre plus précisément les forces impliquées.

Zhou *et al.* [173] ont modélisé numériquement la formation de gouttes d’eau dans l’huile dans une géométrie MFFD semblable à celle utilisée expérimentalement par Anna *et al.* [168]. Cette modélisation a permis de mettre en évidence la **présence et la croissance d’instabilités capillaires de type Rayleigh-Plateau** au niveau du cou de phase dispersée auquel est attaché la goutte en formation, prouvant ainsi que les effets capillaires entre en jeu dans le mécanisme de rupture. Toutefois, lors de la rupture d’un filament par instabilités capillaires de Rayleigh-Plateau, les gouttes résultantes ont une taille proportionnelle au rayon du filament, ce qui n’est pas le cas dans cette modélisation. Ces résultats mettent donc en évidence que **le mécanisme de rupture ne repose pas uniquement sur les effets capillaires.**

Une étude numérique réalisée par Davidson *et al.* [187] suggère que la force de trainée visqueuse exercée par la phase continue sur la goutte en formation contribue majoritairement au détachement des gouttes. Toutefois, Zhou *et al.* [173] ont montré que la rupture ne pouvait s’expliquer uniquement par cette force. Les auteurs suggèrent donc que **le mécanisme de rupture est le résultat des effets combinés des instabilités capillaires et de la trainée visqueuse.**

Les modélisations de Zhou *et al.* [173] et Davidson *et al.* [187] ont été réalisées en considérant une géométrie 2D axisymétrique, plutôt qu’une géométrie 3D avec des canaux rectangulaires, pour des raisons de minimisation des calculs numériques. Toutefois, la **comparaison des résultats avec des résultats expérimentaux permet de valider ce modèle.** En effet, les gouttes obtenues par ce modèle ont une taille

similaire à 10% près à celles obtenues expérimentalement par Anna *et al.* [168] et la variation de la taille des gouttes en fonction des débits suit également la même tendance [173].

Une simulation en géométrie 3D avec des canaux rectangulaires a été réalisée plus récemment par Wu *et al.* [184]. Les auteurs proposent un modèle, validé par leurs expériences, dans lequel la rupture est déterminée par la compétition entre :

- la force de tension interfaciale qui s’applique à la surface du cou et s’oppose à l’élongation du cou et au détachement de la goutte
- la force de trainée visqueuse exercée par la phase continue sur la goutte en formation, qui est la principale force favorisant la rupture
- la force d’inertie de la phase dispersée qui contribue également au détachement de la goutte

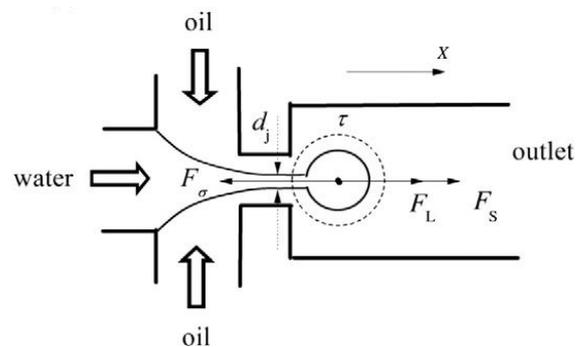


Figure 3-6: Formation de goutte en géométrie MFFD et forces agissant sur la goutte en formation [184]

Le mécanisme proposé est le suivant : au début du processus, la tension interfaciale empêche la formation d’une langue de phase dispersée. Lorsque la goutte en formation grossit, les forces de détachement (trainée visqueuse et inertie) deviennent plus importantes. Lorsque ces forces deviennent supérieures à la force de tension interfaciale, alors le cou se rompt et la goutte se détache et prend une forme sphérique grâce à la tension interfaciale.

Dans cette étude, la taille des gouttes formées dépend à la fois du rapport de débit et du nombre Capillaire de la phase dispersée. Ce résultat est en accord avec les résultats obtenus en jonction en croix [171], [172]. Ce modèle expliquerait donc la génération de gouttes en MFFD quels que soient la géométrie et le confinement.

Les résultats des études suggèrent donc que la rupture est déterminée par l’équilibre entre les forces capillaires (F_σ), la force d’inertie de la phase dispersée (F_L) et la force de trainée visqueuse exercée par la phase continue sur la goutte en formation (F_s) [173], [184]. La rupture a lieu lorsque les forces d’inertie et visqueuses deviennent supérieures à la force de tension interfaciale.

3.1.3 Taille des gouttes et de fréquence de production en régime de *dripping*

Les études sur la génération de gouttes en MFFD ont montré qu’au sein du régime de *dripping*, la taille et la fréquence de formation des gouttes sont contrôlées par [178] :

- les paramètres géométriques du MFFD
- les débits de chaque phase
- les propriétés des fluides

La plupart des études se concentrent soit sur la taille des gouttes soit sur le temps de rupture, inverse de la fréquence de production. Toutefois, ces deux paramètres sont reliés : la conservation de la masse impose que le débit de la phase dispersée est égal au produit de la taille et de la fréquence de production [177]. A débit de phase dispersée constant, lorsqu’un des deux paramètres varie dans un sens, l’autre varie donc dans le sens opposé.

Les paragraphes suivants décrivent les tendances observées lors de la variation des paramètres et dans certains cas les lois obtenues en fonction de ces paramètres.

3.1.3.1 Influence des paramètres géométriques

De façon générale, la taille des gouttes augmente lorsque les dimensions des canaux augmentent [172], [183], [188].

Des études, expérimentale [177] et numériques [173], [182], [183], ont analysé de façon plus approfondie l’influence des paramètres géométriques d’une géométrie MFFD de type Anna. Les résultats montrent que la taille des gouttes augmente avec la largeur de l’orifice et la distance entre l’orifice et l’arrivée de la phase dispersée. Lorsque la longueur de l’orifice augmente, la taille des gouttes diminue dans un premier temps puis augmente ensuite. Les dimensions en aval de l’orifice n’influencent pas la taille des gouttes.

3.1.3.2 Influence des débits des fluides

Il a été vu au paragraphe 3.1.2 que la dépendance de la taille avec les débits diffère selon la géométrie du dispositif MFFD employé et le confinement.

De façon générale, la taille des gouttes augmente lorsque le débit de la phase dispersée augmente et/ou le débit ou le nombre Capillaire de la phase continue diminue, quel que soit le type d’émulsion « eau dans huile » [160], [176], [183] ou « huile dans eau » [172], [178].

Dans le cas d’une géométrie MFFD avec restriction (type Anna), la dépendance de la taille avec les débits est différente pour le régime de *squeezing* et le régime de *dripping*. Au sein de chaque régime, elle est variable selon le rapport de viscosité η_d/η_c entre la phase dispersée et la phase continue.

En régime de *squeezing*, la taille des gouttes est contrôlée par le rapport de débit entre les deux phases [178] et est quasiment constante en fonction du débit ou du nombre Capillaire de la phase continue à rapport de débit fixe [174], [176]. La dépendance de la taille avec le rapport de débit varie selon les études.

Selon Nie *et al.* [178], à faible rapport de viscosité ($\eta_d/\eta_c < 20$), le volume V des gouttes est proportionnel au rapport de débit :

$$V \sim \frac{Q_d}{Q_c}$$

où Q_d et Q_c sont respectivement le débit de la phase dispersée et le débit de la phase continue.

Lorsque le rapport de viscosité augmente, la dépendance de la taille des gouttes avec le rapport de débit devient plus faible [178] (voir 3.1.3.3).

L’étude de Ward *et al.* [176] compare le cas d’un contrôle en débit et d’un contrôle en pression. La taille des gouttes est donnée en termes de longueur de gouttes (l) par rapport à la largeur de l’orifice (a). Dans les deux cas, la taille des gouttes dépend du rapport de débit ou de pression en suivant une loi de puissance (Figure 3-7).

En régime de *dripping*, la taille des gouttes est reliée à l’inverse du nombre Capillaire ou du débit de la phase continue [177], [178], [180]. Le volume V des gouttes suit la loi d’échelle suivante

$$V \propto Ca_c^{-\beta} \quad \text{où } 0 < \beta \leq 1$$

La valeur de β varie selon le rapport de viscosité η_d/η_c (voir 3.1.3.3).

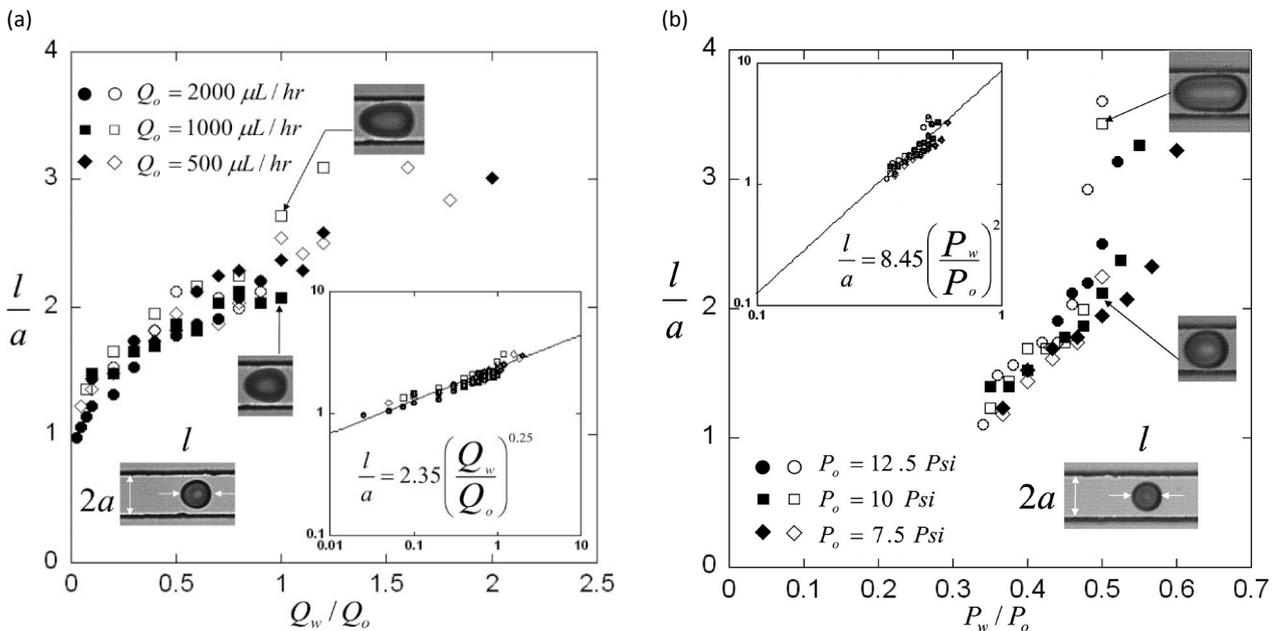


Figure 3-7 : Résultats obtenus par Ward *et al.* [176] : Comparaison des lois obtenues lors d’un contrôle en débit et d’un contrôle en pression. La taille des gouttes est donnée en termes de longueur de gouttes (l) par rapport à la largeur de l’orifice (a).

Toutefois, cette loi d’échelle a été déterminée à rapport de débit fixe. L’influence du débit de la phase dispersée ou du rapport de débit n’est donc pas prise en compte.

Selon l’étude numérique de Wu *et al.* [184], la taille des gouttes serait liée à la fois au rapport de débit Q_d/Q_c et au nombre Capillaire Ca_c de la phase continue. La taille des gouttes augmente lorsque Q_d/Q_c et l’inverse de Ca_c augmentent.

Dans le cas d’une jonction en croix, les études montrent que la taille des gouttes en régime de *dripping* dépend à la fois du rapport de débit et du nombre Capillaire de la phase continue en suivant des lois de puissance. Dans ces études, les gouttes sont confinées dans la section de canal et forment des plugs. Les lois sont alors données en termes de longueur L de plugs par rapport à la largeur w du canal.

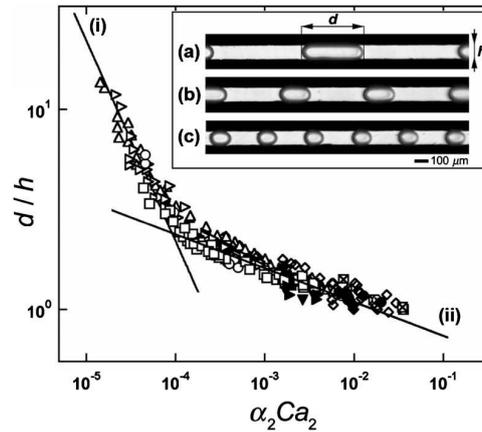


Figure 3-8 : Résultats obtenus par Cubaud *et al.* [171] : Longueur normalisée des gouttes en fonction du produit du rapport de débit et du nombre Capillaire de la phase continue

Selon Cubaud *et al.* [171], la longueur relative de gouttes L/w suit la loi suivante :

$$\frac{L}{w} \approx \begin{cases} 2,2 \times 10^{-3} (\alpha_c Ca_c)^{-1} & \text{pour } L > 2,5w \\ 0,5 (\alpha_c Ca_c)^{-0,17} & \text{pour } L < 2,5w \end{cases} \quad \text{où} \quad \alpha_c = \frac{Q_d}{Q_d + Q_c}$$

Le même type de loi a été obtenu par Li *et al.* [172] :

$$\frac{L}{w} \approx \begin{cases} 0,30 \left(\frac{Q_d}{Q_c}\right)^{0,23} (Ca_c)^{-0,42} & \text{pour } L > 2,35w \\ 0,72 \left(\frac{Q_d}{Q_c}\right)^{0,14} (Ca_c)^{-0,19} & \text{pour } L < 2,35w \end{cases}$$

La différence entre ces lois provient probablement d’une différence de confinement entre ces deux géométries [172].

Dans le cas d’un MFFD de type Tan, la seule étude réalisée utilise un contrôle en pression [1]. Les résultats montrent que la taille des gouttes augmente lorsque la pression P_d appliquée à la phase dispersée augmente (à pression appliquée à la phase continue P_c constante) et lorsque P_c diminue à P_d fixe.

En ce qui concerne la fréquence de génération des gouttes (inverse du temps de rupture), de façon générale, celle-ci augmente lorsque le rapport de débit Q_d/Q_c augmente ou que Ca_c augmente à rapport de débit constant. D’après Ward *et al.* [176], la fréquence augmente quasi-linéairement avec le rapport de débit Q_d/Q_c ou le rapport de pressions P_d/P_c . Selon Anna *et al.* [177], la fréquence est proportionnelle à Ca_c en régime de *squeezing*. En régime de *dripping*, celle-ci dévie de cette loi à faible Ca_c et dépend de la viscosité de la phase continue.

3.1.3.3 Influence des propriétés des fluides

Le Tableau 3-2 regroupe les résultats de la littérature sur l’influence des propriétés des fluides sur la taille et la fréquence de production des gouttes, en précisant la nature des fluides utilisés et les gammes de valeurs dans lesquelles les auteurs font varier les paramètres étudiés. Certains de ces résultats ont mené à l’établissement de lois décrites au paragraphe précédent (3.1.3.2), d’autres concluent uniquement sur les tendances observées.

L’influence de la viscosité de la phase dispersée sur la taille des gouttes ne semble pas claire et les résultats des études sont parfois contradictoires. En effet, selon Nie *et al.* [178], la taille diminue lorsque la viscosité augmente alors que la tendance opposée est observée numériquement par Shi *et al.* [183]. Enfin, selon deux autres études, la viscosité de la phase dispersée semble avoir très peu d’influence sur la taille des gouttes [171], [189].

D’autre part, d’après Nie *et al.* [178], la viscosité de la phase dispersée n’influence pas uniquement la taille des gouttes mais également la dépendance de la taille des gouttes avec les débits des fluides. A faible viscosité, la rupture suit un mécanisme de rupture contrôlée par les débits : le volume V des gouttes est alors proportionnel au rapport des débits. Lorsque la viscosité augmente, la taille des gouttes s’écarte de cette loi, la dépendance du volume avec le rapport de débit devient plus faible. Le volume V suit donc les lois suivantes :

- à faible viscosité (<10 mPa.s) $V \sim \frac{Q_d}{Q_c}$
- à plus forte viscosité (20 à 500 mPa.s) $V \sim \left(\frac{Q_d}{Q_c}\right)^\alpha$ ou $V \sim C a_c^{-\beta}$ à $\frac{Q_d}{Q_c}$ constant
avec $\alpha < 1$ et $0 < \beta < 0,5$

Les auteurs remarquent aussi que lorsque la viscosité augmente, la taille des gouttes augmente, la monodispersité s’améliore ($CV < 1,8-2\%$) et la fréquence de production diminue.

La viscosité de la phase continue et la tension interfaciale sont contenues dans le nombre Capillaire. Selon les lois décrites au paragraphe précédent, la taille des gouttes augmenterait donc lorsque la tension interfaciale augmente et que la viscosité de la phase continue diminue (à rapport de débit constant) dans le cas d’une jonction en croix ou d’un MFFD type Anna en régime de *dripping*. Dans le cas de la jonction en croix, l’étude de Cubaud *et al.* [171] a été réalisée en faisant varier ces paramètres, leur dépendance est donc bien prise en compte dans les lois et confirme cela. Dans le cas d’une jonction MFFD de type Anna, les études établissant les lois d’échelle ont été réalisées à tension interfaciale constante. L’influence de ce paramètre n’est donc peut-être pas totalement décrite par le nombre Capillaire.

En régime de *squeezing*, la taille des gouttes ne semble pas être influencée par la viscosité [177] et la tension interfaciale [141].

L’influence de la viscoélasticité de la phase dispersée a été étudiée en utilisant des fluides de Boger, fluides viscoélastiques ayant une viscosité de cisaillement quasi-indépendant du taux de cisaillement. Ces fluides permettent alors d’étudier l’élasticité en négligeant les effets rhéofluidifiants. Pour cela, des solutions aqueuses de polymères en régime dilué ont été utilisées. L’effet de l’élasticité a été examiné en comparant

les résultats obtenus avec des solutions de masse moléculaire variable, et donc d’élasticité variable, à ceux obtenus avec une solution ayant un comportement Newtonien. Les résultats des études sont cohérents entre eux : lorsque l’élasticité de la phase dispersée augmente, le temps de rupture augmente et la fréquence de production diminue alors.

L’influence de la viscoélasticité a aussi été étudiée sur la dynamique du filament de phase dispersée lors de la formation, sa rupture et la présence de gouttes satellites. Brièvement, lorsque l’élasticité augmente, la longueur du filament augmente, son amincissement avant rupture est plus lent et le nombre de gouttes satellites augmente [173], [181], [190], [191]. Toutefois, l’étude de la thèse se concentre sur le contrôle de la taille et de la fréquence de production de gouttes. Ces caractéristiques (longueur du filament et nombre de gouttes satellites) ne seront donc pas étudiées dans le cadre de la thèse.

	Référence	Type de MFFD	Fluides		Gamme de valeur du paramètre étudié	Influence sur la taille	Influence sur la fréquence
			Phase dispersée	Phase continue			
Viscosité de la phase dispersée	Seo <i>et al.</i> [189]	Type Anna	Monomères	Eau + 2% SDS	$3,5 < \eta_d < 1813$ mPa.s	Pas de tendance claire	
	Nie <i>et al.</i> [178]	Type Anna	Monomères ou huile silicone	Eau + 2% SDS	$10 < \eta_d < 500$ mPa.s	↑ quand η_d ↑	↓ quand η_d ↑
	Shi <i>et al.</i> [183] (simulation numérique)	Type Anna	Eau	Huile	$\eta_d/\eta_c=0,25 ; 0,5 ; 1$	↓ quand η_d/η_c ↑	
Viscosité de la phase continue	Cubaud <i>et al.</i> [171]	Jonction croix	Huile PDMS ou Glycérol	Isopropanol, éthanol ou huile PDMS	$50 < \eta_d < 1214$ mPa.s ($\eta_d/\eta_c \geq 22$)	Très faible influence	
	Lee <i>et al.</i> [177]	Type Anna	Eau + tensioactifs	Huile minérale ou silicone	$10 < \eta_c < 362$ mPa.s	Squeezing : pas d'influence Dripping : ↑ quand η_c ↑	Squeezing : pas d'influence Dripping : ↓ quand η_c ↑
	Li <i>et al.</i> [172]	Jonction croix	Huile silicone	Glycérol	$0,92 < \eta_c < 10,8$ mPa.s	↓ quand η_c ↑	
	Lu <i>et al.</i> [192]		Air	Glycérol	$4 < \eta_c < 500$ mPa.s	↓ quand η_c ↑	
	Shi <i>et al.</i> [183] (simulation numérique)	Type Anna	Eau	Huile	$\eta_d/\eta_c=0,25 ; 0,5 ; 1$	↓ quand η_c ↑	
	Cubaud <i>et al.</i> [171]	Type Anna	Huile PDMS ou Glycérol	Isopropanol, éthanol ou huile PDMS	$0,82 < \eta_c < 50$ mPa.s ($\eta_d/\eta_c \geq 22$)	↓ quand η_c ↑	
	Garstecki <i>et al.</i> [141]	Type Anna	Air	Eau ou glycérol	$6,1 < \gamma < 10,8$ mN/m	Squeezing : Pas d'influence	
Tension interfaciale	Cubaud <i>et al.</i> [171]	Jonction croix	Huile PDMS ou Glycérol	Isopropanol, éthanol ou huile PDMS	$1,5 < \gamma < 30,4$ mN/m	↑ quand γ ↑	
Viscoélasticité de la phase dispersée	Zhou <i>et al.</i> [173] (simulation numérique)		Eau (fluide Newtonien) ou phase aqueuse viscoélastique (modèle de Oldroyd-B)	Huile silicone ($\eta_d/\eta_c=0,167$)	Nombre de Deborah : De=0 ou De=0,113	↑ quand phase dispersée viscoélastique (+7,5%)	↓ quand la phase dispersée est viscoélastique
	Steinhaus <i>et al.</i> [181]		PEO de différentes M_w ($\eta_d \approx 6$ mPa.s, fluides de Boger)	Huile silicone	Temps de relaxation (modèle Zimm) : $0,051 \text{ ms} < \tau < 0,37 \text{ ms}$		↓ quand M_w ↑ donc ↓ quand l'élasticité ↑
	Arratia <i>et al.</i> [190]		Glycérol 90% seul (fluide Newtonien) ou avec PAA de différentes M_w (fluides de Boger, $\eta_d \approx 0,2$ Pa.s)	Huile minérale + 0,1% Span80	Temps de relaxation (modèle FENE-P) : $0,9 \text{ ms} < \tau < 450 \text{ ms}$		↓ quand M_w ↑ donc ↓ quand l'élasticité ↑

Tableau 3-2 : Influence des propriétés de fluides sur la taille des gouttes et la fréquence de production dans un dispositif MFFD en régime de dripping : (augmentation ↑ ou diminution ↓)

3.1.4 Transition dripping/jetting

CONFIDENTIEL

3.1.5 Bilan

Les études sur la génération de gouttes en MFFD mettent en évidence que la taille des gouttes, leur fréquence de production et leur gamme de production dépendent :

- de la géométrie du système
- des paramètres fluidiques (débits, pressions)
- des propriétés physico-chimiques des fluides

Cependant, malgré les nombreuses études réalisées, **il n’existe pas à l’heure actuelle de lois générales décrivant la taille des gouttes, leur fréquence de production et les limites entre les régimes en fonction de tous les paramètres du système.**

La taille des gouttes est déterminée par le rapport de débit et/ou le nombre Capillaire de la phase continue. Toutefois, les lois diffèrent selon la géométrie utilisée, les régimes de fonctionnement (*squeezing*, *dripping*) et les fluides utilisés.

La fréquence de production augmente lorsque le rapport de débit Q_d/Q_c augmente ou que le nombre Capillaire de la phase continue augmente. Cependant, lorsque les débits dépassent des valeurs critiques, le *jetting* apparaît. La transition *dripping/jetting* semble donc déterminer la fréquence maximale atteignable avant *jetting*. Cela met en évidence **l’importance de caractériser la transition *dripping/jetting* dans le cadre de notre étude.**

La transition *dripping/jetting* est uniquement décrite en termes d’ordre de grandeur de nombre Capillaire ou de Weber, et les valeurs diffèrent selon les études. L’influence des propriétés des fluides sur les valeurs critiques de transition n’a pas été clairement étudiée.

D’autre part, les études ont été réalisées principalement avec des phases dispersées newtoniennes de faible viscosité (<500 mPa.s). **L’influence de la viscosité de la phase dispersée a été étudiée avec des phases dispersées relativement peu visqueuses (<2 Pa.s) et les résultats ne sont pas clairs et parfois contradictoires.** Le caractère non-Newtonien de la phase dispersée n’a été étudié que dans le cas de fluides de Boger, fluides viscoélastiques mais de viscosité constante en fonction du taux de cisaillement. **L’influence de la rhéofluidification de la phase dispersée n’a, à notre connaissance, jamais été décrite.**

3.2 Positionnement et démarche de l’étude

Dans le cadre de l’encapsulation de cellules, la phase dispersée est un biopolymère de préférence de forte viscosité (pouvant être >10 Pa.s) (voir 1.2). Ce type de solution présente alors un caractère rhéofluidifiant non négligeable. C’est le cas en particulier de l’alginate, polymère le plus répandu pour l’encapsulation de

cellules [1]. Toutefois, à l’heure actuelle, le biopolymère idéal n’a pas été défini. Il est donc important de comprendre comment contrôler la taille et optimiser la fréquence de production des gouttes de polymère, dans une large gamme de viscosité et dans le cas d’une solution rhéofluidifiante ou non.

L’objectif de l’étude est donc de caractériser l’influence des paramètres du système sur la taille des gouttes, leur fréquence de production et la limite dripping/jetting, quelle que soit la phase dispersée, Newtonienne ou non, dans une gamme de viscosité allant jusqu’à 10 Pa.s.

Le système de génération de goutte utilisé dans cette thèse est un système MFFD avec une chambre triangulaire après la jonction entre les deux phases (type Tan) dans lequel les fluides sont contrôlés en pression. La géométrie du système est décrite en détails dans le Chapitre 2 Matériels et méthodes.

Le paragraphe suivant présente les régimes obtenus et les tendances observées sur la variation de la taille, de la fréquence de production des gouttes et des transitions entre les régimes, dans le cas de notre système et de solutions d’alginate.

3.2.1 Régime de production de gouttes et diagramme en pression

La Figure 3-9 présente le diagramme en pression typiquement obtenu avec les géométries MFFD utilisées dans cette thèse.

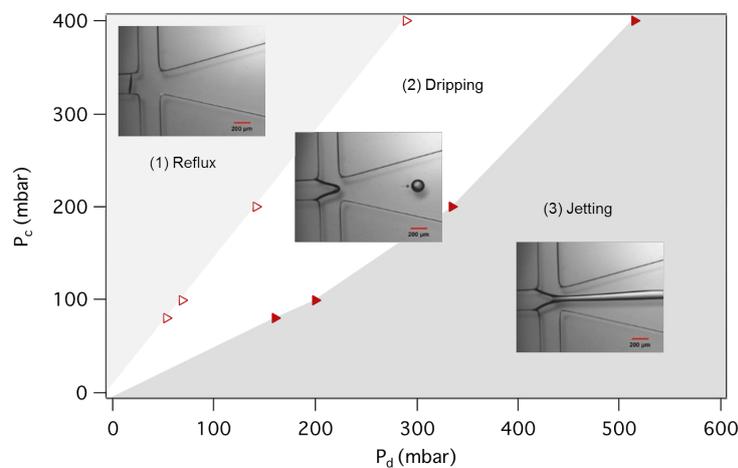


Figure 3-9 : Diagramme en pression présentant les différents régimes typiquement obtenus : (1) Reflux de la phase dispersée, (2) *Dripping* : production de gouttes, (3) *Jetting* : Formation d’un jet de phase dispersée. Phase dispersée : alginate 4% ; phase continue : huile de soja. Géométrie A. Les marqueurs vides et pleins correspondent respectivement aux points expérimentaux pour lesquels l’alginate est stable à la jonction et aux points de transition *dripping/jetting*.

A faibles pressions P_d appliquée à la phase dispersée, celle-ci reflue et la phase continue envahit le canal de phase dispersée en amont de la jonction. Lorsque la pression P_d devient supérieure à une pression critique, appelée $P_{d,stab}$, il y a production de gouttes, c’est le régime de *dripping*. Lorsque P_d augmente davantage et dépasse une autre valeur critique, appelée $P_{d,jet}$, le *jetting* apparaît. Les pressions $P_{d,stab}$ et $P_{d,jet}$ sont toutes deux dépendantes de la pression P_c appliquée à la phase continue. Les diagrammes de la Figure 3-10 et de la Figure 3-11 montrent l’influence de la nature des phases dispersée et continue et des dimensions des canaux sur les limites entre ces régimes.

Les régimes obtenus correspondent donc bien aux régimes décrits dans la littérature et présentés au paragraphe 3.1.1.

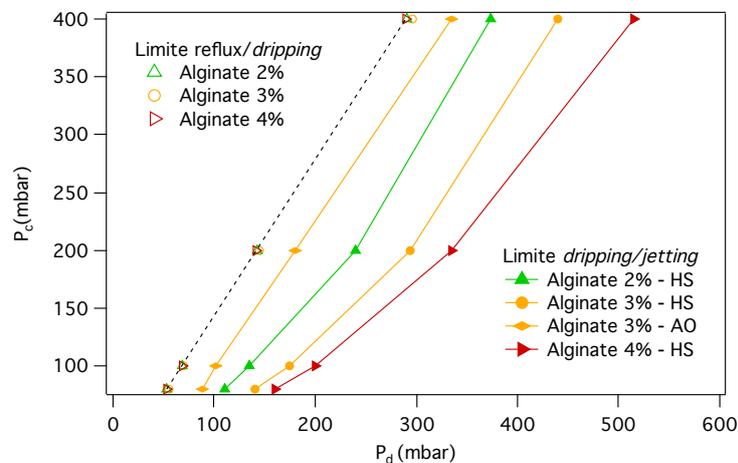


Figure 3-10 : Influence de la nature des phases dispersée et continue sur les limites entre les régimes. Phases dispersées : Alginat 2% ($\eta_{od}=0,80$ Pa.s), 3% ($\eta_{od}=3,48$ Pa.s) et 4% ($\eta_{od}=10,39$ Pa.s). Phases continues : HS = huile de soja ($\eta_c=50,7$ mPa.s, $\gamma_{eau/HS}=25,1$ mN/m) ; AO = acide oléique ($\eta_c = 36,7$ mPa.s, $\gamma_{eau/AO}=12,6$ mN/m). Géométrie A.

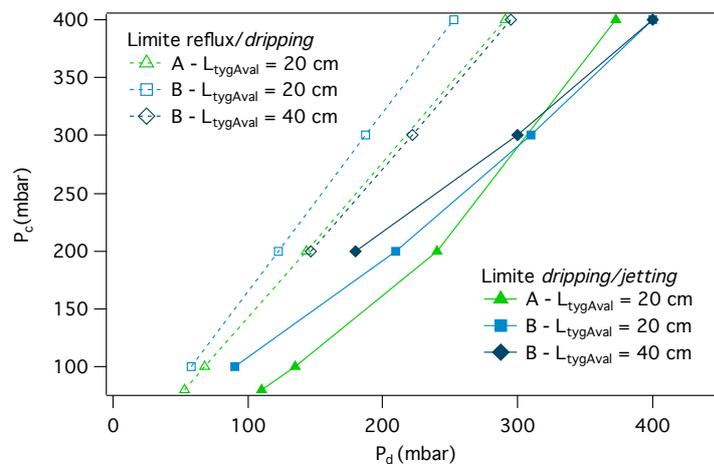


Figure 3-11 : Influence de la géométrie sur les limites entre les régimes. Phase dispersée : Alginat 2%. Phase continue : HS=huile de soja. Géométrie A avec $L_{tygAval}=20$ cm et géométrie B avec $L_{tygAval}=20$ ou 40 cm.

La limite *reflux/dripping* reste inchangée lors de la variation des phases dispersée et continue alors qu'elle varie lorsque la géométrie A ou B est utilisée et lorsque la longueur du tube de connectique de sortie ($L_{tygAval}$) est modifiée. La limite *reflux/dripping* semble donc indépendante de la nature des fluides mais dépendante des dimensions géométriques du système.

La limite *dripping/jetting* varie selon la nature des fluides et la géométrie du système. A pression P_c constante, la pression $P_{d,jet}$ à laquelle apparaît le *jetting* diminue lorsque la viscosité de la phase dispersée diminue. Elle devient également plus faible lorsque la viscosité de la phase continue et/ou la tension interfaciale diminuent.

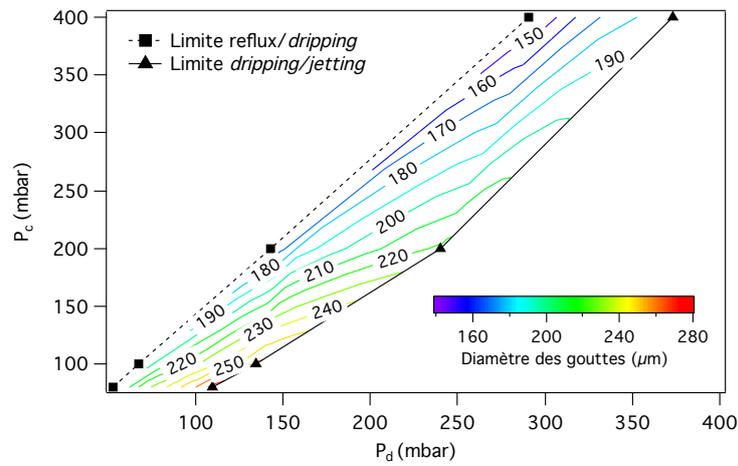


Figure 3-12 : Diamètre des gouttes en fonction des pressions appliquées. Phase dispersée : Alginate 2%. Phase continue : Huile de soja. Géométrie A.

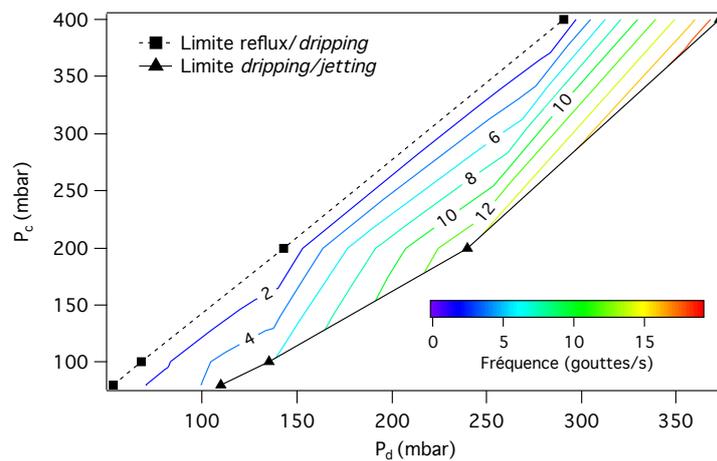


Figure 3-13 : Fréquence de production en fonction de pressions appliquées. Phase dispersée : Alginate 2%. Phase continue : Huile de soja. Géométrie A.

Au sein du régime de *dripping*, la taille et la fréquence de production des gouttes varient en fonction des pressions appliquées à chaque phase. La taille de gouttes augmente lorsque la pression P_c diminue et lorsque P_d augmente à P_c fixe (Figure 3-12). La fréquence augmente lorsque P_d augmente à P_c fixe. La fréquence maximale atteinte augmente lorsque P_c augmente (Figure 3-13). La taille et la fréquence varient également en fonction de la nature des fluides et de la géométrie du système (données non présentées).

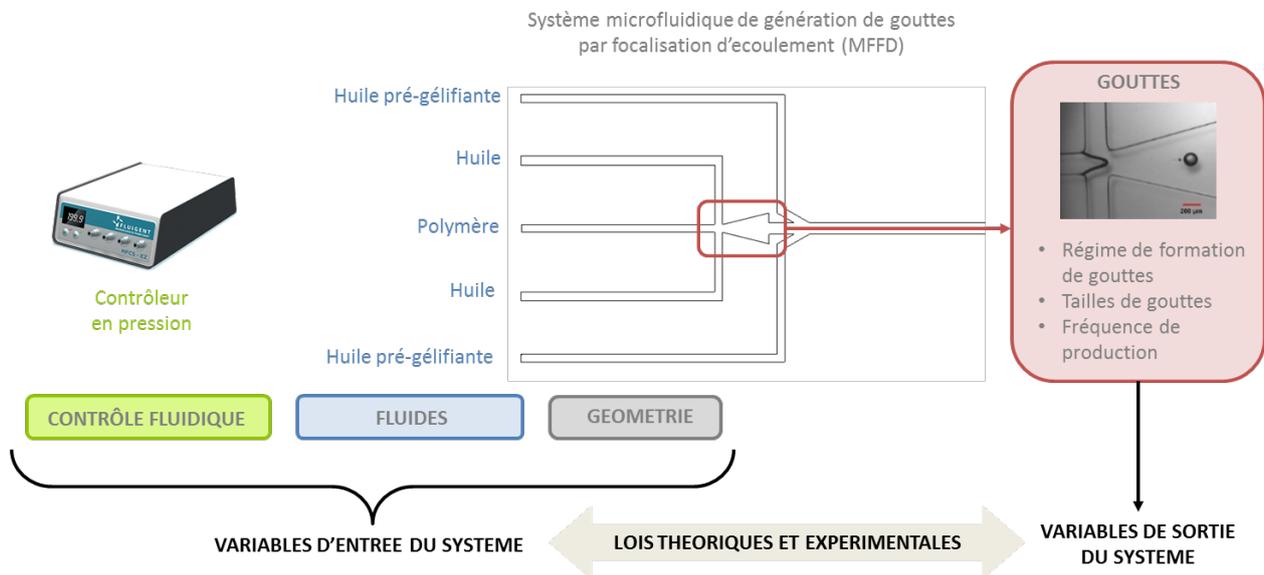
3.2.2 Bilan, objectif et démarche de l’étude

Ces expériences mettent en évidence que, à pression fixe appliquée à la phase continue, la fréquence de production augmente lorsque la pression appliquée à la phase dispersée augmente et devient maximale juste avant que le *jetting* n’apparaisse. La transition *dripping/jetting* détermine donc la fréquence maximale de production des gouttes. Or, les pressions correspondantes à cette transition dépendent de la nature de chaque phase (Figure 3-10) ainsi que de la géométrie du système et des dimensions des tubes de connectique (Figure 3-11). Les pressions permettant de maximiser la fréquence de production diffèrent donc selon le polymère utilisé pour l’encapsulation (nature de la phase dispersée), la gamme de taille de capsules désirées (dimensions des canaux) et le banc expérimental utilisé (dimensions des connectiques).

L’objectif final de l’étude réalisée dans la partie I est d’optimiser la géométrie des canaux et la nature de la phase continue et prédire les paramètres fluidiques à utiliser pour maximiser la fréquence de production de gouttes de taille donnée, quel que soit le polymère utilisé et les connectiques utilisées.

La démarche consiste alors à étudier l’influence de toutes les variables d’entrée du système microfluidique sur la taille des gouttes, leur fréquence de production et la transition *dripping/jetting* afin d’obtenir des lois théoriques et expérimentales reliant les variables d’entrée et de sortie. L’inversion des lois obtenues permet alors de prédire les dimensions des canaux et les pressions à appliquer en entrée de chaque fluide pour atteindre la fréquence maximale de production de gouttes d’une taille donnée, pour un polymère donné.

PARTIE I : CONTRÔLE DE LA TAILLE ET OPTIMISATION DE LA FREQUENCE DE PRODUCTION



Pour cela, les trois types de variables d’entrée ont été étudiés dans une certaine gamme de valeurs (Tableau 3-3) :

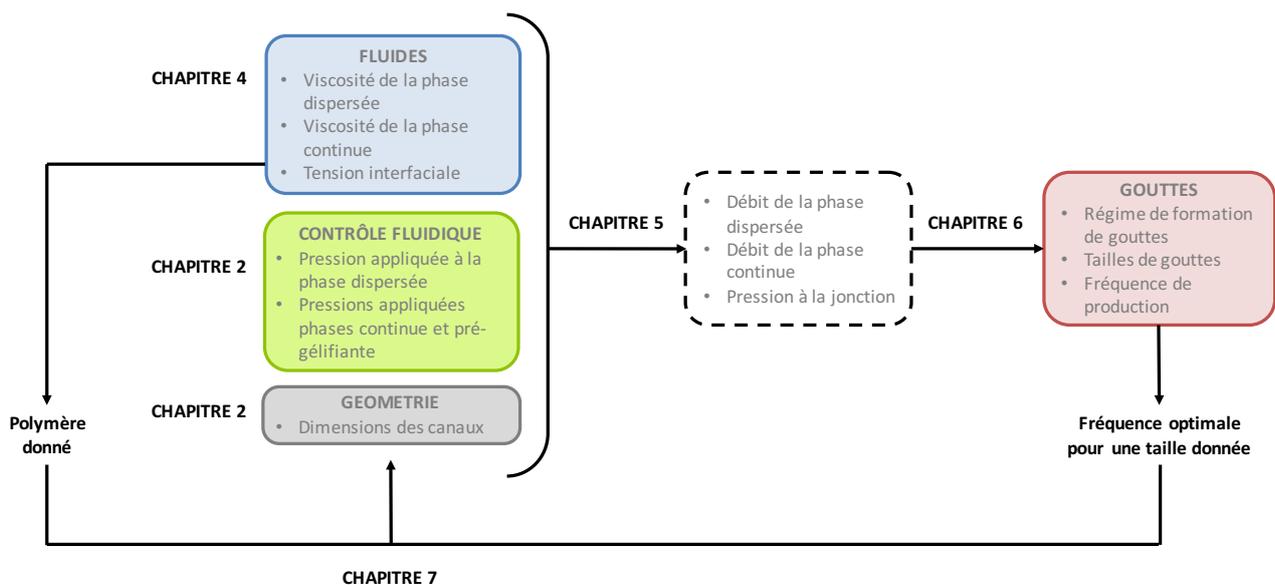
- Les propriétés physico-chimiques de solutions utilisées
- Les paramètres fluidiques
- La géométrie du système

La description des géométries et le principe du contrôle en pression sont décrits en détails dans le Chapitre 2 Matériels et méthodes. La caractérisation de toutes les solutions utilisées dans cette partie fait l’objet du **Chapitre 4**.

Les études bibliographiques montrent que la taille, la fréquence et la transition *dripping/jetting* sont déterminées par les écoulements présents dans le système et dépendent donc entre autres du débit de chaque fluide. Le système étant contrôlé en pression et non en débit, une étape intermédiaire de caractérisation fluide et de calcul des débits est donc nécessaire.

La méthodologie a donc été la suivante :

- Dans un premier temps, le système a été modélisé analytiquement et numériquement afin d’obtenir les débits de chaque fluide dans le système ainsi que la pression à la jonction des deux fluides en fonction des variables d’entrée du système (**Chapitre 5**).
- Dans un second temps, le régime de production de gouttes, leur taille et fréquence de production ont été caractérisés en fonction des débits de chaque phase et des propriétés physico-chimiques des fluides (**Chapitre 6**).
- Enfin, la combinaison des lois obtenues aux Chapitres 5 et 6 a permis de mettre en place un modèle prédictif concernant les dimensions des canaux à utiliser et les pressions à appliquer en entrée de chaque fluide afin d’obtenir la fréquence maximale de production de gouttes d’une taille donnée, à partir d’un polymère donné (**Chapitre 7**).



VARIABLES D’ENTRÉE DU SYSTÈME	GAMME DE VALEURS	NOMBRE DE VALEURS
Propriétés physico-chimiques des fluides		
η_d Viscosité dynamique de la phase dispersée	0,08 à 10,4 Pa.s	4
n, τ Caractère rhéofluidifiant de la phase dispersée	Alginate/Ficoll	2
η_c Viscosité dynamique de la phase continue	36,7 à 114,3 mPa.s	3
γ Tension interfaciale	6,3 à 25,1 mN/m	5
Contrôle fluidique		
P_d Pression appliquée à la phase dispersée	au sein du dripping	
P_c Pression appliquée à la phase continue	60 à 600 mbar	>4
P_{hAC} Pression appliquée à la phase pre-gélifiante	60 à 600 mbar	>4
Géométrie		
w Largeur des canaux	200 μm et 350 μm	2 géométries
L Longueur des canaux		2 géométries

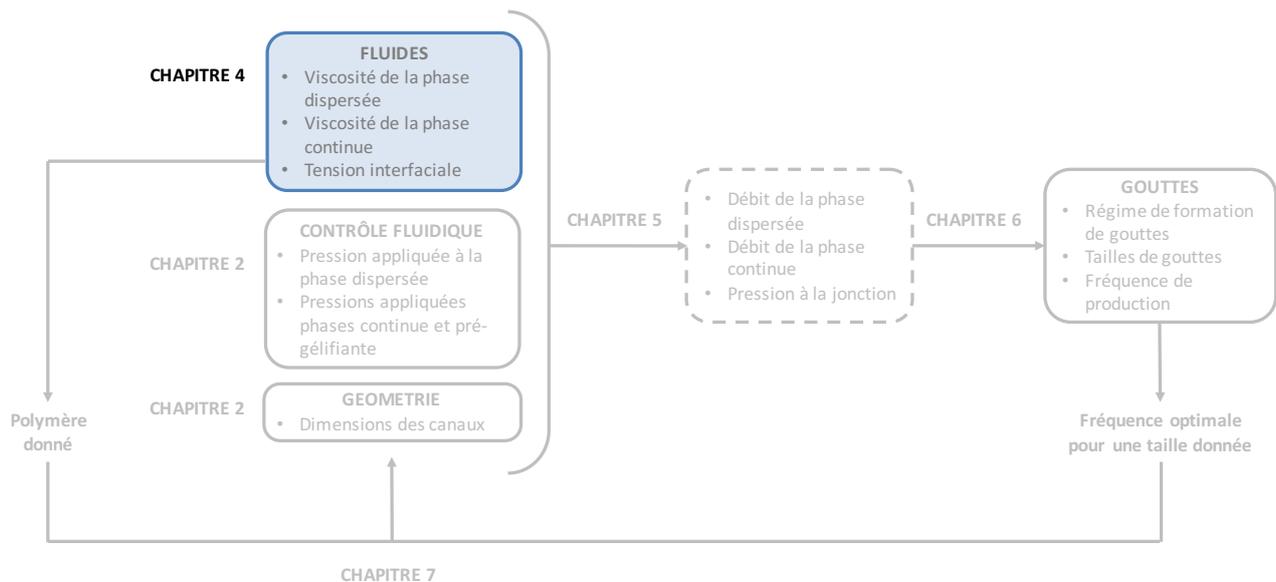
Tableau 3-3: Récapitulatif des variations des variables d’entrées du système utilisées dans cette partie

Chapitre 4

CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DES PHASES DISPERSEES ET CONTINUES

4.1 Rhéologie de la phase dispersée	105
4.1.1 Viscosité dynamique des solutions et comportement rhéofluidifiant	106
4.1.1.1 Influence du cisaillement et rhéofluidification.....	106
4.1.1.2 Influence de la concentration.....	108
4.1.1.3 Influence de la température	110
4.1.1.4 Influence de la durée de conservation des solutions sur la viscosité dynamique	111
4.1.2 Comportement élastique des solutions	112
4.1.2.1 Contraintes normales et mise en évidence du comportement élastique.....	112
4.1.2.2 Viscoélasticité et module élastique	113
4.2 Viscosité de la phase continue et tension interfaciale.....	115
4.3 Viscosité de la phase pré-gélifiante	117
4.4 Bilan.....	117

Ce chapitre se focalise sur la caractérisation des solutions utilisées comme phases dispersées et phases continues dans l'étude de la formation de gouttes en MFFD.



Dans cette étude, la caractérisation des propriétés des fluides est nécessaire pour deux raisons :

- le calcul des débits de chaque phase (Chapitre 5)

Lorsque le déplacement des fluides est contrôlé en pression, le débit des fluides dépend des résistances hydrauliques des canaux dans lesquels ils s'écoulent (Chapitre 5). Or, les résistances hydrauliques dépendent entre autres de la viscosité dynamique des fluides qui circulent dans ces canaux. La connaissance de cette dernière est donc nécessaire pour le calcul des débits de chaque phase.

- l'établissement des lois sur la taille et la fréquence de production (Chapitre 6)

La formation des gouttes résulte de la compétition entre les contraintes visqueuses et les contraintes capillaires (Chapitre 3). Dans le cas de fluides viscoélastiques, les contraintes élastiques semblent également entrer en jeu. Il est donc nécessaire de caractériser la viscosité de chaque phase, le caractère non-Newtonien ainsi que la tension interfaciale entre les deux phases.

4.1 Rhéologie de la phase dispersée

Le polymère choisi pour l'encapsulation dans le cadre de cette thèse est l'alginate ultra-pur Pronova™ SLG100 commercialisé par NovaMatrix (Chapitre 2). Afin d'étudier l'influence de la viscosité de la phase dispersée η_d sur la formation de gouttes, cet alginate a été utilisé à différentes concentrations : 1%, 2%, 3% et 4% wt/wt. L'influence du caractère non-Newtonien de cette phase a été étudiée en comparant ces

solutions d’alginate avec des solutions d’un autre polysaccharide, le Ficoll®, à des concentrations permettant d’obtenir des viscosités équivalentes à celles de l’alginate.

Les propriétés rhéologiques de ces solutions ont été caractérisées au rhéomètre selon le protocole décrit au paragraphe 2.3.1 du Chapitre 2. Sauf indications contraires, les mesures ont été effectuées à une température $T=22,5^{\circ}\text{C}$, température du laboratoire dans lequel sont réalisées les expériences microfluidiques. Les mesures de rhéologie de l’alginate ont été effectuées sur des solutions préparées au maximum un mois avant et conservées à 4°C . Les mesures de rhéologie du Ficoll ont été effectuées sur des solutions préparées moins d’une semaine avant et conservées à 4°C . L’influence du temps de conservation sur les propriétés rhéologiques sera étudié au paragraphe 4.1.1.4.

4.1.1 Viscosité dynamique des solutions et comportement rhéofluidifiant

La viscosité dynamique η des solutions de polymère dépend de la concentration c du polymère, de la température T et du cisaillement $\dot{\gamma}$ appliqué au polymère : $\eta(c, T, \dot{\gamma})$. L’influence de chacun de ces paramètres est étudiée dans les paragraphes suivants. La viscosité de l’alginate dépend également de la nature de l’alginate (proportion de chaque monomère, arrangement des monomères et degré de purification) [1] mais cet aspect ne sera pas étudié ici puisque seul l’alginate Pronova™ SLG100 (NovaMatrix) a été utilisé au cours de cette thèse.

4.1.1.1 Influence du cisaillement et rhéofluidification

Lors de la formation de gouttes, la phase dispersée est cisailée par la phase continue. Il est donc important de caractériser l’influence du cisaillement sur la viscosité de la phase dispersée.

Comme le montre la Figure 4-1, la viscosité de l’alginate est constante à faible cisaillement puis diminue lorsque le cisaillement augmente : **l’alginate a un comportement non-Newtonien de type rhéofluidifiant**. Dans le cas du Ficoll, le caractère rhéofluidifiant est nettement moins prononcé.

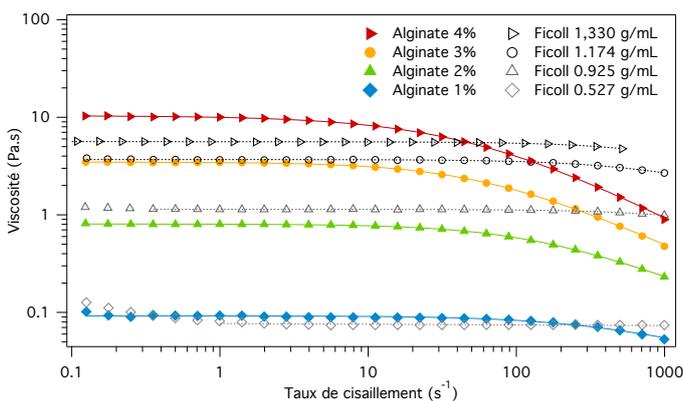


Figure 4-1 : Viscosité de cisaillement de solutions d’alginate et de Ficoll à différentes concentrations. Les marqueurs correspondent aux points expérimentaux et les lignes au modèle de Carreau-Yasuda. Les mesures ont été effectuées à $T=22,5^{\circ}\text{C}$.

Le caractère rhéofluidifiant s’explique par le fait que lorsque que le cisaillement augmente, les chaînes de polymère se désenchevêtrent partiellement et s’alignent dans le sens de l’écoulement, réduisant ainsi la viscosité du fluide. Ce phénomène apparaît donc lorsque, sous l’effet du cisaillement, les chaînes de

polymère n'ont plus le temps de reprendre leur conformation d'équilibre. La rhéofluidification apparaît donc lorsque le cisaillement appliqué est supérieur à $1/\tau$ où τ est le temps caractéristique de relaxation du polymère.

Une comparaison quantitative de la viscosité et du caractère rhéofluidifiant des différentes solutions peut être réalisée en ajustant les données par un modèle rhéologique. Plusieurs modèles permettent de décrire le comportement rhéofluidifiant de polymères. Celui de l'alginate est généralement décrit par le modèle de Carreau-Yasuda [1]. Dans ce modèle, le fluide se comporte comme un fluide newtonien à faible cisaillement ($\dot{\gamma} \ll 1/\tau$) puis la viscosité diminue en suivant une loi de puissance à fort cisaillement ($\dot{\gamma} \gg 1/\tau$). La transition entre les régimes Newtonien et rhéofluidifiant a lieu pour un cisaillement caractéristique $\lambda=1/\tau$. La viscosité est alors décrite par la relation suivante :

$$\eta(\dot{\gamma}) = \eta_0 \left[1 + (\tau \dot{\gamma})^a \right]^{\frac{1-n}{a}} \quad (4-1)$$

où η est la viscosité de cisaillement, η_0 est la viscosité à cisaillement nul, τ est le temps de relaxation du polymère qui définit le cisaillement de transition Newtonien/rhéofluidifiant (λ), a est une constante qui caractérise la taille et la forme de la région de changement de régime ($a \approx 1$) et n est une constante qui caractérise le degré de rhéofluidification ($n=1$ pour un fluide newtonien et $0 < n < 1$ pour un fluide rhéofluidifiant i.e. lorsque n décroît le caractère rhéofluidifiant s'accroît).

Les courbes obtenues avec les différentes solutions d'alginate et de Ficoll sont donc ici ajustées par la relation (4-1) permettant ainsi par régression d'obtenir les coefficients du modèle. Les valeurs obtenues sont regroupées dans le tableau de la Figure 4-1 et représentées dans la Figure 4-2.

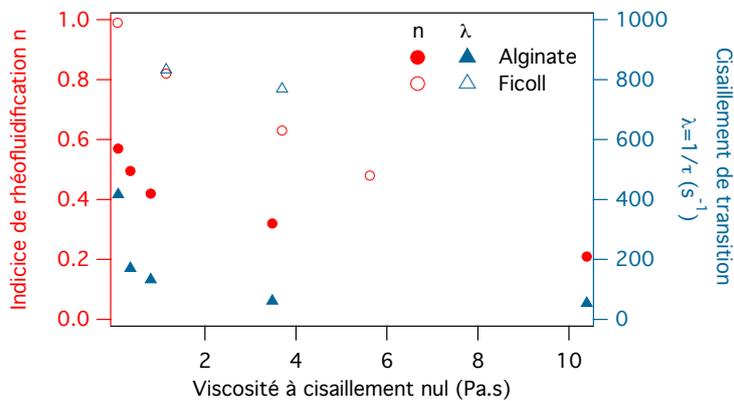


Figure 4-2 : Comportement rhéofluidifiant des solutions d'alginate et de Ficoll en fonction de leur viscosité à cisaillement nul. Les marqueurs pleins correspondent à l'alginate et les marqueurs vides au Ficoll. Les cercles correspondent aux valeurs de n et les triangles aux valeurs de cisaillement de transition newtonien/rhéofluidifiant λ .

Les caractéristiques de rhéofluidification sont ici étudiées en fonction de la viscosité à cisaillement nul de façon à pouvoir comparer le comportement non-newtonien de l'alginate et du Ficoll.

Lorsque la viscosité à cisaillement nul augmente, le degré de rhéofluidification augmente (n diminue) et la transition Newtonien/rhéofluidifiant apparaît pour des cisaillements plus faibles (λ diminue) (Figure 4-2). Dans les gammes de cisaillement et de concentration testées, les valeurs de n sont environ deux fois plus

faibles pour l’alginate que pour le Ficoll : l’alginate présente donc un caractère rhéofluidifiant significativement plus important que le Ficoll. D’autre part, la rhéofluidification du Ficoll n’apparaît que pour des cisaillements très élevés ($>700\text{s}^{-1}$) et significativement plus importants que dans le cas de l’alginate ($<500\text{s}^{-1}$). Ces résultats suggèrent donc que **le Ficoll est un bon candidat pour étudier l’influence du comportement rhéofluidifiant sur la formation de gouttes de polymère de fortes viscosités.**

4.1.1.2 Influence de la concentration

Dans le cas de l’alginate, l’influence de la concentration a été étudiée en caractérisant des solutions de concentrations suivantes : 1%, 2%, 3% et 4% wt/wt (soit respectivement 0,01, 0,02, 0,03 et 0,04 g/mL). Dans le cas du Ficoll, des solutions de concentrations comprises entre 0,2 et 1,3 g/mL ont été utilisées.

Les résultats de la Figure 4-1 montrent que la concentration de la solution de polymère influence fortement sa viscosité. D’après la Figure 4-3, **la viscosité à cisaillement nul augmente lorsque la concentration augmente en suivant une loi de puissance.**

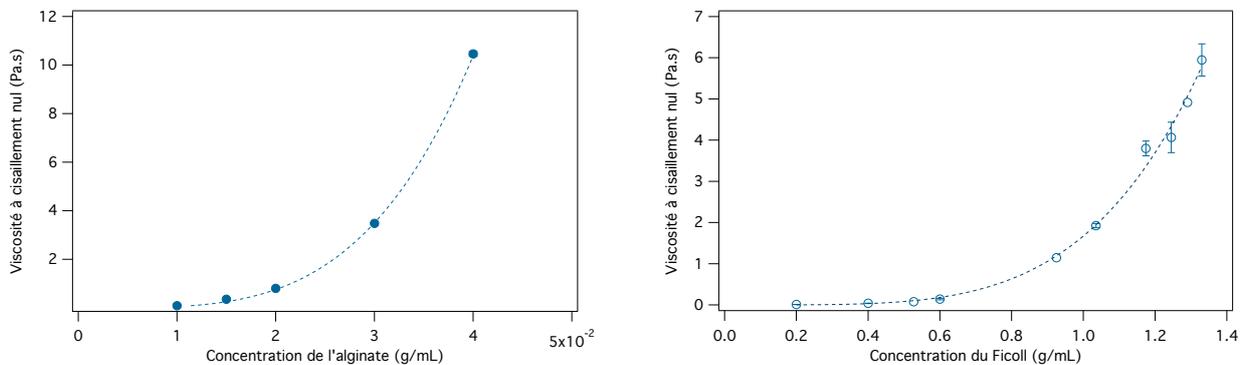


Figure 4-3 : Influence de la concentration en polymère sur la viscosité à cisaillement nul (gauche) Alginat SLG100, (droite) Ficoll400 ; Les points correspondent aux données expérimentales et la courbe correspond à l’ajustement des données par la relation ((4-2)). Les barres d’erreurs correspondent à l’écart-type sur les mesures lorsque celles-ci ont été répétées (n=2 ou 3). Les mesures ont été effectuées à $T=22,5^{\circ}\text{C}$.

De façon générale, la viscosité à cisaillement nul d’une solution polymérique suit la relation de Martin [195]:

$$\eta_0 = \eta_s \left\{ 1 + (c[\eta]) e^{k'[\eta]c} \right\}$$

où η_s est la viscosité dynamique du solvant, c est la concentration du polymère (en g/mL), $[\eta]$ est la viscosité intrinsèque et k' est le coefficient de Huggins. La viscosité intrinsèque correspond au volume hydrodynamique occupé par une masse donnée de polymère en régime dilué et s’exprime en mL/g.

Dans le cas de solutions de polysaccharides en régime semi-dilué, la viscosité dynamique à cisaillement nul peut être approchée par la loi de puissance suivante [196] :

$$\eta_0 = \eta_s \left\{ 1 + k(c[\eta])^n \right\} \quad (4-2)$$

où k est une constante caractéristique du polymère. Morris *et al.* ont montré que $k \approx 0,1$ dans le cas des polysaccharides (dont font partie l'alginate et le Ficoll) [196].

L'ajustement par la relation (4-2) des valeurs expérimentales de viscosité à cisaillement nul en fonction de la concentration permet ainsi de déterminer la viscosité intrinsèque $[\eta]$ et les valeurs de l'exposant n pour l'alginate SLG100 et le Ficoll400 utilisés. Des valeurs de $k=0,1$ et $\eta_s=1$ mPa.s ont été utilisées. **Dans le cas de l'alginate SLG100, les valeurs obtenues sont les suivantes : $[\eta]=533$ mL/g et $n=3,8$.** Ces valeurs sont cohérentes avec les valeurs énoncées dans la littérature. En effet, pour des solutions d'alginate en régime semi-dilué, des viscosités intrinsèques comprises entre 290 mL/g et 1566 mL/g [98], [197] et des exposants n de l'ordre de 3-4 [196], [198] ont été décrits. Dans le cas du Ficoll, les valeurs obtenues sont les suivantes : $[\eta]=9,3$ mL/g et $n=4,4$. L'ordre de grandeur de la valeur de viscosité intrinsèque est cohérent avec la valeur donnée par le fournisseur ($[\eta] \approx 17$ mL/g). A notre connaissance, la valeur de n n'est pas référencée dans la littérature.

Cependant, les résultats concernant le Ficoll sont à prendre avec précaution. En effet, il semblerait que le Ficoll ne soit pas totalement solubilisé aux concentrations supérieures à 0,5 g/mL (voir 4.1.2.2). Dans ce cas, la détermination d'une viscosité intrinsèque et de l'exposant n à partir des données de la Figure 4-3 n'est donc pas pertinente et les valeurs obtenues ne sont alors pas fiables. Toutefois, la connaissance des paramètres de la relation (4-2) a permis d'obtenir la courbe de calibration de la viscosité à cisaillement nul de ces « matériaux » en fonction de la concentration en Ficoll. Cette calibration a alors permis de déterminer les concentrations de Ficoll à utiliser pour obtenir des fluides de viscosités à cisaillement nul comparables aux solutions d'alginate utilisées.

Les valeurs de viscosité intrinsèques permettent de déterminer le régime de concentration dans lequel se trouve le polymère (dilué, semi-dilué ou concentré) et de comprendre ainsi l'origine des propriétés rhéologiques observées. En effet, en régime dilué, les chaînes de polymères sont assez espacées en solution pour que leurs interactions soient négligeables : les propriétés de la solution se rapprochent alors de celle du solvant. Le régime semi-dilué apparaît lorsque la concentration atteint et dépasse une valeur critique de recouvrement c^* à partir de laquelle tout le volume de la solution est occupé par des chaînes de polymère. Ces dernières commencent alors à interagir entre elles et à s'enchevêtrer : les propriétés rhéologiques de la solution sont alors en partie déterminées par le polymère. Lorsque la concentration augmente davantage ($c \gg c^*$), les chaînes de polymères sont alors complètement enchevêtrées les unes avec les autres : le comportement d'une telle solution est alors celui d'un réseau.

Morris *et al.* [196] ont montré que dans le cas de solutions de polysaccharides, la transition entre le régime dilué et le régime semi-dilué avait lieu pour $c^*[\eta]=4$. D'après Ouwerx *et al.* [197], le régime semi-dilué est défini par $1 < c^*[\eta] < 10$.

Alginate		
Concentration (% wt/wt)	$c[\eta]$	Régime
1%	5	Semi-dilué
2%	11	Concentré
3%	16	
4%	21	

Tableau 4-1 : Valeurs de $c[\eta]$ pour les différentes solutions d'alginate utilisées

Le Tableau 4-1 présente les valeurs de $c[\eta]$ pour les solutions d'alginate utilisées. Dans le cas de l'alginate 1%, $4 < c[\eta] < 10$ donc **la solution d'alginate 1% semble être en régime semi-dilué**. Pour toutes les autres solutions $c[\eta] > 10$, **les solutions d'alginate de 2 à 4% semblent donc être en régime concentré**. Les chaînes d'alginate sont donc a priori très enchevêtrées et leurs interactions définissent alors les propriétés rhéologiques de ces solutions.

Il faut noter que la viscosité intrinsèque de l'alginate a été déterminée par la relation de Morris *et al.* [196] qui est *a priori* valable uniquement dans le cas de solutions semi-diluées. La valeur obtenue est donc à prendre avec précaution. Une valeur plus fiable pourrait peut-être être obtenue en considérant uniquement des solutions d'alginate de concentration inférieure à 1%. Toutefois, une détermination précise de la viscosité intrinsèque ne présente pas d'intérêt dans la suite de cette thèse.

Dans le cas du Ficoll, la détermination du régime dans lequel se trouve le polymère n'est *a priori* pas pertinente puisque, comme énoncé plus haut et expliqué par la suite (4.1.2.2), il semblerait que le Ficoll ne soit pas en totalement soluble aux concentrations utilisées.

4.1.1.3 Influence de la température

Dans le laboratoire, les expériences d'encapsulation de cellules sont actuellement réalisées à température ambiante ($T \approx 22^\circ\text{C}$). Toutefois, l'utilisation d'un système d'encapsulation régulé à 37°C pourrait être plus favorable pour les cellules. Il est donc important de caractériser l'influence de la température sur la viscosité de l'alginate sur une gamme de température allant jusqu'à 37°C .

D'autre part, les expériences microfluidiques ont été effectuées dans un laboratoire où la température est régulée autour de $22,5^\circ\text{C}$. Les mesures de viscosité ont donc été effectuées à cette température. Cependant, la température du laboratoire varie en pratique entre $21,5^\circ\text{C}$ et $22,5^\circ\text{C}$. La connaissance de l'influence de la température sur la viscosité permet alors de déterminer l'incertitude sur la viscosité des fluides utilisés lors des expériences de génération de gouttes.

Les mesures de viscosité de cisaillement des solutions d'alginate 2%, 3% et 4% et de Ficoll 0,925 g/mL, 1,109 g/mL et 1,330 g/mL ont été effectuées aux températures suivantes : 20°C , $22,5^\circ\text{C}$, 25°C et/ou 37°C . Par soucis d'économie des solutions, les mesures aux différentes températures ont été réalisées sur le même échantillon de solution, de la température la plus faible à la température la plus élevée.

La Figure 4-4 présente les courbes de viscosité de cisaillement obtenues et l'influence de la température sur la viscosité à cisaillement nul de ces solutions.

Les résultats montrent que **la viscosité à cisaillement nul décroît exponentiellement lorsque la température augmente**. Cette décroissance suit la loi de Voger-Fulcher-Tamman [1]. Comme le montre la Figure 4-4, l'influence de la température est d'autant plus importante que la concentration de la solution augmente. Toutefois, l'effet de la température sur la viscosité semble identique pour l'alginate et le Ficoll.

La décroissance entre 20°C et 25°C est d'environ 20%. En approximant cette décroissance à une décroissance linéaire, il en résulte que la viscosité de l'alginate décroît d'environ 4% par degré Celsius dans cette gamme de température. L'incertitude due à la variation de température du laboratoire sur la viscosité des solutions utilisées lors des expériences microfluidiques est donc d'environ 4%.

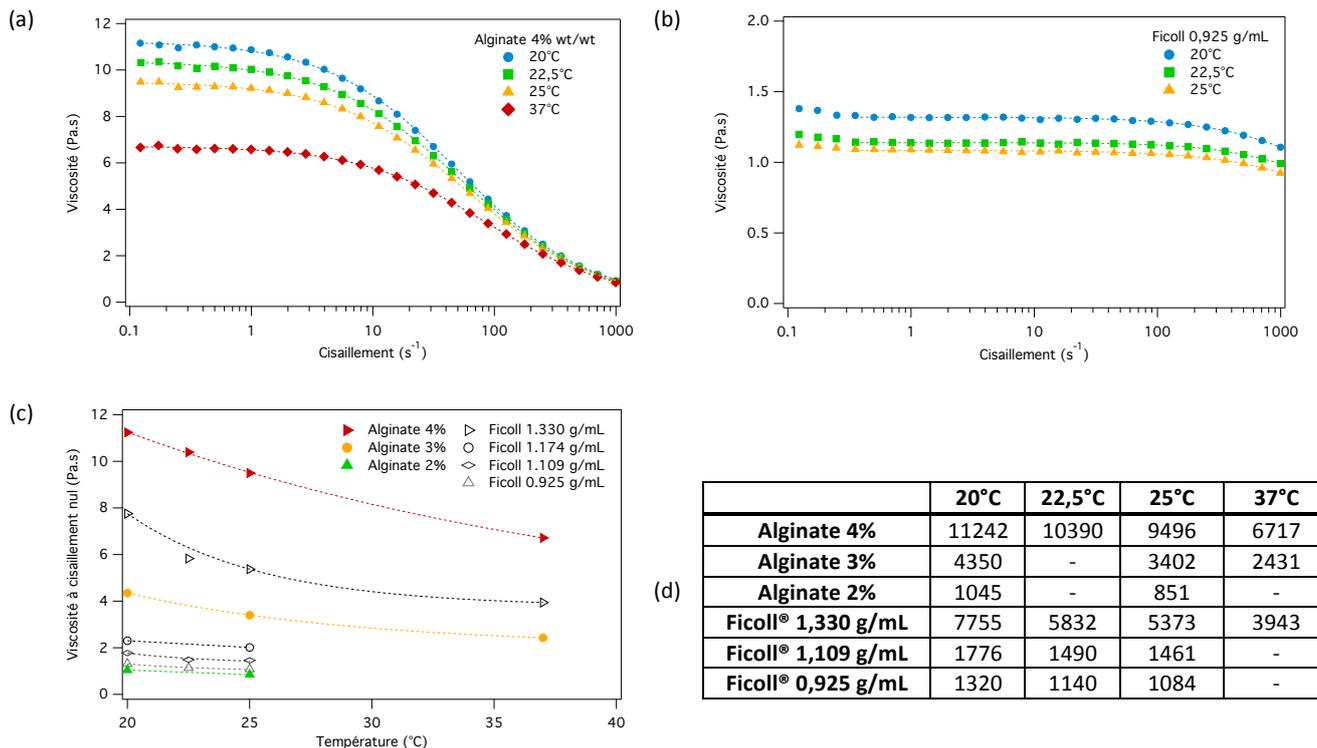


Figure 4-4 : Influence de la température sur la viscosité de cisaillement de solutions d'alginate et de Ficoll : Viscosité en fonction du cisaillement à différentes températures pour l'alginate 4% (a) et le Ficoll 0,925 g/mL (b). Les marqueurs correspondent aux points expérimentaux et les lignes au modèle de Carreau-Yasuda ; Viscosité à cisaillement nul en fonction de la température (c, d). Les marqueurs correspondent aux points expérimentaux et les lignes à un ajustement des données pour une fonction exponentielle.

4.1.1.4 Influence de la durée de conservation des solutions sur la viscosité dynamique

Les solutions de polymères et notamment de polysaccharides se dégradent au cours du temps [199]. Le but de cette étude est de déterminer une durée de conservation maximale des solutions de polymères utilisées, au cours de laquelle les propriétés rhéologiques ne sont que faiblement modifiées. Pour cela, les mesures de viscosité dynamique ont été effectuées à différents temps après préparation des solutions. Entre chaque mesure, les solutions ont été conservées dans un flacon fermé hermétiquement et placé à 4°C.

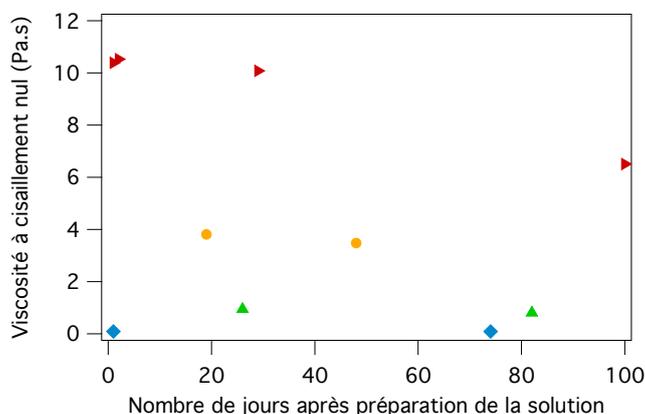


Figure 4-5 : Influence de la durée de conservation sur la viscosité des solutions d'alginate et de Ficoll. Les mesures ont été réalisées à T=22,5°C.

Les résultats montrent que la viscosité à cisaillement nul des solutions diminue au cours du temps. Cette baisse de viscosité s’explique par la dépolymérisation des chaînes au cours du temps. En effet, Holme *et al.* [199] ont montré que des solutions d’alginate purifié se dépolymérisent par des mécanismes d’hydrolyse par catalyses acide et basique et que le taux de dépolymérisation augmente avec le temps. La conservation des solutions à basse température permet donc de ralentir la dépolymérisation des chaînes.

Malgré une conservation à 4°C, une diminution de 5% de la viscosité est atteinte au bout de 2 à 3 semaines après préparation de la solution. Au delà, les propriétés rhéologiques sont alors modifiées de façon non négligeable. Il est donc préférable de ne pas conserver ces solutions au-delà de cette durée.

La durée entre la caractérisation rhéologique des solutions d’alginate et la réalisation des expériences microfluidiques de formation de gouttes a été variable pour des raisons pratiques (entre 1 jour et 1 mois). L’incertitude due à la dégradation avec le temps sur la viscosité des solutions utilisées lors des expériences microfluidiques est donc de l’ordre de 5% à 10%.

4.1.2 Comportement élastique des solutions

Lorsqu’une chaîne de polymère est étirée, elle résiste à l’étirement par une force de rappel. Cette force est responsable de l’élasticité de la solution de polymère. Les solutions de polymères sont alors dites viscoélastiques. Lors de la formation des gouttes en microfluidique, la phase dispersée est étirée par la phase continue avant détachement de la goutte (Chapitre 6). Il est donc important de caractériser l’élasticité des phases dispersées utilisées dans cette partie.

4.1.2.1 Contraintes normales et mise en évidence du comportement élastique

Pour des fluides non-Newtoniens, l’écoulement de cisaillement peut induire des contraintes normales qui apparaissent lorsque le fluide a un comportement élastique [200]. Les mesures de viscosité dynamique au rhéomètre cône-plan permettent d’accéder aux valeurs de la première différence de contraintes normales $N1$. Celle-ci s’exprime en fonction du tenseur des contraintes σ et est égale à $N1 = \sigma_{xx} - \sigma_{yy}$ où x est la direction de la vitesse et y la direction du gradient de vitesse au sein de l’écoulement.

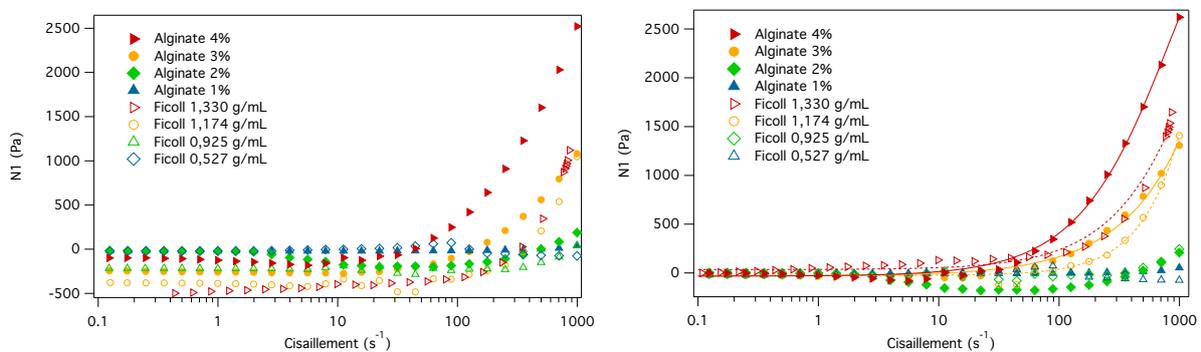


Figure 4-6 : Première différence de contraintes normales $N1$ en fonction du cisaillement pour les différentes solutions d’alginate et de Ficoll : (gauche) données brutes, (droite) ajout d’un offset pour ajuster toutes les lignes de base à 0. Les marqueurs correspondent aux points expérimentaux et les lignes à l’ajustement des données par une fonction exponentielle.

La Figure 4-6 montre que la première différence de contraintes normales N_1 devient non négligeable à partir d'un cisaillement critique de l'ordre de 10 s^{-1} . Au delà de ce cisaillement, elle augmente lorsque le cisaillement augmente en suivant une loi de puissance. Cela met ainsi en évidence le caractère viscoélastique des solutions utilisées.

Les données brutes (Figure 4-6, gauche) montrent que les lignes de base diffèrent pour chaque solution. Afin de comparer le comportement élastique de chaque solution, les valeurs brutes ont été modifiées de façon arbitraire en ajoutant à toutes les valeurs d'une solution la valeur de N_1 à 0.1 s^{-1} de la solution en question. De cette manière, toutes les lignes de base ont été mise à 0.

Dans le régime élastique, les valeurs de N_1 , et donc le caractère élastique, augmentent lorsque la concentration du polymère augmente. Il est très peu marqué pour les solutions d'alginate 1% et de Ficoll 0,527 g/mL. D'autre part, l'alginate et le Ficoll semblent avoir des élasticités comparables à viscosités équivalentes. Toutefois, au vu de la variabilité de la ligne de base, ces données sont à prendre avec précaution. Elles permettent davantage de mettre en évidence l'élasticité plutôt que de la quantifier. La caractérisation de la viscoélasticité a alors ensuite été réalisée par un autre type de mesure rhéologique présenté dans le paragraphe suivant.

4.1.2.2 Viscoélasticité et module élastique

La viscoélasticité d'une solution de polymère se caractérise par le module viscoélastique complexe $G^* = G' + iG''$ où G' est le module élastique et G'' est le module visqueux. Les valeurs de ces modules peuvent être obtenues au rhéomètre cône-plan en mode oscillation. Ces mesures ont été réalisées sur les solutions d'alginate 4% et de Ficoll 1,33 g/mL.

Tout d'abord, des mesures en oscillation avec balayage en déformation de 0,1% à 100% à fréquence imposée (0,1 Hz, 1 Hz et 10 Hz) ont été effectuées. Ces mesures ont permis de déterminer le taux de déformation pour lequel la solution de polymère répond correctement à la sollicitation et la viscoélasticité est linéaire (G' et G'' ne dépendent pas de la déformation). Ensuite, des mesures en oscillation avec balayage en fréquence à la déformation choisie ont alors été réalisées.

Dans le cas de l'alginate, les balayages en déformation montrent que la viscoélasticité reste linéaire dans une large gamme de déformation (Figure 4-7, gauche). Le module élastique G' ne commence à décroître qu'au-delà d'une déformation de l'ordre de 30% à $f=1 \text{ Hz}$ et de 20% à $f=10 \text{ Hz}$. Le balayage en fréquence a donc été réalisé à 10% de déformation (Figure 4-7, droite). Aux basses fréquences, le module visqueux G'' est supérieur au module élastique G' : la solution a un comportement de liquide visqueux. Dans ce domaine de fréquence, la fréquence de sollicitation est telle que les chaînes de polymère ont suffisamment le temps de relaxer. Lorsque la fréquence augmente, G' et G'' augmentent puis au delà d'une certaine fréquence, G' devient supérieur à G'' : la solution se comporte alors plutôt comme un solide élastique. A ces fréquences, les enchevêtrements n'ont alors plus le temps de se défaire. Le croisement des courbes G' et G'' correspond au temps de relaxation τ du polymère. Le croisement ayant lieu pour une fréquence $f=35 \text{ Hz}$, **le temps de relaxation de l'alginate est donc $\tau \approx 28 \text{ ms}$.**

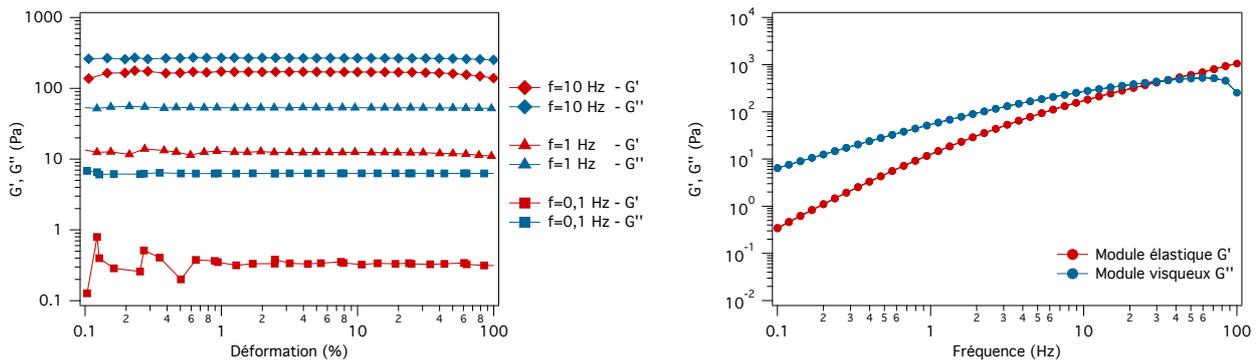


Figure 4-7 : Viscoélasticité de la solution d'alginate à 4% : (gauche) Evolution des modules élastique et visqueux en fonction de la déformation, à différentes fréquences imposées : 0,1 Hz, 1 Hz et 10 Hz. (droite) Evolution des modules élastique et visqueux en fonction de la fréquence, à 10% de déformation. Mesures réalisées à T=21°C.

Dans le cas du Ficoll 1,33 g/mL, la gamme de viscoélasticité linéaire est plus restreinte. En effet, les modules G' et G'' ne sont pas stables à $f=0,1$ Hz sur toute la gamme de déformation et à $f=1$ Hz jusqu'à 2% de déformation : la solution répond mal aux faibles sollicitations. Ensuite, à $f=10$ Hz, G' commence à décroître à partir d'environ 20% de déformation. Il a donc été choisi une déformation de 10% pour le balayage en fréquence. Les résultats montrent que le module visqueux G'' est toujours supérieur au module élastique G' sur toute la gamme de fréquence testée (Figure 4-8, droite) : la solution a donc un caractère essentiellement visqueux. Les courbes de G' et G'' ne se croisant pas, il n'est alors pas possible de déterminer un temps de relaxation pour ce polymère.

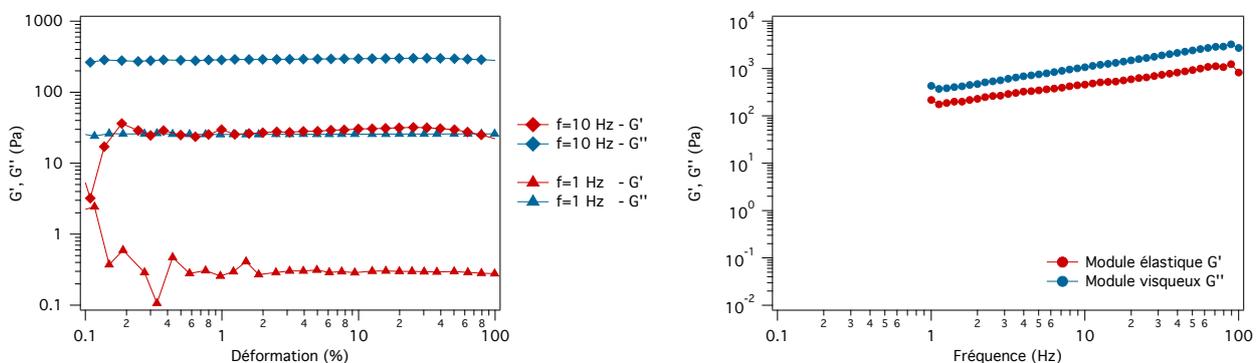


Figure 4-8 : Viscoélasticité de la solution de Ficoll à 1,33 g/mL : (gauche) Evolution des modules élastique et visqueux en fonction de la déformation, à différentes fréquences imposées : 0,1 Hz, 1 Hz et 10 Hz. (droite) Evolution des modules élastique et visqueux en fonction de la fréquence, à 10% de déformation. Mesures réalisées à T=21°C.

Ces courbes ressemblent à celles obtenues dans le cas de suspensions de particules en solution. Il semblerait donc que les chaînes de Ficoll ne soient pas déployées et forment des agrégats dispersés en solution. Le Ficoll ne serait donc pas soluble à cette concentration. Ceci est cohérent avec les données du fournisseur qui donne une limite de solubilité à 50% (soit 0,5 g/mL). Il n'est donc en théorie pas exact de parler de « solutions » de Ficoll dans ces conditions. Toutefois, ce terme sera tout de même utilisé pour décrire ce matériau, par mesure de simplification. La plus faible concentration en Ficoll utilisée dans cette thèse étant 0,527 g/mL (soit 52,7%), il en est a priori de même pour les 4 concentrations de Ficoll étudiées.

Néanmoins, ces « solutions » ont permis d'obtenir des fluides de hautes viscosités (comparables à celle des solutions d'alginate) ayant un comportement proche de celui des fluides Newtoniens, ce qui était le but recherché dans le cadre de cette étude.

Les solutions d'alginate et de Ficoll étudiées ont donc non seulement des caractères rhéofluidifiants différents mais également des comportements élastiques différents. Ceci sera à prendre en compte dans l'interprétation des résultats concernant l'influence de la rhéofluidification de la phase dispersée sur la formation de gouttes, qui est étudié en comparant l'alginate et le Ficoll.

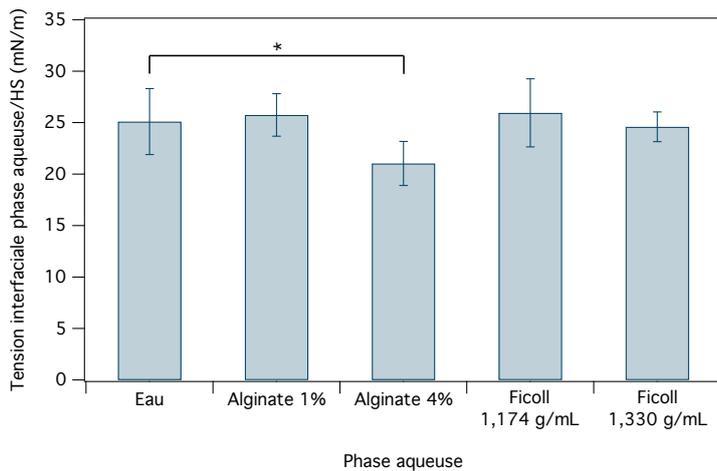
BILAN SUR LES CARACTERISTIQUES DES PHASES DISPERSEES ETUDIEES

- Les solutions d'alginate et de Ficoll utilisées dans cette étude ont une **viscosité allant jusqu'à 10,4 Pa.s**, permettant ainsi **d'étudier la formation des gouttes dans le cas de phase dispersée extrêmement visqueuse**.
- Les différentes concentrations de solution permettent **d'étudier l'influence de la viscosité de la phase dispersée sur la formation des gouttes**.
- L'alginate et le Ficoll présentent un **comportement non-Newtonien de type rhéofluidifiant**. Le caractère rhéofluidifiant est significativement plus prononcé pour l'alginate que pour le Ficoll. Le Ficoll est donc un bon candidat, par comparaison à l'alginate, pour **étudier l'influence de la rhéofluidification de la phase dispersée sur la formation des gouttes**.
- Les mesures de contraintes normales et de module élastique ont permis de mettre en évidence et caractériser le **comportement élastique** de ces solutions. Les solutions d'alginate et de Ficoll étudiées ont des comportements élastiques différents. Le temps caractéristique de relaxation de l'alginate est de $\tau \approx 28$ ms. Les solutions de Ficoll ont un caractère essentiellement visqueux.

4.2 Viscosité de la phase continue et tension interfaciale

Afin d'étudier l'influence de la viscosité de la phase continue η_c sur la formation de gouttes, plusieurs phases continues ont été utilisées : de l'huile de soja (HS), de l'acide oléique (AO) et de l'huile de paraffine (HP). L'influence de la tension interfaciale γ entre les phases dispersée et continue a été étudiée en faisant varier la tension interfaciale de l'huile de soja par l'ajout de différentes quantités de tensioactifs Span80 (0 à 0,5% wt/wt). Les mesures de tension interfaciale γ et de viscosité η_c des phases continues ont été effectuées selon les protocoles décrits dans la section 2.3.3 du Chapitre 2.

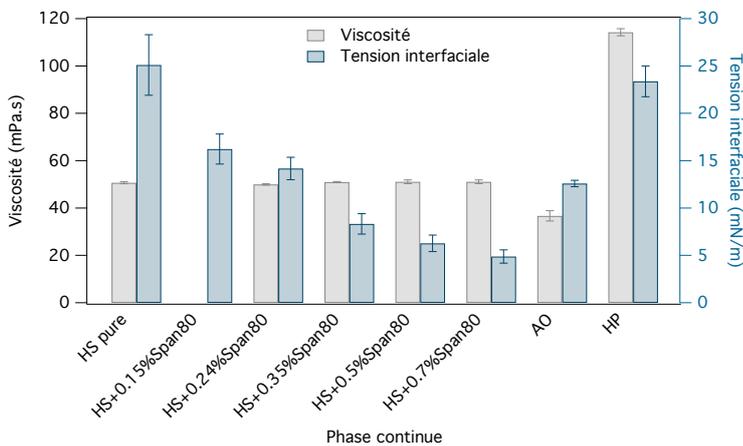
Au préalable, l'influence de la nature de la phase aqueuse sur la tension interfaciale phase aqueuse/phase continue a été étudiée. Pour cela, les tensions interfaciales alginate/HS et Ficoll/HS ont été mesurées avec de l'alginate 1% et 4% et du Ficoll 1,174 g/mL et 1,330 g/mL et comparées à la tension interfaciale eau/HS.



Phase aqueuse	$\gamma_{\text{phase aqueuse/HS}}$ (mN/m)
Eau distillée	25,1 ± 3,2
Alginate 1%	25,8 ± 2,1
Alginate 4%	21,1 ± 2,1
Ficoll 1,174 g/mL	26,0 ± 3,3
Ficoll 1,330 g/mL	24,6 ± 1,5

Figure 4-9 : Influence de la phase aqueuse sur la tension interfaciale phase aqueuse/HS. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type sur les mesures ($n \geq 3$). * signifie une différence significative avec $p < 0,01$.

Les valeurs ont été comparées à l'aide d'un test de Student. Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative de tension interfaciale entre l'eau et l'alginate 1% et entre l'eau et chacune des deux solutions de Ficoll. Une différence significative apparaît entre l'eau et l'alginate 4% ($p < 0,01$). Toutefois, les valeurs obtenues avec l'alginate 1% et l'alginate 4% ne sont pas significativement différentes. La concentration en alginate ou Ficoll n'influence donc pas de façon significative la tension interfaciale alginate/HS ou Ficoll/HS, dans la gamme de concentration testée. Par la suite, la tension interfaciale phase dispersée/phase continue a été considérée comme égale à la tension interfaciale eau/phase continue, quelles que soient les concentrations en alginate et Ficoll utilisées.



Phase continue	Viscosité (mPa.s)	$\gamma_{\text{eau/phase continue}}$ (mN/m)
HS	50,7 ± 0,4	25,1 ± 3,2
HS+0,15%Span80	--	16,2 ± 1,6
HS+0,24%Span80	50,0 ± 0,3	14,2 ± 1,2
HS+0,35%Span80	51,0 ± 0,2	8,3 ± 1,1
HS+0,50%Span80	51,1 ± 0,8	6,3 ± 0,1
AO	36,7 ± 2,2	12,6 ± 0,3
HP	114,3 ± 1,5	23,4 ± 1,6

Figure 4-10: Viscosités de la phase continue et tension interfaciale eau/phase continue pour les différentes phases continues utilisées (HS=huile de soja ; AO=acide oléique ; HP=huile de paraffine). Les quantités de Span80 sont données en %v/v. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type sur les mesures ($n \geq 3$).

La Figure 4-10 présente les valeurs de γ et η_c obtenues pour les différentes phases continues. Lorsque la concentration en Span80 augmente, la tension interfaciale diminue. Toutefois, dans la gamme de concentration en Span80 testée, la présence de ce dernier ne modifie pas significativement la viscosité de l'huile de soja.

L'huile de soja (HS), l'acide oléique (AO) et l'huile de paraffine (HP) ont des viscosités η_c significativement différentes ($p < 0,01$). Les tensions interfaciales eau/HS et eau/HP sont quasi-égales (non significativement différentes). L'ajout de 0,24% v/v de Span80 dans HS permet d'obtenir une tension interfaciale comparable à celle de l'acide oléique.

BILAN SUR LES CARACTERISTIQUES DES PHASES CONTINUES ETUDIEES

- Les huiles de soja contenant différentes concentrations de Span80 permettent d'**étudier l'influence de la tension interfaciale, à viscosité constante**, sur la formation de gouttes.
- La comparaison des expériences utilisant HS et HP ainsi que la comparaison des expériences utilisant HS+0,24%Span80 et AO permettent donc d'**étudier l'influence de la viscosité de la phase continue, à tension interfaciale quasi-constante**, sur la formation de gouttes.

4.3 Viscosité de la phase pré-gélifiante

La phase pré-gélifiante est de l'huile de soja (HS) contenant des cristaux d'acétate de calcium (AC) à 3% wt/wt. La viscosité de cette solution a été mesurée au viscosimètre. Elle est de $57,3 \pm 0,3$ mPa.s.

4.4 Bilan

Le Tableau 4-2 suivant résume les différentes propriétés physico-chimiques des fluides étudiées, la gamme de valeurs dans laquelle elles ont été étudiées et le nombre de valeurs au sein de cette gamme.

PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DES FLUIDES		GAMME DE VALEURS	NOMBRE DE VALEURS
η_d	Viscosité dynamique de la phase dispersée	0,08 à 10,4 Pa.s	4
n, τ	Caractère rhéofluidifiant de la phase dispersée	Alginate/Ficoll	2
η_c	Viscosité dynamique de la phase continue	36,7 à 114,3 mPa.s	3
γ	Tension interfaciale entre les deux phases	6,3 à 25,1 mN/m	5

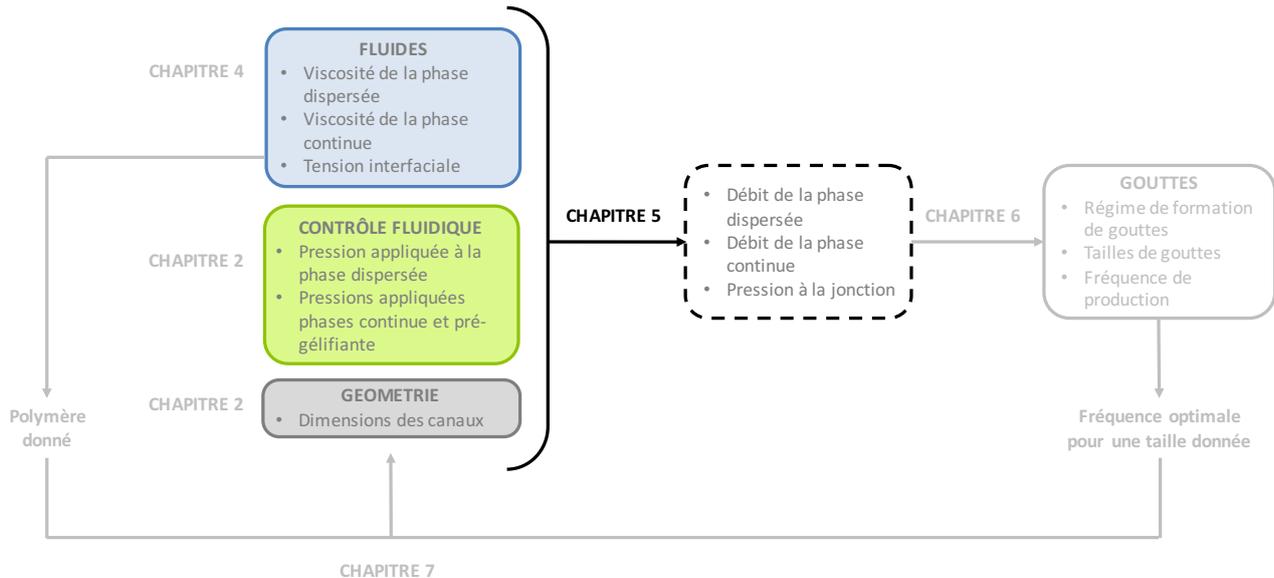
Tableau 4-2 : Bilan sur la variation des propriétés physico-chimiques des phases dispersées et continues

Chapitre 5

CARACTERISATION ET MODELISATION DES ECOULEMENTS

5.1	Caractérisation et modélisation du débit de la phase continue	122
5.1.1	Description du modèle analytique	122
5.1.2	Description des modèles numériques	123
5.1.2.1	Modèle 2D d'écoulement laminaire.....	123
5.1.2.2	Modèle 2D d'écoulement laminaire diphasique « level set »	124
5.1.2.3	Modèle 3D d'écoulement laminaire.....	125
5.1.3	Validité des modèles analytiques et numériques.....	125
5.1.3.1	Validité du modèle analytique.....	127
5.1.3.2	Validité des modèles numériques	127
5.1.4	Influence de la présence de gouttes sur le débit de la phase continue et ajustement du modèle analytique.....	128
5.1.5	Formation d'une goutte et variation périodique des débits et pressions.....	129
5.2	Caractérisation et modélisation du débit de la phase dispersée	131
5.3	Conclusions et discussion.....	132

Ce chapitre se focalise sur la caractérisation des écoulements et en particulier la détermination des débits de chaque phase dans le système en fonction des propriétés des fluides utilisés, des pressions appliquées à chaque phase et de la géométrie du système.



En effet, dans notre système les écoulements sont contrôlés en pression. Toutefois, la connaissance des débits et la détermination des relations entre les variables d’entrées du système et les débits sont nécessaires pour les raisons suivantes :

- Pour l’établissement des lois sur la taille des gouttes et la fréquence de production (Chapitre 6)

En effet, les caractéristiques des gouttes (taille, fréquence) sont déterminées par les écoulements dans le système et dépendent donc *a priori* du débit des fluides. Or, les débits dépendent des résistances hydrauliques des canaux dans lesquels ils s’écoulent, qui sont, elles, déterminées par la viscosité des fluides ainsi que par les dimensions des canaux et des tubes utilisés pour la connectique (Chapitre 5). La mise en place de lois en termes de débits permet alors d’obtenir des lois plus « universelles » que celles exprimées en termes de pressions, puisqu’elles sont alors valables quel que soit le montage expérimental utilisé (connectique, longueur des canaux en amont et aval de la jonction MFFD).

D’autre part, la plupart des systèmes étudiés dans la littérature sont contrôlés en débit à l’aide de pousse-seringues. La définition de lois en fonction des débits permet donc également de comparer les résultats obtenus dans la littérature.

- Pour la compréhension des mécanismes de formation de gouttes (Chapitre 6)

La formation de gouttes est contrôlée par la compétition entre différentes contraintes dont les contraintes visqueuses (Chapitre 3). Or, ces dernières dépendent entre autres des débits des fluides. La connaissance

des débits permet alors d'évaluer ces contraintes et ainsi de comprendre les mécanismes mis en jeu lors de la formation et de la rupture des gouttes.

- Pour la prédiction des pressions à appliquer pour obtenir une fréquence et une taille de gouttes données, à partir d'un polymère donné (Chapitre 7)

Comme énoncé plus haut, la taille et la fréquence de génération de gouttes sont déterminées par les débits des fluides. La combinaison des lois sur la taille et la fréquence de production en fonction des débits (Chapitre 6) et des relations entre les débits et les variables d'entrée du système (Chapitre 5) permet alors de calculer les pressions à appliquer en entrée du système pour obtenir la taille et la fréquence de production souhaitées, connaissant la géométrie du système et les propriétés des fluides.

Pour cela, des modèles analytiques et numériques ont été mis en place et comparés à des mesures expérimentales de débits, sur les deux géométries de puces A et B décrites au paragraphe 2.1.1 du Chapitre 2.

La première partie de ce chapitre présente la caractérisation et la modélisation de la phase continue. Tout d'abord, la modélisation est réalisée en absence de génération de gouttes. Ensuite, l'influence de la présence de gouttes est étudiée et le modèle est alors ajusté. La caractérisation et la modélisation de la phase dispersée sont ensuite présentées dans une deuxième partie.

5.1 Caractérisation et modélisation du débit de la phase continue

5.1.1 Description du modèle analytique

CONFIDENTIEL

5.1.2 Description des modèles numériques

Le système MFFD a également été modélisé numériquement avec le logiciel COMSOL pour les géométries A et B. Plusieurs modèles ont été développés (2D ou 3D, monophasique ou diphasique) et sont décrits ici.

La géométrie a été importée à partir du fichier ayant servi à faire le masque des puces. Dans le cas des modèles 2D, un canal de largeur égale au diamètre interne des tubes Tygon et de longueur 1 mm a été ajouté à chaque entrées/sorties des canaux. Dans le cas du modèle 3D, la géométrie 2D a été extrudée sur une profondeur de 200 μm et un cylindre de diamètre égal au diamètre interne des tubes Tygon et de longueur 1 mm a été ajouté à chaque entrées/sorties des canaux.

En ce qui concerne les matériaux, dans le cas des modèles monophasiques, le seul matériau utilisé est un fluide ayant les caractéristiques de l'huile de soja ($\rho=0,9 \text{ kg/m}^3$ et $\eta_c=50,7 \text{ mPa.s}$). Dans le cas du modèle diphasique, un fluide ayant les caractéristiques de l'huile pré-gélifiante ($\rho=0,9 \text{ kg/m}^3$ et $\eta_c=57,3 \text{ mPa.s}$) a également été utilisé.

Il a été choisi un écoulement entrant laminaire contrôlé en pression avec des pressions d'entrée P_c et P_{hAC} correspondantes aux pressions appliquées en entrée du système lors des expériences (calculées à partir de la relation **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**) et une longueur d'entrée de 45 cm. Il a été choisi un écoulement sortant laminaire avec une pression de sortie nulle et une longueur de sortie de 20 cm pour la géométrie A et de 40 cm pour la géométrie B. Les longueurs d'entrée/sortie correspondent aux longueurs de tubes Tygon utilisées lors des expériences. Le logiciel COMSOL considère alors en entrée/sortie, des canaux de longueur égale à la longueur définie et de largeur/section égale à celle de l'entrée/sortie de la géométrie. Cela justifie donc l'ajout de rectangle ou cylindre en entrée/sortie des canaux pour modéliser les tubes Tygon. Dans ces trois modèles, les tubes Tygon sont considérés comme connectés de façon linéaire avec les canaux dans la puce. En réalité, ces tubes sont connectés perpendiculairement aux canaux.

Le maillage choisi dépend du modèle utilisé et est précisé par la suite.

5.1.2.1 Modèle 2D d'écoulement laminaire

Ce modèle est le modèle étudié le plus simple. Il ne tient pas compte de la profondeur du canal et les tubes Tygon de connectique sont modélisés par des canaux rectangulaires. En effet, il n'est pas possible en géométrie 2D de préciser que les canaux ajoutés aux entrées/sorties sont cylindriques. Ce modèle considère également une seule et même huile injectée par les entrées de phase continue et phase pré-gélifiante, de propriétés égales à celle de l'huile de soja pure.

Le maillage aux frontières est choisi « extra fin » et le maillage dans le domaine est personnalisé comme suit :

- taille d'élément maximale : 80 μm
- taille d'élément minimale : 1 μm
- taux de croissance maximum des éléments : 1,1
- facteur de courbure : 0,5
- résolution des régimes minces : 1

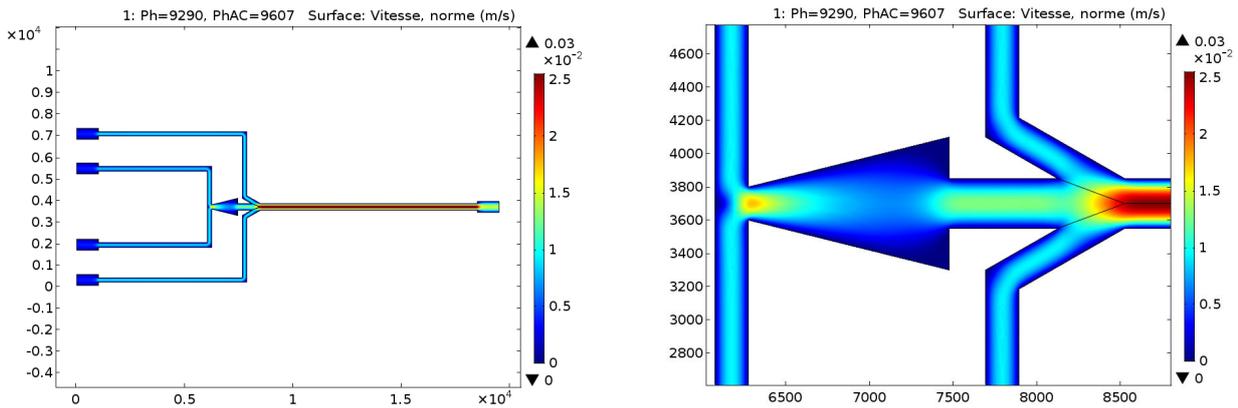


Figure 5-1 : Modélisation 2D du système en considérant un écoulement laminaire monophasique. Champ de vitesse obtenu pour $P_c=92,90$ mbar et $P_{hAC}=96,07$ mbar sur la géométrie A. (gauche) Vue d'ensemble ; (droite) Zoom sur les jonctions 1 et 2.

Le temps de calcul pour une condition de pression est de l'ordre de 1 minute.

5.1.2.2 Modèle 2D d'écoulement laminaire diphasique « level set »

Ce modèle prend en compte le fait que les deux huiles de phase continue et de phase pré-gélifiante ont des viscosités dynamiques différentes. Le fluide 1 correspond à l'huile de soja et est défini comme initialement présent dans le domaine constitué des canaux d'entrée de phase continue et la chambre triangulaire. Le fluide 2 correspond à l'huile pré-gélifiante et est défini comme initialement présent dans le domaine constitué des canaux d'entrée de phase pré-gélifiante et du canal en aval de la jonction où est introduite l'huile pré-gélifiante. Ces deux phases étant toutes deux de même nature (huile de soja), la tension de surface est négligée. Les paramètres définis pour la « level set » sont :

- paramètre de réinitialisation : $\gamma=0,1$ m/s
- paramètre de contrôle de l'épaisseur de l'interface : $\epsilon_s=5$ μm

Le maillage est défini comme « normal » dans les deux domaines et « extra fin » aux frontières.

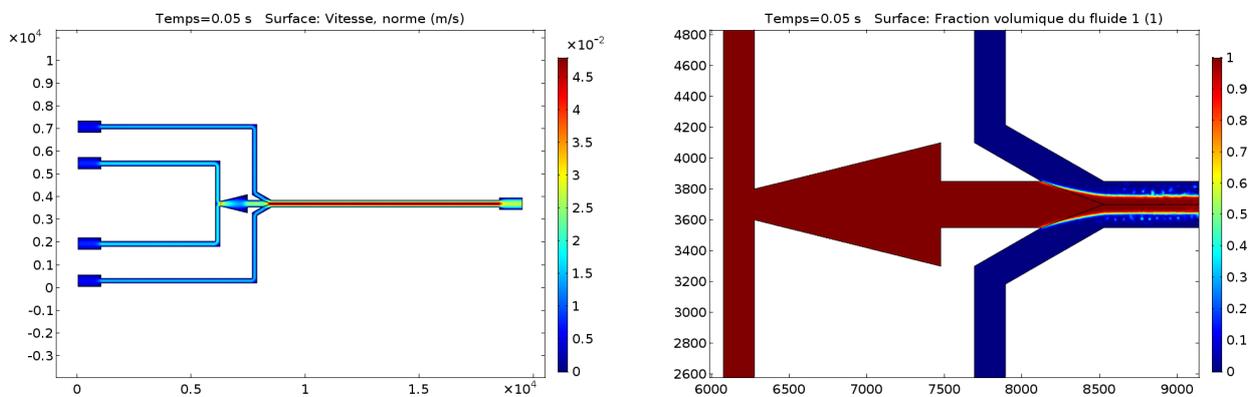


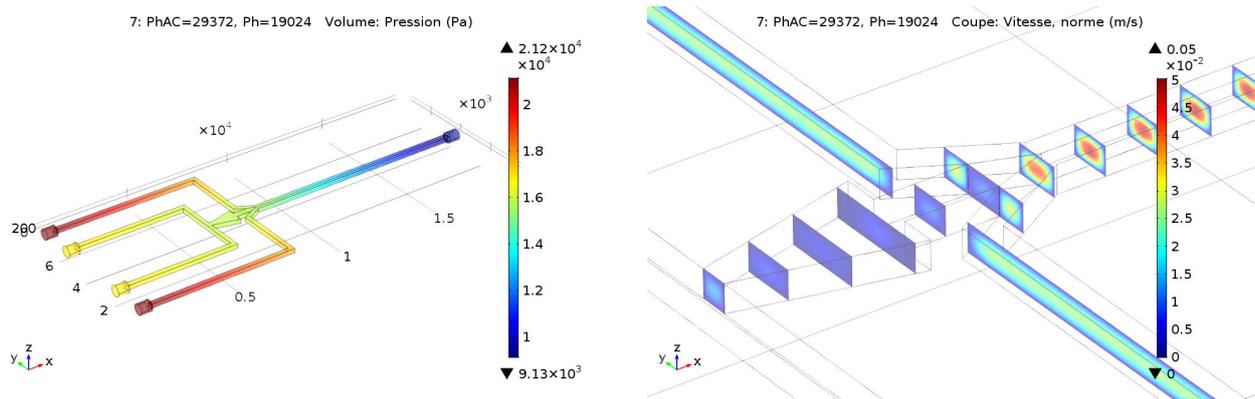
Figure 5-2 : Modélisation 2D du système en considérant un écoulement laminaire diphasique. Résultats obtenus pour $P_c=P_{hAC}=200$ mbar sur la géométrie A. (gauche) Vue d'ensemble du champ de vitesse ; (droite) Fraction volumique du fluide 1 (huile de soja pure), zoom sur les jonctions 1 et 2.

Le temps de calcul pour une condition de pression et un temps d'établissement de 0,05 s est de l'ordre de 1 heure.

5.1.2.3 Modèle 3D d'écoulement laminaire

Ce modèle permet de prendre en compte la profondeur des canaux de la puce ainsi que la géométrie cylindrique des tubes Tygon de connectique. Le maillage est défini comme « normal » dans le domaine et « plus fin » aux frontières.

Le temps de calcul pour une condition de pression est de l'ordre de 45 minutes.



Dans les modèles 2D, les débits ont été calculés en intégrant la vitesse du fluide sur la ligne d'entrée du canal et en multipliant la valeur par la profondeur du canal $h = 200 \mu\text{m}$. Dans le modèle 3D, les débits ont été calculés en intégrant la vitesse du fluide sur la section d'entrée du canal. La comparaison des modèles avec les mesures expérimentales sera présentée au paragraphe suivant.

5.1.3 Validité des modèles analytiques et numériques

Des expériences de mesures expérimentales de débits ont été réalisées dans le but d'étudier la validité des différents modèles analytique et numériques mis en place. Le protocole est décrit au paragraphe 2.4.1 du Chapitre 2.

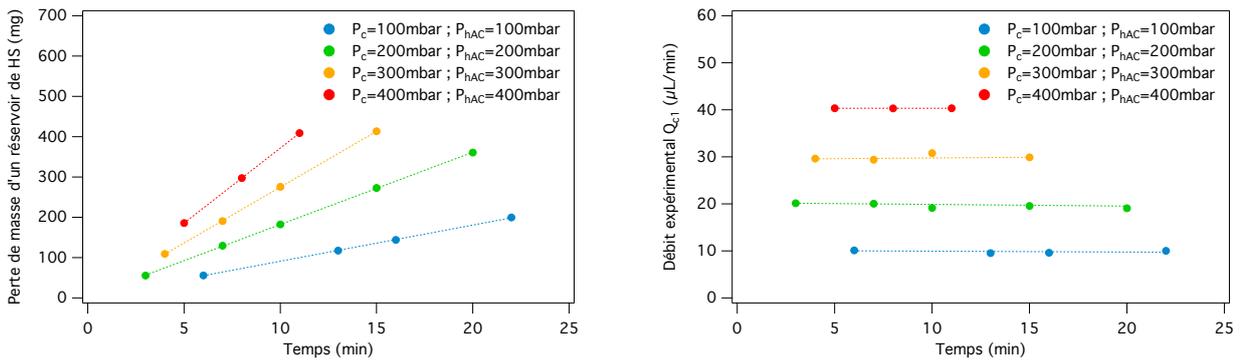


Figure 5-4 : Détermination expérimentale du débit de phase continue avec la géométrie A. Masse d'huile de soja (HS) perdue dans un réservoir (gauche) et débits calculés correspondants (droite) en fonction du temps pour différents couples de pressions

La Figure 5-4 montre que la perte de masse est linéaire en fonction du temps et donc que le débit mesuré est constant au cours du temps. **La méthode de mesure semble donc valable.** Par la suite, le débit Q_{c1} sera considéré comme égal au débit moyen calculé sur le temps de la mesure. L'incertitude sur le débit mesuré par cette méthode provient d'une incertitude sur la masse volumique de l'huile et sur la masse mesurée par la balance. Cette dernière étant difficile à quantifier, l'incertitude sur le débit Q_{c1} sera considérée comme égale à l'écart-type des débits évalués sur le temps de la mesure, pour une condition de pressions.

Ces expériences ont été effectuées pour plusieurs couples de pressions (P_c , P_{hAC}) sur les géométries A et B. La Figure 5-5 présente la comparaison entre les valeurs de débits obtenues expérimentalement et celles obtenues par les différents modèles analytique et numériques.

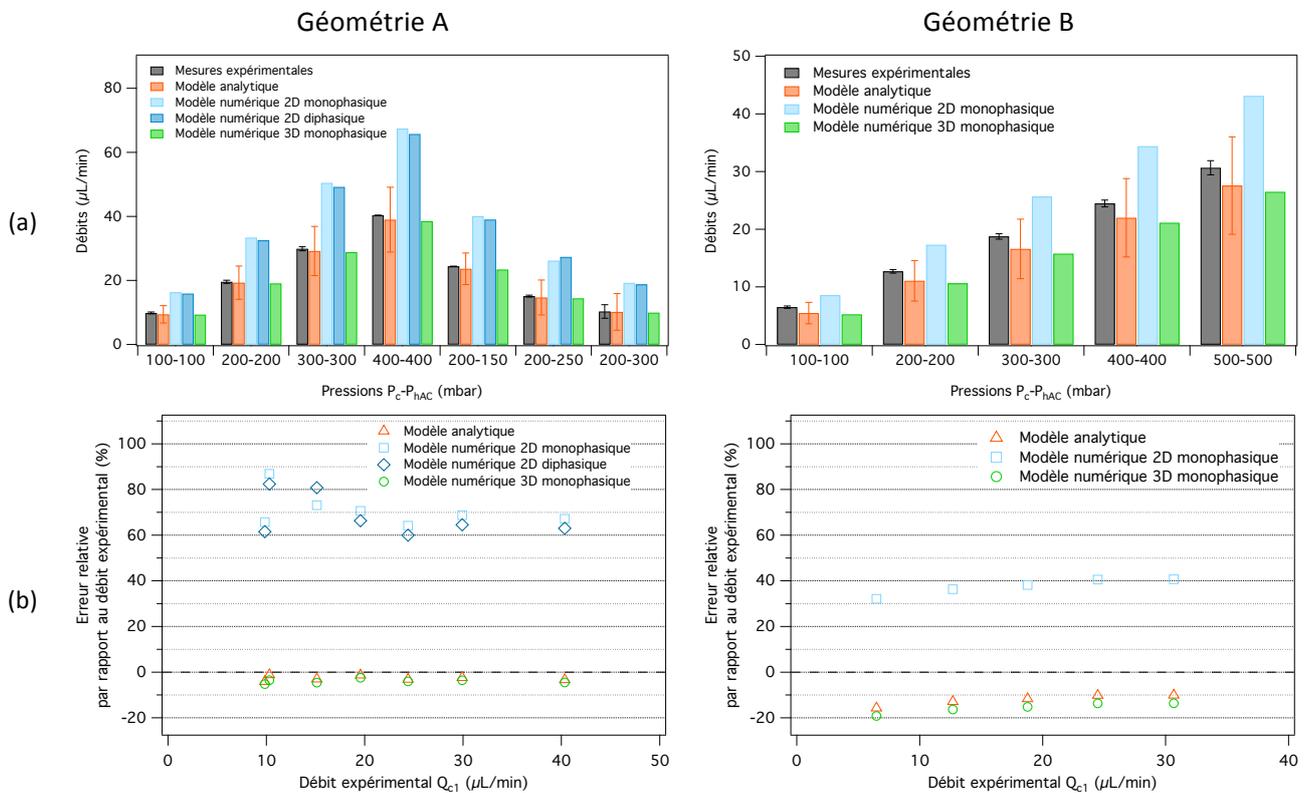


Figure 5-5 : Comparaison des débits mesurés expérimentalement et calculés par les différents modèles. (a) Valeurs des débits en fonction des pressions appliquées. Les barres d'erreur correspondent aux incertitudes sur la mesure ou le calcul des débits ; (b) erreur relative par rapport au débit expérimental

5.1.3.1 Validité du modèle analytique

Les valeurs de débits calculées par le modèle analytique sont égales aux valeurs expérimentales à <4% près dans le cas de la géométrie A et <16% dans le cas de la géométrie B. Or, l'incertitude relative sur les valeurs de débits calculées par le modèle est de l'ordre de 30% pour les deux géométries. Cette incertitude étant plus élevée que l'erreur entre le modèle et les expériences, les valeurs calculées par le modèle ne sont donc pas significativement différentes des valeurs expérimentales : **ce modèle est donc considéré comme fiable.**

Toutefois, il est important d'identifier les sources d'erreur du modèle et de distinguer les sources de variabilité importantes de celles qui sont négligeables. Cela permet alors de savoir quand est-ce que le modèle est plus ou moins fiable, selon la géométrie, les pressions appliquées ou les fluides utilisés.

CONFIDENTIEL

5.1.3.2 Validité des modèles numériques

Les débits calculés par le modèle 2D monophasique sont très supérieurs aux débits expérimentaux (erreur relative de 60-90% pour la géométrie A et de 30-50% pour la géométrie B), ce modèle n'est donc pas considéré comme fiable. Les débits étant trop élevés, cela signifie que les pertes de charge modélisées sont trop faibles par rapport aux pertes de charges réelles. Cela peut s'expliquer par le fait que :

- la viscosité de l'huile pré-gélifiante soit ici considérée comme égale à la viscosité de l'huile pure, alors qu'elle est en réalité plus élevée : les frottements visqueux aux parois sont donc plus faibles dans le modèle qu'en réalité.
- les deux huiles soient considérées comme de viscosités égales : les frottements à l'interface entre les deux huiles dus à leur différence de viscosité sont négligés
- les frottements aux parois, notamment aux parois supérieures et inférieures des canaux, soient trop faibles car la profondeur des canaux n'est pas prise en compte alors qu'elle est du même ordre de grandeur que la largeur des canaux

Les deux autres modèles mis en place permettent d'identifier la ou les source(s) principale(s) d'erreur de ce modèle.

Les valeurs obtenues par le modèle 2D diphasique sont légèrement plus proches des valeurs expérimentales mais restent comparables à celles obtenues par le modèle 2D monophasique (erreur relative de 60-80% pour la géométrie A). La différence de viscosité entre les deux huiles influence donc peu les débits dans le système, dans la gamme de débits utilisés.

Les débits obtenus par le modèle 3D monophasique sont quant à eux égaux aux débits expérimentaux à <6% près dans le cas de la géométrie A et <20% près dans le cas de la géométrie B. L'erreur diminue donc significativement lors du passage d'une modélisation 2D à une modélisation 3D, mettant ainsi en évidence l'importance de prendre en compte la profondeur des canaux et de modéliser correctement les tubes de connectique.

Un modèle 3D diphasique pourrait davantage permettre de se rapprocher des conditions réelles. Toutefois, les résultats montrent que l'influence de l'écart de viscosité entre les deux huiles sur les valeurs de débits est faible. D'autre part, le passage d'une modélisation 2D à 3D ou d'une modélisation monophasique à diphasique augmente de façon très importante le temps de calcul. Il n'est donc pas judicieux en termes de compromis entre le gain de précision et le temps de calcul d'utiliser un tel modèle. **Le modèle 3D monophasique est donc considéré comme étant le modèle numérique étudié le plus pertinent.**

Ces résultats montrent donc la validité des modèles analytique et numérique 3D monophasique développés, en absence de génération de gouttes.

Les modèles analytique et 3D monophasique présentent des écarts par rapport aux expériences quasiment identiques, signifiant que ces deux modèles sont tout autant fiables. Toutefois, contrairement au modèle numérique qui permet uniquement de prédire le(s) débit(s)/pression(s) dans le système pour une géométrie et des pressions d'entrée données, le modèle analytique permet lui de remonter aux paramètres d'entrées du système (géométrie et pressions) à appliquer pour obtenir des débits donnés. **Le modèle analytique a donc un fort intérêt dans le cadre de la conception et l'optimisation de système.**

BILAN SUR LA VALIDITE DES MODELES EN ABSENCE DE GOUTTES

- Le modèle analytique est valide à <4% près dans le cas de la géométrie A et <16% dans le cas de la géométrie B.
- Le modèle 3D monophasique est le modèle numérique étudié le plus pertinent.
- Contrairement au modèle numérique, le modèle analytique présente l'avantage de permettre, en inversant les équations de la solution, de remonter aux valeurs à utiliser pour les variables d'entrée du système afin d'obtenir des débits donnés.

5.1.4 Influence de la présence de gouttes sur le débit de la phase continue et ajustement du modèle analytique

CONFIDENTIEL

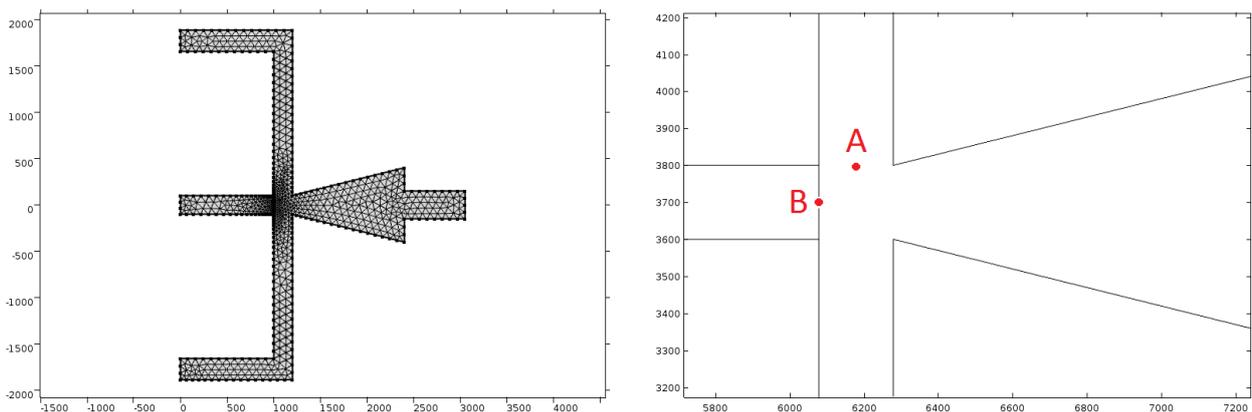
5.1.5 Formation d'une goutte et variation périodique des débits et pressions

La formation d'une goutte est un phénomène périodique. Les différentes étapes sont présentées en détails dans la section 3.1.2.1. Brièvement, lorsque la goutte se forme, la phase dispersée bloque partiellement l'orifice (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**), ce qui réduit le passage de l'huile et entraîne donc une augmentation de la pression locale dans la phase d'huile. Lorsque que la goutte se rompt, l'orifice est alors dégagé, la pression locale diminue alors. Comme notre système est contrôlé en pression, une variation périodique de pression locale dans le système entraîne donc *a priori* une variation périodique de débit.

Pour étudier ce phénomène et obtenir l'ordre de grandeur de ces variations, le système de génération de gouttes a été modélisé sur COMSOL en utilisant un modèle laminaire diphasique « level-set ». Le fluide 1 correspond à la phase dispersée et est défini comme initialement présent dans le canal central en amont de la jonction. La phase dispersée est un fluide newtonien de viscosité égale à 92 mPa.s (viscosité à cisaillement nul de l'alginate 1%). Le fluide 2 correspond à la phase continue et est défini comme initialement présent dans le domaine constitué des canaux d'entrée de phase continue et la chambre triangulaire. Ce fluide a les caractéristiques de l'huile de soja. Une tension de surface de 25 mN/m a été utilisée. Le maillage est défini comme « plus fin » dans les deux domaines et aux frontières (Figure 5-6). Il est affiné au niveau de l'interface initiale avec une taille d'élément de 25 μm . Les paramètres définis pour la « level set » sont :

- paramètre de réinitialisation : $\gamma=0,1 \text{ m/s}$
- paramètre de contrôle de l'épaisseur de l'interface : $\epsilon_{ls}=30 \mu\text{m}$

Les pressions et longueurs d'entrée ont été ajustées de façon à obtenir des débits et pressions de l'ordre de grandeur de celles observées dans notre système.



Les débits de chaque phase ont été calculés en intégrant la vitesse du fluide sur la ligne d'entrée du canal et en multipliant la valeur par la profondeur du canal $h = 200 \mu\text{m}$. Les pressions $P_{\text{mffd},c}$ et $P_{\text{mffd},d}$ ont respectivement été évaluées aux points A et B (Figure 5-6).

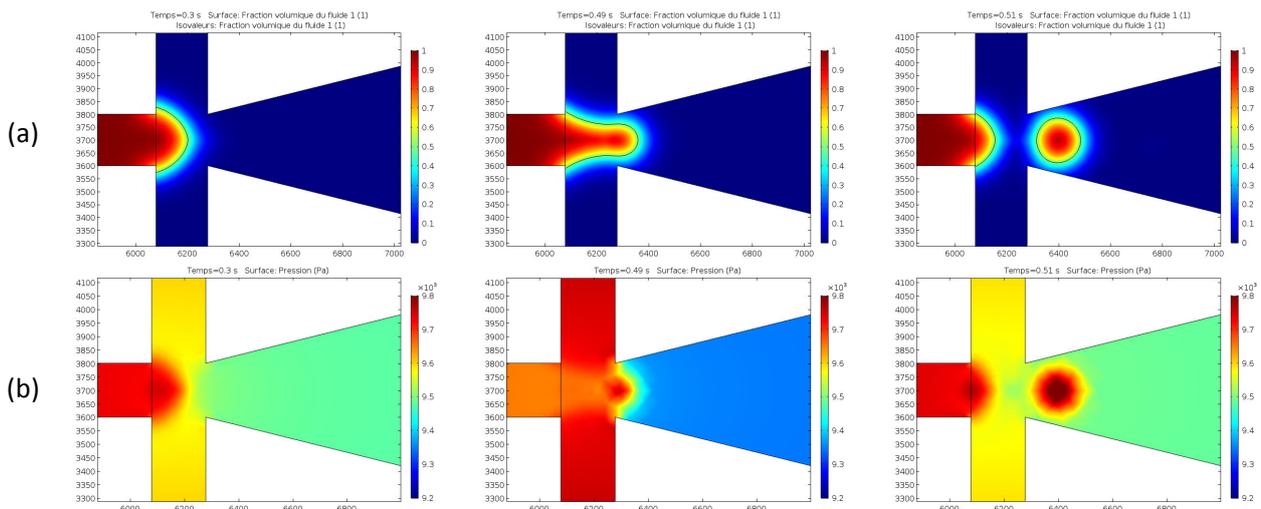


Figure 5-7 : Simulation de la formation d'une goutte en MFFD : état du système à $t=0,30$ s, $0,49$ s et $0,51$ s. (a) Fraction volumique de la phase dispersée. Le trait noir correspond à l'interface entre les deux phases (fraction volumique est égale à 0,5) ; (b) Champ de pression ; Les axes sont gradués en μm .

La simulation confirme les phénomènes attendus (Figure 5-7 et Figure 5-8) : lorsque la phase dispersée avance et obstrue l'orifice ($t=0,49$ s), la pression dans la phase d'huile au niveau de la jonction (point A) augmente puis diminue brusquement lorsque la goutte se détache ($t=0,51$ s). Lors de la génération de gouttes, la pression P_{mffd} est donc bien pulsée, ce qui entraîne une variation périodique du débit de chaque phase. La période correspond à l'inverse de la fréquence de génération de gouttes.

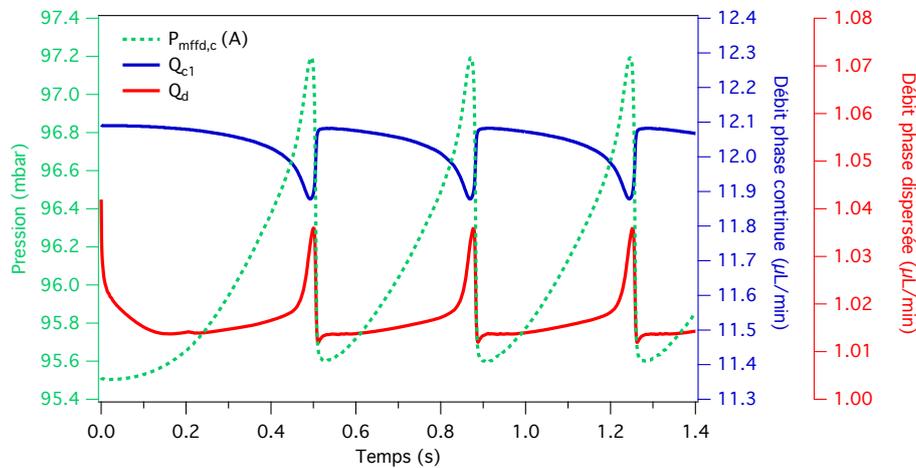


Figure 5-8 : Variation de la pression à la jonction et des débits de chaque phase au cours du temps lors de la production de gouttes au MFFD (résultats de la simulation COMSOL)

Les valeurs de débits mesurées expérimentalement et calculées analytiquement correspondent donc à des valeurs moyennes sur le temps de formation d'une goutte. Toutefois, l'écart entre les valeurs extrêmes est de l'ordre de 2 mbar (2%) pour la pression et de $2 \mu\text{L}/\text{min}$ (2%) et $0,04 \mu\text{L}/\text{min}$ (4%) pour les débits de l'huile et de la phase dispersée respectivement. La variation de pression étant de l'ordre de l'incertitude sur les pressions, **ces variations sont donc négligeables dans notre modèle.**

D'autre part, la simulation permet de mettre en évidence le fait qu'au niveau de la jonction, la pression au sein de la phase continue est différente de la pression au sein de la phase dispersée. La Figure 5-9 compare

les pressions aux points A et B, appartenant respectivement à la phase continue et à la phase dispersée tout au long de la génération de gouttes.

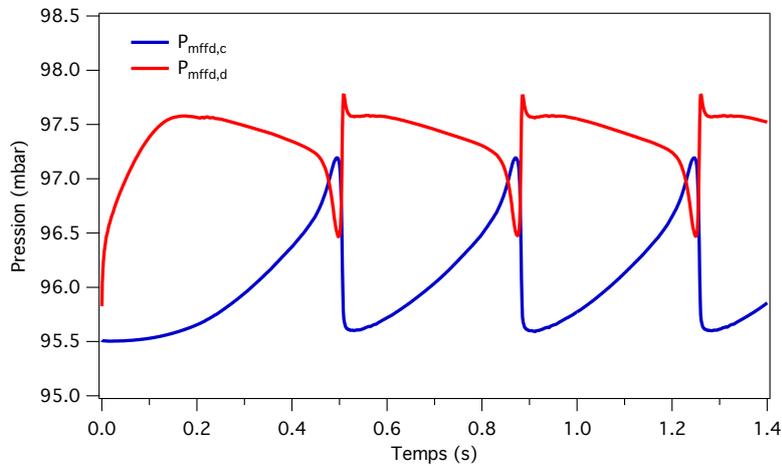


Figure 5-9 : Variation de la pression à la jonction dans la phase continue (bleu) et dans la phase dispersée (rouge)

Les résultats montrent que l'écart de pression entre la phase dispersée et la phase continue est de l'ordre de 3 mPa.s. Cette valeur étant comparable à l'incertitude sur les pressions ($\Delta P \approx 1\% \cdot P_f$), la pression de la phase dispersée au niveau de la jonction sera considérée comme égale à celle de l'huile, c'est à dire à la pression P_{mffd} calculée par le modèle, quelle que soit l'étape de la formation de la goutte. Ce résultat sera utilisé au Chapitre 6.

BILAN SUR LA MODELISATION DE LA PHASE CONTINUE

- Le modèle analytique et le modèle numérique 3D développés permettent de connaître et prédire les débits du système en absence de génération de gouttes à <4% ou <16% près selon la géométrie.
- Lors de la génération de gouttes, les débits de chaque phase sont pulsés, à la fréquence de production de gouttes. Les débits calculés correspondent donc à des valeurs moyennes sur le temps de formation d'une goutte. Toutefois, ces variations sont de l'ordre de grandeur de l'incertitude et sont donc négligeables.

5.2 Caractérisation et modélisation du débit de la phase dispersée

CONFIDENTIEL

5.3 Conclusions et discussion

CONFIDENTIEL

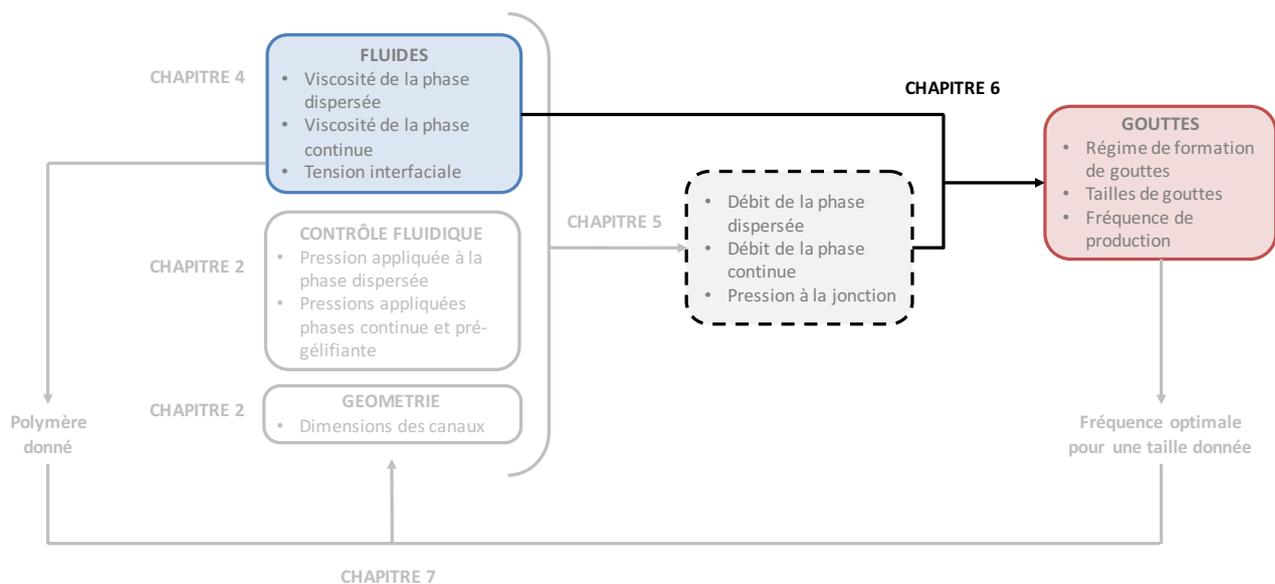
Chapitre 6

ETUDE DE LA TAILLE ET DE LA FREQUENCE DE PRODUCTION DE GOUTTES EN MFFD

6.1 Etude préliminaire : formation d'une goutte et taux de cisaillement	136
6.2 Transition reflux/<i>dripping</i>	140
6.3 Présentation des expériences de caractérisation du <i>dripping</i>	142
6.4 Caractérisation de la taille et de la fréquence de production des gouttes.....	143
6.4.1 Influence des débits de chaque phase	143
6.4.2 Influence des viscosités et du caractère rhéofluidifiant de la phase dispersée.....	146
6.4.3 Influence de la tension interfaciale.....	152
6.4.4 Vers une généralisation des lois et une prédiction de la taille et de la fréquence	155
6.5 Transition <i>dripping/jetting</i> et optimisation de la fréquence de production.....	156
6.6 Conclusions et discussion.....	158
6.6.1 Apports vis-à-vis de la littérature.....	158
6.7 Bilan sur le régime de <i>dripping</i>	159

Comme mis en évidence au paragraphe 3.2 du Chapitre 3, le régime de production de gouttes (*dripping*) a lieu pour certaines conditions de pressions appliquées à la phase dispersée et à la phase continue. Les limites de ce régime, la taille et la fréquence de production dépendent des pressions appliquées, des propriétés physico-chimiques des fluides utilisés et des dimensions du système. Le modèle établi au Chapitre 5 permet de calculer les débits à partir des pressions appliquées, des viscosités des fluides et de la géométrie du système.

L'objectif de ce chapitre est d'étudier ce régime de production de gouttes, leur taille et leur fréquence de production en fonction des débits de chaque phase, des propriétés physico-chimiques des fluides et des dimensions du système. De façon à se placer dans les conditions de l'encapsulation de cellules, l'étude est réalisée dans le cas d'une phase dispersée Newtonienne ou non-Newtonienne et dans une large gamme de viscosité à cisaillement nul (80 mPa.s à 10 Pa.s).

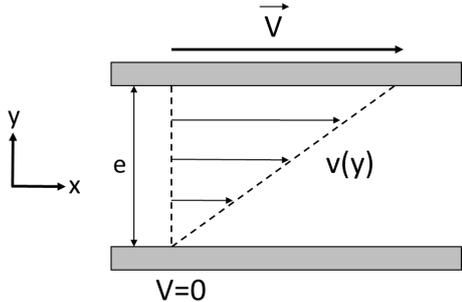


Dans un premier temps, ce chapitre présente les étapes de la formation d'une goutte ainsi que l'évaluation des forces impliquées au cours de la rupture. Il a été mis en évidence au Chapitre 3 que les conditions permettant de commencer à générer des gouttes (transition reflux/*dripping*) ne dépendaient pas de la nature de la phase dispersée. Cette transition est alors déterminée ici analytiquement grâce à la modélisation des écoulements présentée au Chapitre 5. Ensuite, ce chapitre se focalise sur la caractérisation de la taille des gouttes, la fréquence de production et la limite *dripping/jetting* en fonction des différentes variables d'entrée du système. Des lois empiriques ont été établies et sont présentées ici.

6.1 Etude préliminaire : formation d'une goutte et taux de cisaillement

Dans notre étude, la phase dispersée utilisée pour la formation de gouttes peut avoir un caractère non-Newtonien. Sa viscosité dépend alors du taux de cisaillement. Il est alors important de caractériser le taux de cisaillement exercé par la phase continue sur la phase dispersée au cours de la formation et rupture d'une goutte.

Le taux de cisaillement (gradient de vitesse) auquel est soumis un fluide est égal à :

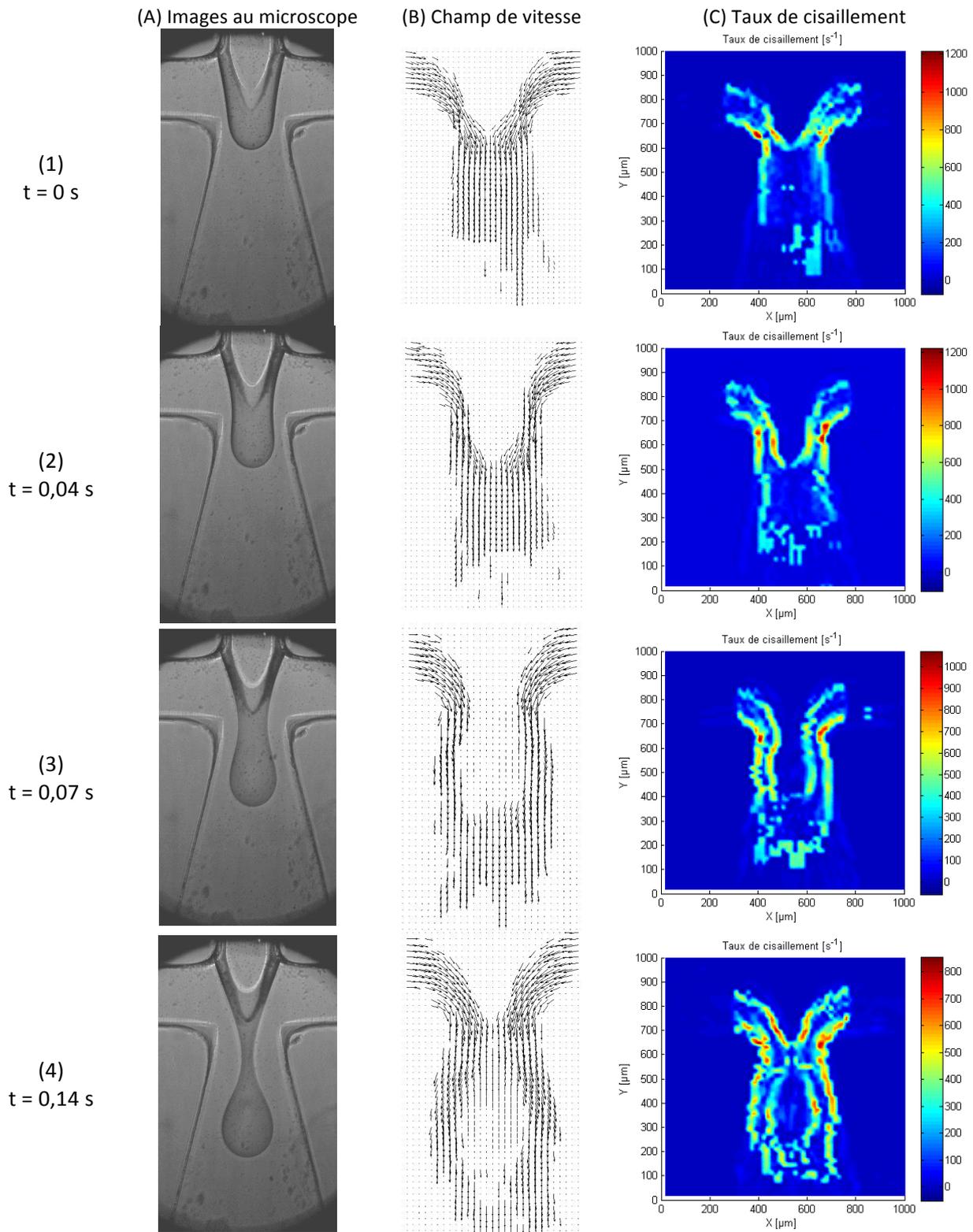
$$\dot{\gamma} = \frac{V}{e} = \frac{dv}{dy}$$


où v est la vitesse du fluide dans la direction de l'écoulement et y est la direction perpendiculaire à la direction de l'écoulement.

Dans le cas du cisaillement exercé par la phase continue sur la phase dispersée, la vitesse v correspond à la vitesse relative entre les deux phases.

Expérimentalement, ce taux de cisaillement a été évalué au cours de la formation et rupture d'une goutte par μ PIV (Micro *Particle Image Velocimetry*), méthode expérimentale permettant d'accéder aux champs de vitesse dans le plan focal de l'objectif du microscope de chaque phase. Le protocole de ces expériences est présenté au Chapitre 2 dans la section 2.4.2. Ces expériences ont été réalisées avec de l'huile de soja comme phase continue et de l'alginate 3% ou du Ficoll 1,174 g/mL comme phase dispersée sur les puces de géométrie A. Ces deux phases dispersées présentent des viscosités à cisaillement nul comparables et un caractère rhéofluidifiant significativement différent (voir 4.1.1.1). Dans les deux cas, les pressions appliquées à l'huile de soja et l'huile pré-gélifiante sont de 200 mbar, donnant un débit d'huile de soja de l'ordre de grandeur des débits utilisés lors des expériences de génération de gouttes présentées par la suite et utilisées pour la caractérisation de la taille, la fréquence et la transition *dripping/jetting*.

La Figure 6-1 présente les images acquises dans le cas de l'alginate 3% au cours des différentes étapes de formation de la goutte (décrites au paragraphe 3.1.2.1 du Chapitre 3), les champs de vitesse de chaque fluide correspondant ainsi que la cartographie du taux de cisaillement qui en découle.



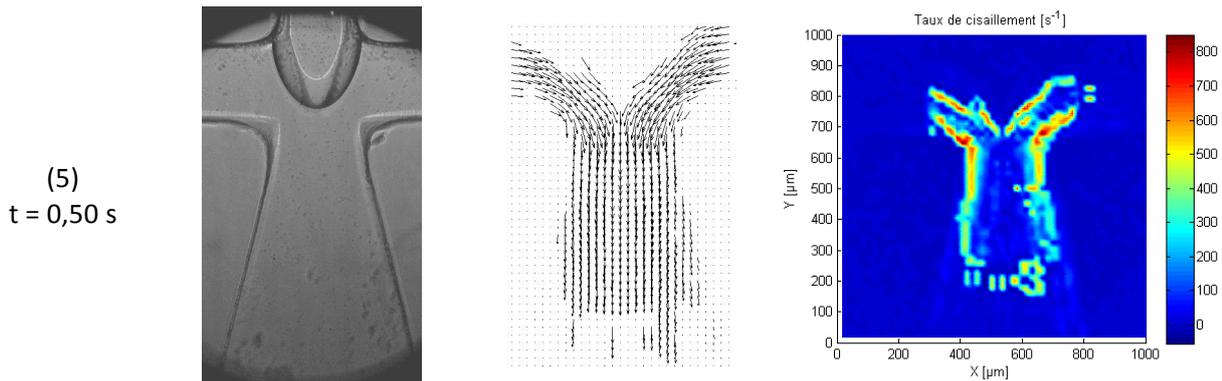


Figure 6-1 : Etapes de formation et rupture d'une goutte d'alginate 3% dans un flux d'huile de soja. Géométrie A. Phase continue : huile de soja. $P_{hAC} = 200$ mbar ; $P_h = 200$ mbar ; $P_{alg} = 170$ mbar.

Cette analyse montre que le taux de cisaillement varie à la fois spatialement et en amplitude au cours de la génération de goutte. La Figure 6-2 présente l'évolution du taux de cisaillement au niveau du cou puis du filament de phase dispersée (là où la largeur est minimale), au cours de la formation et de la rupture d'une goutte dans le cas de l'alginate 3%.

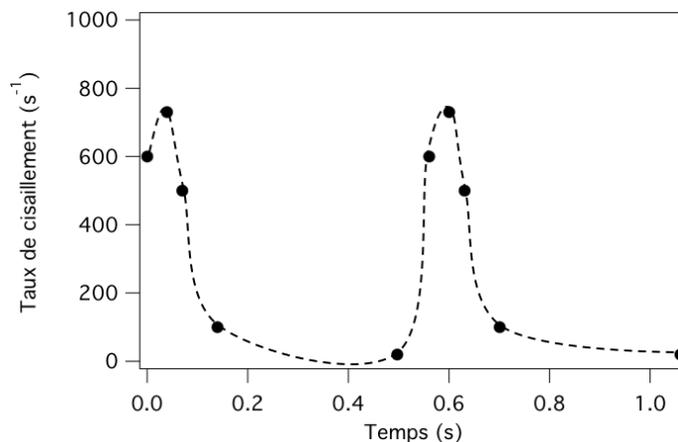


Figure 6-2 : Evolution du taux de cisaillement au cours de la génération d'une goutte

Le taux de cisaillement est maximal à l'étape 2, lorsque la phase dispersée bouche partiellement l'orifice. Puis le taux de cisaillement autour du cou puis du filament diminue lorsque celui s'affine et devient minimal juste avant rupture.

La Figure 6-3 présente la comparaison des images en lumière blanche, des champs de vitesse de chaque fluide correspondants et de la cartographie du taux de cisaillement qui en découle, à l'étape 2 de formation de la goutte pour laquelle le cisaillement est maximal, dans le cas de l'alginate 3% et du Ficoll 1,174 g/mL.

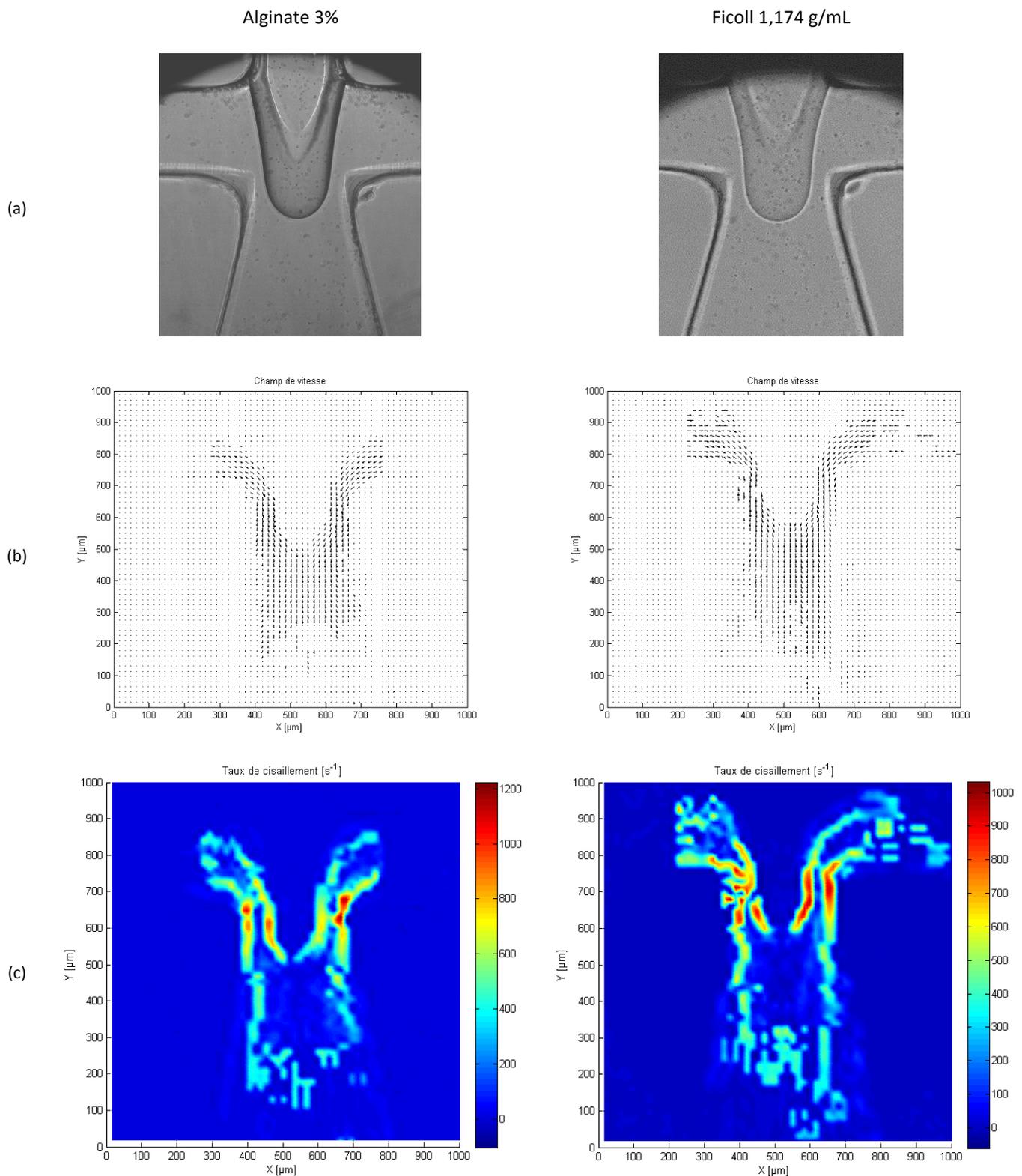


Figure 6-3 : Evaluation du taux de cisaillement lors de la formation d'une goutte d'alginate 3% et de Ficoll 1,174 g/mL à l'étape 2. (a) Images en lumière blanche ; (b) Champ de vitesse ; (c) Cartographie du taux de cisaillement. Géométrie A. Phase continue : huile de soja. $P_{hAC} = 200$ mbar ; $P_h = 200$ mbar ; $P_{alg} = 170$ mbar ; $P_{Ficoll} = 160$ mbar.

Dans le cas des deux phases dispersées utilisées, l’alginate 3% et le Ficoll 1,174 g/mL, le cisaillement maximal atteint lors de la rupture est de l’ordre de $800-1000 \text{ s}^{-1}$. A ce cisaillement, l’alginate et le Ficoll se trouvent dans le régime rhéofluidifiant (voir 4.1.1.1). Ces expériences montrent donc qu’il **est pertinent d’étudier l’influence de la rhéofluidification de la phase dispersée sur la formation des gouttes.**

6.2 Transition reflux/dripping

Ce paragraphe se focalise sur la détermination des conditions permettant de commencer à générer des gouttes, c’est-à-dire sur la détermination de la transition reflux/dripping.

Cette limite peut être déterminée grâce aux modèles analytique et numériques établis au Chapitre 5.

CONFIDENTIEL

Cette pression a également été déterminée par les modèles numériques présentés au Chapitre 5 en évaluant la pression à la jonction 1 au point « P_{mffd} » indiqué sur la Figure 6-4.

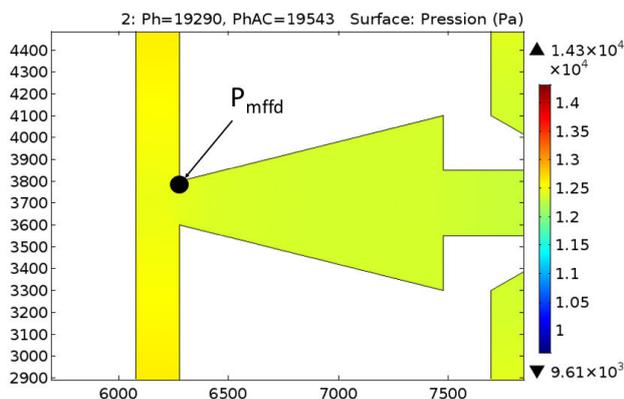


Figure 6-4 : Modélisation du champ de pression au niveau de la jonction 1. Résultat de la simulation numérique utilisant le modèle 2D monophasique sur la géométrie A. Les axes sont gradués en μm . $P_c = P_{hAC} = 200 \text{ mbar}$. $P_d = 125 \text{ mbar}$.

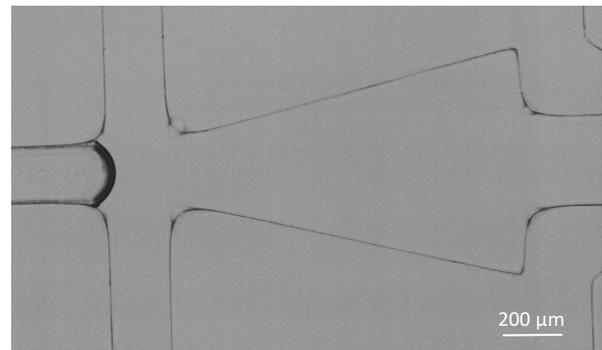


Figure 6-5 : Détermination expérimentale de la limite reflux/dripping : pression P_d pour laquelle la phase dispersée stable à la jonction. Phase dispersée : alginate 1%. Phase continue : HS. Phase pré-gélifiante : HS+3%AC. $P_c = P_{hAC} = 200 \text{ mbar}$. $P_d = 134 \text{ mbar}$.

Les modèles analytique et numériques ont été comparés aux expériences (Figure 6-6). Expérimentalement, la pression $P_{d,stab}$ a été déterminée comme étant la pression appliquée au contrôleur en pression à laquelle l’interface entre la phase dispersée et la phase continue est fixe et située à l’extrémité aval du canal de phase dispersée (Figure 6-5).

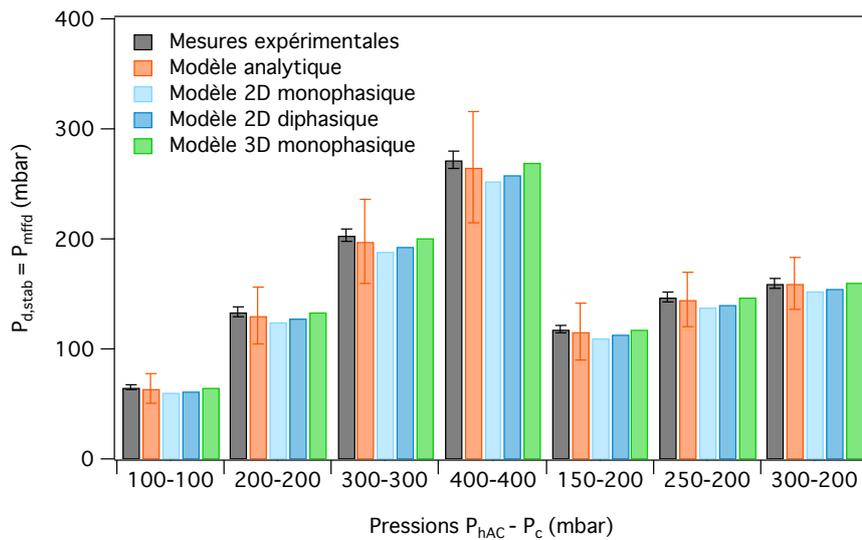


Figure 6-6 : Comparaison des valeurs de $P_{d,stab}$ mesurées expérimentalement et calculées par les différents modèles analytique et numériques. Valeurs obtenues pour différents couples de pressions $P_c - P_{hAC}$. Les barres d’erreur correspondent aux incertitudes sur la mesure ou le calcul.

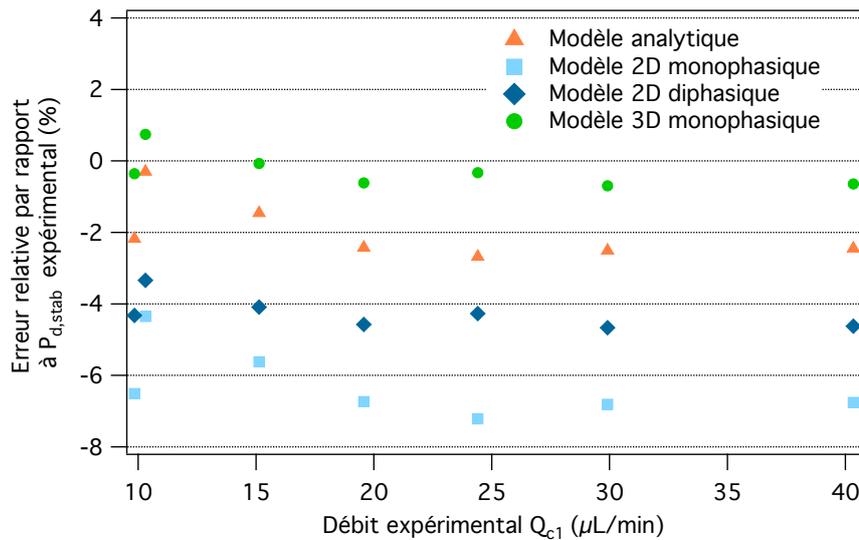


Figure 6-7 : Comparaison de l’erreur relative par rapport à la valeur $P_{d,stab}$ expérimentale pour les différents modèles analytique et numériques, en fonction du débit de la phase continue.

Les valeurs calculées par le modèle analytique et le modèle numérique 3D monophasique correspondent aux valeurs expérimentales à <3% près (Figure 6-7). Cela confirme la fiabilité de ces modèles (voir 5.1.3). La pression $P_{d,stab}$ étant calculée à partir de la pression P_{mffd} calculée par le modèle analytique de la phase continue, l’erreur a les mêmes origines que celles énoncées au paragraphe 5.1.3.

Lorsque la pression P_d appliquée à la phase dispersée est telle que $P_d > P_{d,stab}$ alors il y a génération de gouttes (régime de *dripping*).

BILAN SUR LA LIMITE REFLUX/DRIPPING

Les modèles analytique et numériques permettent donc de **connaître la pression minimale à appliquer à la phase dispersée pour être en régime de gouttes** à 3% près, quelles que soient les phases dispersées et continues, les dimensions du système et les pressions appliquées aux phases continues et pré-gélifiantes.

6.3 Présentation des expériences de caractérisation du *dripping*

Les expériences présentées dans la suite de ce chapitre ont été réalisées pour les différents couples de phases dispersées et phases continues listés dans le Tableau 6-1. Les propriétés physico-chimiques de ces phases ont été caractérisées au Chapitre 4 et sont rappelées dans ce tableau. Pour la phase dispersée, les viscosités à cisaillement nul énoncées ici correspondent aux valeurs obtenues par les mesures au rhéomètre (voir 4.1.1.1).

Couple	Phase dispersée	η_{0d} (mPa.s)	Phase continue	η_c (mPa.s)	η_{0d}/η_c	$\gamma_{\text{eau/phase continue}}$ (mN/m)	Symbole
1	Alginate 4%	10390	Huile de soja (HS)	50,7	205	25,1	▶
2	Alginate 3%	3480	Huile de soja (HS)	50,7	69	25,1	●
3	Alginate 2%	806	Huile de soja (HS)	50,7	16	25,1	▲
4	Alginate 1%	92	Huile de soja (HS)	50,7	1,8	25,1	◆
5	Ficoll 1,330 g/mL	5621	Huile de soja (HS)	50,7	111	25,1	◻
6	Ficoll 1,174 g/mL	3693	Huile de soja (HS)	50,7	72	25,1	○
7	Ficoll 0,925 g/mL	1147	Huile de soja (HS)	50,7	23	25,1	△
8	Ficoll 0,527 g/mL	78	Huile de soja (HS)	50,7	1,5	25,1	◇
9	Alginate 3%	3480	Acide oléique (AO)	36,7	95	12,6	◆
10	Alginate 4%	10390	Acide oléique (AO)	36,7	283	12,6	◆
11	Alginate 4%	10390	Huile de paraffine (HP)	114,3	91	23,4	◆
12	Alginate 3%	3480	HS+0,15%Span80	50,7	69	16,2	◀
13	Alginate 3%	3480	HS+0,24%Span80	50,0	70	14,2	■
14	Alginate 3%	3480	HS+0,35%Span80	51,0	68	8,3	▶

Tableau 6-1 : Couples de phase dispersée/phase continue et leurs propriétés physico-chimiques : la viscosité à cisaillement nul de la phase dispersée η_{0d} , la viscosité de la phase continue η_c , le rapport de viscosité η_{0d}/η_c et la tension interfaciale γ entre l'eau et la phase continue. Les symboles correspondent aux symboles utilisés dans les figures présentées ci-après.

L'influence des débits et des propriétés physico-chimiques des solutions a été étudiée sur la géométrie A, permettant ainsi d'obtenir des lois sur la taille, la fréquence de production et la transition *dripping/jetting*. La géométrie B a été utilisée pour étudier l'influence de la géométrie et tenter de généraliser les lois établies sur la géométrie A à toute géométrie. Pour rappel, dans les deux géométries A et B, la profondeur des canaux est de 200 μm , seule la section des canaux diffère. Les gouttes sont alors confinées lorsque leur volume devient supérieur à 4,2 nL.

La taille et la fréquence de production des gouttes ont été étudiées en faisant varier la pression P_d appliquée à la phase dispersée entre la pression $P_{d,stab}$ et la pression $P_{d,jet}$, à pression P_c constante, pour plusieurs valeurs de P_c . Pour chaque pression P_c , le régime de *dripping* a ainsi été parcouru entièrement. La pression $P_{d,jet}$ de transition *dripping/jetting* a été déterminée comme étant la pression pour laquelle le point

de rupture de la goutte se décale peu à peu en aval de la jonction, jusqu'à ce qu'un jet de phase dispersée se forme.

Les résultats sont présentés en fonction des débits de chaque phase et du nombre Capillaire Ca_c de la phase continue. Les débits ont été calculés grâce au modèle présenté au Chapitre 5. Il faut noter que, à P_c constante, lorsque la taille des gouttes augmente au-dessus d'une certaine valeur ($D > 0,7 * w$), le débit de la phase continue diminue (voir 5.1.4). Les débits Q_c calculés ici prennent bien en compte cette diminution ($Q_{c,gouttes}$ voir 5.1.4). Il en résulte qu'à P_c constante, le débit Q_c varie dans une certaine gamme de valeurs. Ces gammes sont précisées ici lorsque cela est nécessaire. D'autre part, le débit Q_d étant calculé par le produit de la fréquence de production et du volume des gouttes (voir 5.2), le débit Q_d de transition *dripping/jetting* indiqué ici correspond au débit calculé à partir de gouttes produites quelques mbar avant la pression $P_{d,jet}$. En ce qui concerne le nombre Capillaire, il existe deux définitions de ce nombre (voir 3.1.2.2). Afin de prendre en compte le cisaillement au niveau de l'orifice, il a été choisi d'utiliser la définition du nombre Capillaire donnée par Anna *et al.* [177] :

$$Ca_c = \frac{\eta_c a \Delta U}{\sigma \Delta z} = \frac{\eta_c Q_c a}{\sigma d \Delta z} \left[\frac{1}{w_{or}} - \frac{1}{2w_c} \right]$$

où ΔU est la différence entre la vitesse moyenne de la phase continue dans les canaux en amont de la jonction et celle au niveau de l'orifice, Δz la distance entre le canal de phase dispersée et l'orifice, η_c et Q_c sont respectivement la viscosité et le débit de la phase continue, σ la tension interfaciale entre les deux phases, a la demi-largeur du canal de phase dispersée, d la profondeur des canaux, w_{or} la largeur de l'orifice et w_c la largeur du canal de phase continue. Dans nos géométries A et B, $\Delta z = w_c = 2a = w$, le nombre Capillaire est alors défini par :

$$Ca_c = \frac{\eta_c Q_c}{2\sigma d} \left[\frac{1}{w_{or}} - \frac{1}{2w_c} \right]$$

En théorie, $w_{or,A} = 200 \mu m$ dans la géométrie A et $w_{or,B} = 350 \mu m$ dans la géométrie B. En pratique, la résolution du PDMS entraîne que les pointes du triangle au niveau de la jonction sont arrondies, il en résulte que $w_{or,A} \approx 250 \mu m$ et $w_{or,B} \approx 400 \mu m$. Ce sont ces valeurs qui ont été utilisées dans les calculs.

6.4 Caractérisation de la taille et de la fréquence de production des gouttes

6.4.1 Influence des débits de chaque phase

La Figure 6-8 présente le volume des gouttes et leur fréquence de production en fonction du rapport de débit Q_d/Q_c pour différentes valeurs de débits Q_c , dans le cas de l'alginate 2% comme phase dispersée et l'huile de soja (HS) comme phase continue. Les données sont représentées en échelles logarithmiques. La viscosité à cisaillement nul de l'alginate 2% est de 806 mPa.s. Elle est donc comprise dans la gamme de viscosité étudiée dans la littérature. L'étude de cette solution permet donc de comparer les résultats à la littérature.

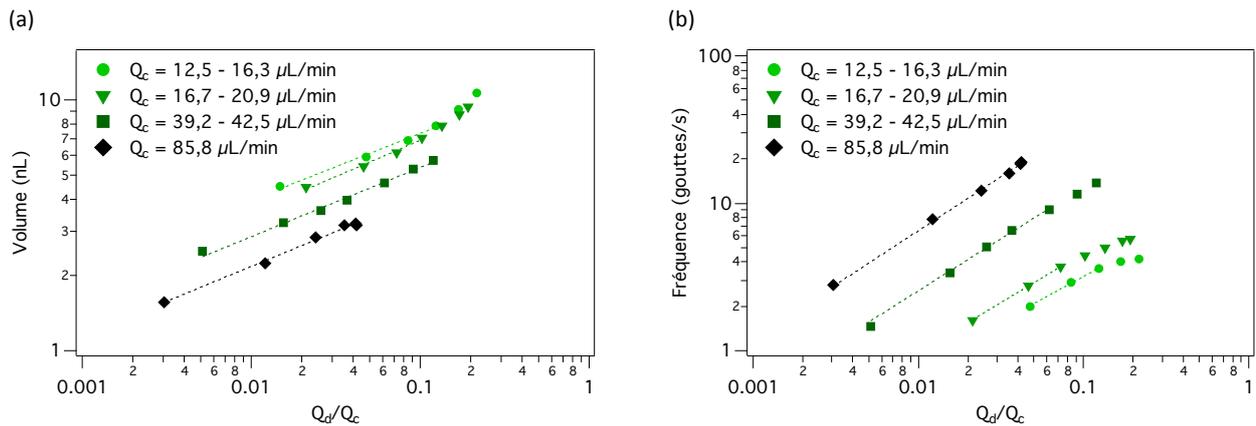


Figure 6-8 : Volume des gouttes (a) et fréquence de production (b) en fonction du rapport de débit Q_d/Q_c pour différents débits Q_c . Phase dispersée : alginate 2% ($\eta_{0d}=0,80$ Pa.s). Phase continue : HS ($\eta_c=50,7$ mPa.s, $\gamma_{\text{eau/HS}}=25,1$ mN/m). Géométrie A.

Le volume des gouttes produites avec l’alginate 2% varie entre 1,5 et 10,7 nL, ce qui correspond à des gouttes de diamètre compris entre 144 et 273 μm . Les gammes de débits utilisées permettent donc de produire des gouttes à la fois fortement confinées ($V > 4,2$ nL) et faiblement confinées ($V < 4,2$ nL).

Quel que soit le confinement, à Q_c constant (ou quasi-constant), **le volume des gouttes et leur fréquence de production augmentent avec le rapport de débit Q_d/Q_c en suivant une loi de puissance**. Ce type de dépendance est similaire à celui obtenu avec des dispositifs MFFD de type Anna ou des jonctions en croix et contrôlés en débits (voir 3.1.3.2). Ces résultats mettent en évidence que lorsque le débit Q_d augmente à Q_c fixe, à la fois la taille des gouttes et la fréquence de production augmentent. Toutefois, lorsque $Q_c < 20$ $\mu\text{L}/\text{min}$ et $Q_d/Q_c > 0,1$, la taille et la fréquence ne suivent plus les lois de puissance : la taille augmente plus fortement et la fréquence semble se stabiliser. Il semble donc qu’il y ait **une taille critique au-delà de laquelle lorsque le débit Q_d augmente à Q_c fixe, la taille des gouttes augmente fortement à fréquence quasiment constante** voire plus faible que la fréquence maximale atteinte.

Au delà d’une certaine valeur de rapport de débit, le *jetting* apparaît et il n’y a alors plus production de gouttes. Sur les graphes, les points extrêmes pour les valeurs de Q_d/Q_c les plus élevées correspondent donc aux valeurs de taille et fréquence obtenues juste avant *jetting*. A Q_c fixe, la fréquence maximale atteinte est donc déterminée par la transition *dripping/jetting*. Cette transition sera caractérisée au paragraphe 6.5.

Lorsque Q_c augmente, le volume des gouttes diminue, la fréquence de production à rapport de débit fixe augmente et la fréquence maximale atteinte à Q_c fixe augmente. Quelle que soit la valeur de Q_c , la pente des droites reste quasi-identique. Cela signifie que la dépendance de la taille et de la fréquence avec le rapport de débit ne dépend pas de Q_c . Les puissances des lois sont donc indépendantes de Q_c .

Il en résulte les lois suivantes :

$$V = K \left(\frac{Q_d}{Q_c} \right)^p \quad \text{avec } p \approx 0,3 \text{ et } K \text{ dépendant de } Q_c \text{ (} K \text{ diminue lorsque } Q_c \text{ augmente)}$$

$$f = f_0 \left(\frac{Q_d}{Q_c} \right)^q \quad \text{avec } q \approx 0,7 \text{ et } f_0 \text{ dépendant de } Q_c \text{ (} f_0 \text{ augmente lorsque } Q_c \text{ augmente)}$$

Lorsque le volume est tracé en fonction du produit du rapport de débit Q_c/Q_d par le nombre Capillaire Ca_c de la phase continue, tous les points du graphe précédent s'alignent sur une même droite :

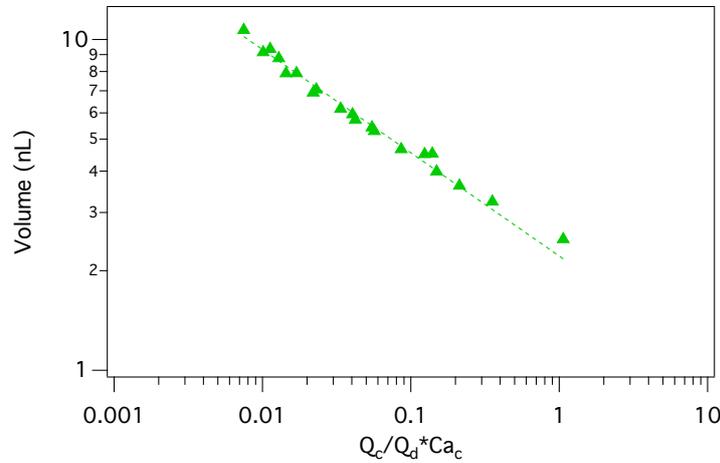


Figure 6-9 : Volume des gouttes en fonction du produit du rapport de débit Q_c/Q_d et du nombre Capillaire Ca_c de la phase continue. Phase dispersée : alginate 2% ($\eta_{0d}=0,80$ Pa.s). Phase continue : HS ($\eta_c=50,7$ mPa.s, $\gamma_{eau/HS}=25,1$ mN/m). Géométrie A.

Le volume semble donc être déterminé par la relation suivante :

$$V = V_0 \left(\frac{Q_c}{Q_d} Ca_c \right)^\alpha \quad \text{avec } \alpha \approx -0,3, \quad V_0 \approx 2,2 \text{ nL} \quad \text{et} \quad Ca_c = \frac{\eta_c Q_c}{2\sigma d} \left[\frac{1}{w_{or}} - \frac{1}{2w_c} \right]$$

Ce type de loi est similaire aux lois établies par Cubaud *et al.* [171] et Li *et al.* [172] dans le cas de jonctions en croix. Cette loi est également cohérente avec les résultats numériques de Wu *et al.* [184] obtenus en géométrie MFFD de type Anna, selon lesquels la taille des gouttes augmente lorsque Q_d/Q_c et l'inverse de Ca_c augmentent.

Ces résultats mettent donc en évidence que **le mécanisme de rupture dans notre géométrie MFFD (type Tan) semble identique à celui observé dans une géométrie de type Anna ou une jonction en croix.** D'autre part, dans toutes ces études, les fluides sont contrôlés en débits. Or, dans notre dispositif, les fluides sont contrôlés en pression et le même type de loi est obtenu. **Le mécanisme de rupture dans un dispositif MFFD contrôlé en pression semble donc identique à celui d'un dispositif MFFD contrôlé en débit.** La rupture serait donc décrite ici par le mécanisme explicité au paragraphe 3.1.2.3. Elle a lieu lorsque les forces d'inertie et visqueuses deviennent supérieures à la force de tension interfaciale.

D'après la conservation de la masse, le débit de la phase dispersée est égal au produit du volume des gouttes par la fréquence de production. D'après la loi sur le volume des gouttes, **la fréquence de production semble donc suivre la loi suivante :**

$$f = \frac{Q_d}{V} = \frac{Q_d}{V_0} \left(\frac{Q_c}{Q_d} Ca_c \right)^{-\alpha} = \frac{1}{V_0} Q_c^{-\alpha} Q_d^{1+\alpha} Ca_c^{-\alpha} \quad \text{avec } \alpha \approx -0,3 \quad \text{et} \quad V_0 \approx 4 \text{ nL}$$

A géométrie, viscosités et tension interfaciale fixes, la taille et la fréquence de production dépendent donc des débits de chaque phase de la façon suivante :

$$V \propto Q_c^{2\alpha} Q_d^{-\alpha} \text{ et } f \propto Q_c^{-2\alpha} Q_d^{1+\alpha}$$

Dans les conditions de l'expérience, $\alpha \approx -0,3$. Il en résulte :

$$V \propto Q_c^{-0,6} Q_d^{0,3} \text{ et } f \propto Q_c^{0,6} Q_d^{0,7}$$

Lorsque Q_d augmente, à la fois le volume et la fréquence de production augmentent alors que lorsque Q_c augmente, la fréquence de production augmente mais la taille des gouttes diminue. La fréquence est plus sensible à la variation de débit de la phase dispersée qu'à la variation de débit de la phase continue.

La loi sur la taille a été établie ici avec une seule phase dispersée et une seule phase continue, la viscosité de chaque phase et la tension interfaciale n'ont pas été prises en compte. Les paragraphes suivants étudient l'influence des propriétés des fluides sur les paramètres de cette loi, de façon à la valider et la préciser.

La loi sur la taille des gouttes est suffisante pour décrire à la fois la taille et la fréquence de production des gouttes en fonction des débits et des propriétés des fluides. Par la suite, l'étude se focalise donc sur l'établissement de la loi sur la taille des gouttes, les tendances sur la fréquence pouvant être déduites. Toutefois, la variation de la fréquence de production en fonction des propriétés des fluides est présentée afin de montrer les gammes de valeurs obtenues et l'importance des variations.

Par la suite, le volume sera représenté en fonction du produit du rapport de débit Q_c/Q_d et du nombre Capillaire Ca_c de la phase continue. La fréquence sera représentée en fonction du rapport de débit Q_c/Q_d et pour $Q_c \approx 40 \mu\text{L}/\text{min}$.

6.4.2 Influence des viscosités et du caractère rhéofluidifiant de la phase dispersée

Ce paragraphe présente les résultats obtenus avec les couples de phases dispersées et phases continues 1 à 11 (Tableau 6-1), permettant d'étudier l'influence du rapport de viscosité entre les deux phases. L'influence du caractère rhéofluidifiant de la phase dispersée a été étudiée en comparant les expériences réalisées avec l'alginate (1 à 4) à celles réalisées avec le Ficoll (5 à 8) à phase continue constante. En effet, les expériences de PIV présentées au paragraphe 6.1 ont montré que le cisaillement maximal exercé par la phase continue sur la phase dispersée au cours de la formation et de la rupture des gouttes est de l'ordre de 1000 s^{-1} . A ce cisaillement, les solutions d'alginate et de Ficoll de viscosité à cisaillement nul comparable ont des viscosités significativement différentes : l'alginate est très rhéofluidifiant alors que le Ficoll a un comportement proche d'un fluide Newtonien. Ces phases dispersées et les débits utilisés permettent donc d'étudier l'influence de la rhéofluidification sur la taille et la fréquence de production des gouttes.

La Figure 6-10 présente le volume et la fréquence de production des gouttes pour les différentes solutions d'alginate et de Ficoll, avec l'huile de soja comme phase continue (couples 1 à 8).

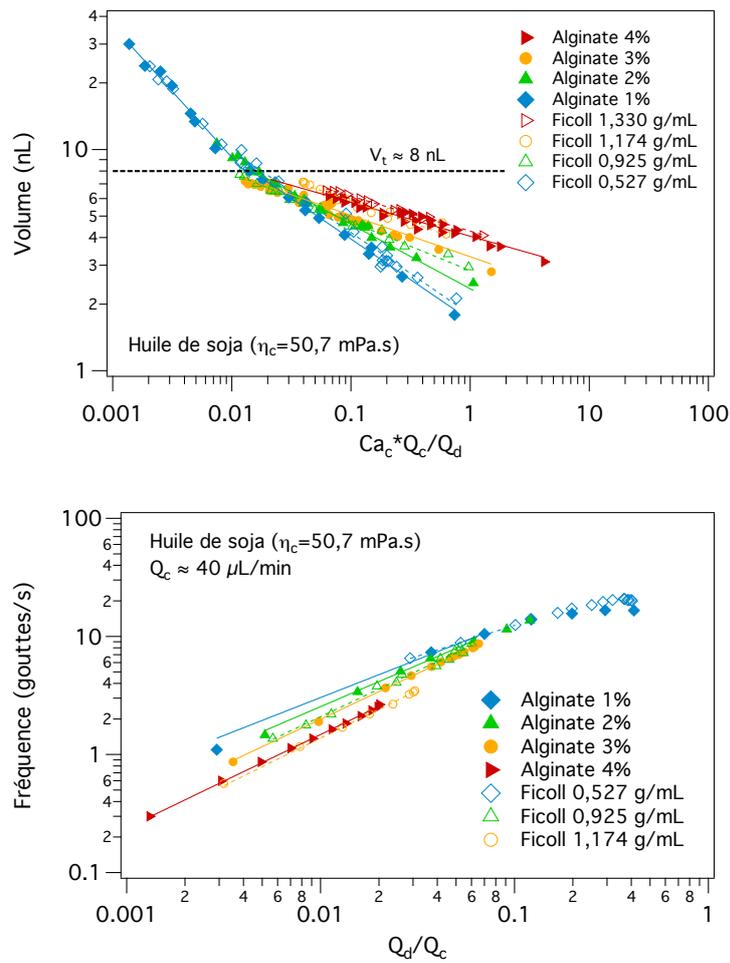
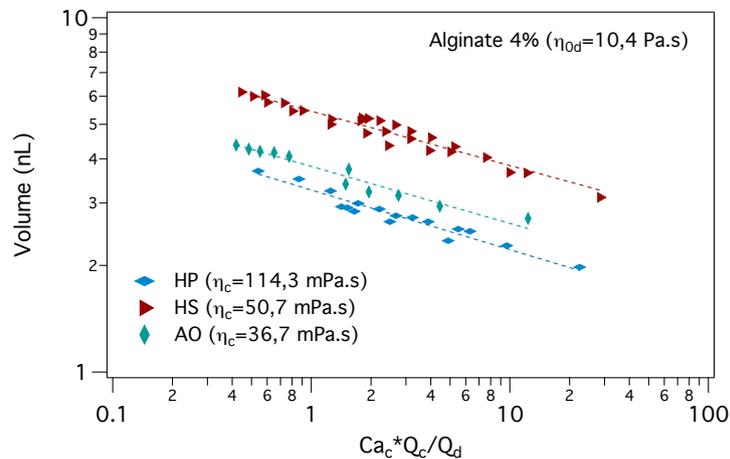


Figure 6-10 : Influence de la viscosité et du caractère rhéofluidifiant de la phase dispersée sur le volume et la fréquence de production des gouttes. Les marqueurs correspondent aux points expérimentaux et les lignes correspondent à l’ajustement des données par une loi de puissance. Les marqueurs pleins correspondent aux solutions d’alginate, les marqueurs vides aux solutions de Ficoll. La phase continue est de l’huile de soja.

La Figure 6-11 présente le volume et la fréquence de production des gouttes pour différentes huiles (HS, HP et AO), avec l’alginate 4% comme phase dispersée (couples 9 à 11).



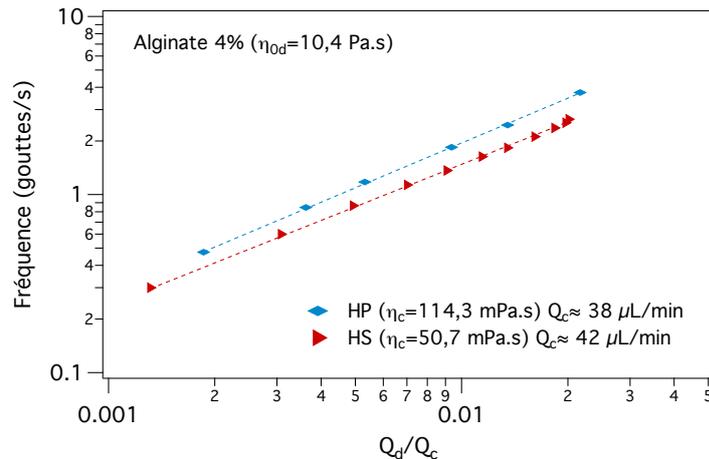


Figure 6-11 : Influence de la viscosité de la phase continue sur le volume des gouttes. Les marqueurs correspondent aux points expérimentaux et les lignes correspondent à l'ajustement des données par une loi de puissance. La phase dispersée est la solution d'alginate 4%.

En ce qui concerne le volume, pour chaque couple phase dispersée/phase continue, les points obtenus à différents débits de phase continue s'alignent sur une même droite, comme dans le cas de l'alginate 2% présenté précédemment. La loi d'échelle établie avec l'alginate 2% est donc également valable dans toute la gamme de viscosité étudiée. **Le mécanisme de rupture reste donc identique pour des phases dispersées de haute viscosité et non-Newtoniennes.**

Le graphe de la Figure 6-10 montre deux domaines délimités par une taille de gouttes critique $V_t \approx 8 \pm 1$ nL, correspondant à un diamètre de gouttes $D \approx 250 \pm 10$ μm , et une valeur de $Ca_c \cdot Q_c/Q_d$ critique d'environ 0,01. Un changement de régime est également observé pour la fréquence pour $Q_d/Q_c \approx 0,1$. Ce changement correspond à des gouttes de volume égal au volume critique V_t . **Le système présente donc deux régimes de fonctionnement selon le confinement.** Ces régimes peuvent être *a priori* apparentés au régime de *squeezing* à fort confinement et au régime de *dripping* à plus faible confinement, décrits dans la littérature (voir 3.1.1). Toutefois, le volume de transition est deux fois plus élevé que le volume pour lequel les gouttes ont un diamètre égal à la largeur et profondeur des canaux. La détermination du volume de transition sera donnée par la suite (au paragraphe 6.4.4) grâce à la comparaison des résultats obtenus pour les géométries A et B.

Dans le domaine où $V > 8,2$ nL (soit $D > 250$ μm), la taille des gouttes d'alginate et de Ficoll, suit la relation suivante :

$$V = V_{0,sup} \left(\frac{Q_c}{Q_d} Ca_c \right)^{\alpha_{sup}} \quad \text{avec } V_{0,sup} = 0,6 \pm 0,2 \text{ nL} \quad \text{et } \alpha_{sup} = -0,60 \pm 0,05$$

Dans le cas d'un régime de *squeezing*, le volume est proportionnel à l'inverse du rapport de débit Q_c/Q_d [178] et du nombre Capillaire [177] et est indépendant de la viscosité de la phase dispersée. Dans nos expériences, la puissance de la loi est égale à -0,6 et est donc différente de -1. **Malgré le fort confinement, un régime de *squeezing* pour lequel la rupture est purement contrôlée par la géométrie est donc exclu.** La rupture semble déterminée à la fois par la géométrie et par le cisaillement, quel que soit le confinement.

Cette gamme de taille de gouttes n'a pu être atteinte qu'avec les solutions d'alginate 1% et de Ficoll 0,527 g/mL, de viscosité à cisaillement nul comparable. En effet, pour les autres solutions d'alginate et de Ficoll, le *jetting* apparaît avant que la taille des gouttes n'atteigne ou ne dépasse cette taille critique. Il n'est donc pas possible avec les données acquises de connaître l'influence de la viscosité dans ce domaine.

Dans ce domaine, la fréquence de production est quasi-stable voire diminue lorsque le débit de phase dispersée augmente.

Dans le domaine où $V < 8,2$ nL (soit $D < 250$ μm), la taille des gouttes suit la relation suivante :

$$V = V_{0,inf} \left(\frac{Q_c}{Q_d} C a_c \right)^{\alpha_{inf}}$$

soit
$$V = V_{0,inf} \left(\frac{Q_c^2}{Q_d} \frac{\eta_c}{2\sigma d} \left[\frac{1}{w_{or}} - \frac{1}{2w_c} \right] \right)^{\alpha_{inf}} \quad \text{avec } 1,5 < V_{0,inf} < 4,5 \text{ nL et } -0,4 < \alpha_{inf} < -0,1$$

Il en résulte que la fréquence de production des gouttes suit la loi suivante :

$$f = \frac{1}{V_{0,inf}} Q_c^{-2\alpha} Q_d^{1+\alpha} \left(\frac{\eta_c}{2\sigma d} \left[\frac{1}{w_{or}} - \frac{1}{2w_c} \right] \right)^{-\alpha_{inf}}$$

Le facteur $V_{0,inf}$ et la puissance α_{inf} dépendent tous deux du rapport de viscosité η_{0d}/η_c . Les valeurs obtenues pour chaque couple phase dispersée/phase continue sont représentées sur la Figure 6-12 et la Figure 6-13 et sont regroupées dans le Tableau 6-2.

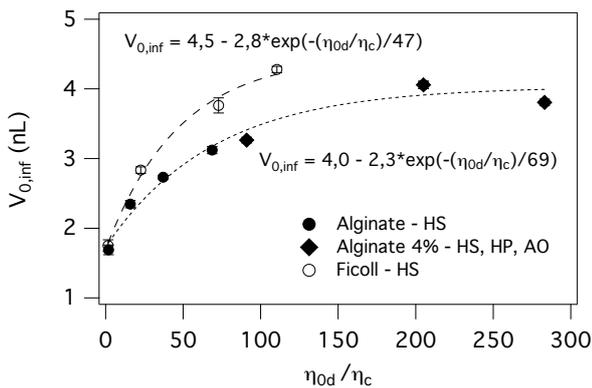


Figure 6-12 : Variation de $V_{0,inf}$ en fonction du rapport de viscosité entre les deux phases

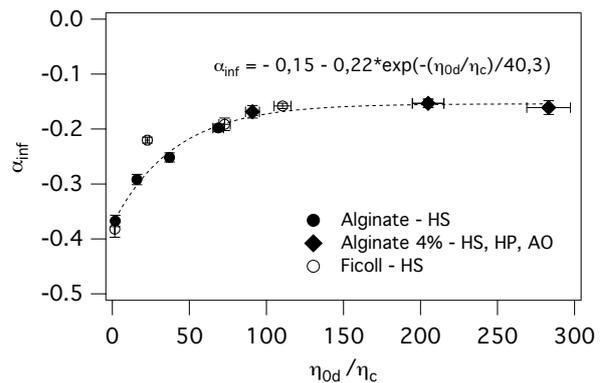


Figure 6-13 : Variation de la puissance α_{inf} en fonction du rapport de viscosité entre les deux phases

Couple	Phase dispersée	η_{0d} (mPa.s)	Phase continue	η_c (mPa.s)	η_{0d}/η_c	α	V_0' (nL)
1	Alginate 4%	10390	Huile de soja (HS)	50,7	205	-0,15	4,1
2	Alginate 3%	3480	Huile de soja (HS)	50,7	69	-0,20	3,1
3	Alginate 2%	806	Huile de soja (HS)	50,7	16	-0,29	2,3
4	Alginate 1%	92	Huile de soja (HS)	50,7	1,8	-0,37	1,7
5	Ficoll 1,330 g/mL	5621	Huile de soja (HS)	50,7	111	-0,16	4,3
6	Ficoll 1,174 g/mL	3693	Huile de soja (HS)	50,7	72	-0,19	3,8
7	Ficoll 0,925 g/mL	1147	Huile de soja (HS)	50,7	23	-0,22	2,8
8	Ficoll 0,527 g/mL	78	Huile de soja (HS)	50,7	1,5	-0,38	1,8
10	Alginate 4%	10390	Acide oléique (AO)	36,7	283	-0,16	3,8
11	Alginate 4%	10390	Huile de paraffine (HP)	114,3	91	-0,17	3,3

Tableau 6-2 : Valeurs des volumes $V_{0,inf}$ et des puissances α_{inf} pour chaque couple phase dispersée/phase continue

Lorsque le rapport de viscosité η_{0d}/η_c augmente, la puissance α_{inf} diminue en valeur absolue et tend vers un plateau proche de 0 : **plus le rapport de viscosité est élevé, plus l'influence des débits sur la taille des gouttes et l'influence du débit de la phase continue sur la fréquence sont faibles.** La gamme de valeurs de α_{inf} ainsi que la tendance sur la taille sont en accord avec ce qui est décrit par Nie *et al.* [178] dans le cas de gouttes d'huile dans l'eau et pour des viscosités de phases dispersées inférieures à 500 mPa.s. Ce résultat confirme et étend les résultats de Nie *et al.* [178] dans le cas de gouttes de phases aqueuses dans un flux d'huile et aux cas des phases dispersées de forte viscosité (jusqu'à 10 Pa.s). Ces expériences apportent également **une quantification de la dépendance de la taille et de la fréquence de production avec les débits**, quelles que soient les viscosités des phases, grâce à la relation établie sur α_{inf} .

A géométrie, débits et tension interfaciale fixes, la taille et la fréquence de production dépendent des viscosités de chaque phase de la façon suivante :

$$V \propto V_{0,inf} \eta_c^{\alpha_{inf}} \quad \text{et} \quad f \propto \frac{1}{V_{0,inf}} \eta_c^{-\alpha_{inf}}$$

avec $1,5 < V_{0,inf} < 4,5 \text{ nL}$ et $-0,4 < \alpha_{inf} < -0,1$, tous deux dépendant du rapport de viscosité. Le volume et la fréquence de production des gouttes dépendent donc à la fois de la viscosité de la phase continue et du rapport de viscosité entre les deux phases.

Le facteur $V_{0,inf}$ augmente lorsque le rapport de viscosité η_{0d}/η_c augmente et la puissance α_{inf} est négative. Il en résulte que **lorsque η_{0d}/η_c augmente, la taille des gouttes augmente et la fréquence de production diminue** (Figure 6-14). D'autre part, les coefficients $V_{0,inf}$ et α_{inf} suivent des lois du type :

$$V_{0,inf} \propto A - B e^{-\frac{1\eta_{0d}}{\tau \eta_c}} \quad \text{et} \quad \alpha_{inf} \propto C - D e^{-\frac{1\eta_{0d}}{\tau \eta_c}}$$

Cela signifie que plus le rapport de viscosité augmente, moins la viscosité de la phase dispersée influence la taille et la fréquence de production. **A fort contraste de viscosités entre les deux phases ($\eta_{0d}/\eta_c > 100$), la taille et la fréquence sont alors quasiment indépendantes de la viscosité de la phase dispersée.** Ces résultats sont en accord à la fois avec les résultats de Nie *et al.* [178] selon lesquels la taille des gouttes augmente lorsque la viscosité de la phase dispersée augmente et ceux de Cubaud *et al.* [171] selon lesquels la taille des gouttes dépend faiblement de la viscosité de la phase dispersée lorsque le rapport de viscosité entre les deux phases dépasse une certaine valeur.

Ces relations signifient également que **pour une phase dispersée donnée, la fréquence de production peut être augmentée en augmentant la viscosité de la phase continue**. Cela est également en accord avec les résultats de la littérature décrits dans le cas de phases dispersées Newtoniennes et de faibles viscosités (voir 3.1.3.3). Dans le cas de l'alginate 4% ($\eta_{0d}=10,4$ Pa.s) présenté à la Figure 6-11, l'utilisation d'huile de paraffine à la place de l'huile de soja permet d'augmenter la fréquence de production d'environ 30%.

Cette étude, effectuée sur une large gamme de rapports de viscosités, permet donc de confirmer les résultats de la littérature concernant l'influence de la viscosité des fluides et de les étendre aux cas des phases dispersées de fortes viscosités (>2 Pa.s) et non-Newtoniennes.

En ce qui concerne l'influence du caractère non-Newtonien, celui-ci est étudié en comparant la taille et la fréquence de production dans le cas de l'alginate et du Ficoll. La Figure 6-13 montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les puissances α_{inf} obtenues dans le cas de l'alginate ou du Ficoll. **Le caractère rhéofluidifiant des solutions ne semble pas modifier la dépendance de la taille et de la fréquence de production des gouttes avec les débits.**

La Figure 6-12 montre que le coefficient $V_{0,inf}$ est plus faible dans le cas de l'alginate que dans le cas du Ficoll. Pour une meilleure comparaison de la taille et de la fréquence, la Figure 6-14 présente leur variation en fonction de la viscosité à cisaillement nul de la phase dispersée η_{0d} , à débits fixes ($Q_d/Q_c = 0,01$ et $Q_c \approx 40$ $\mu\text{L}/\text{min}$) dans le cas de l'alginate et du Ficoll.

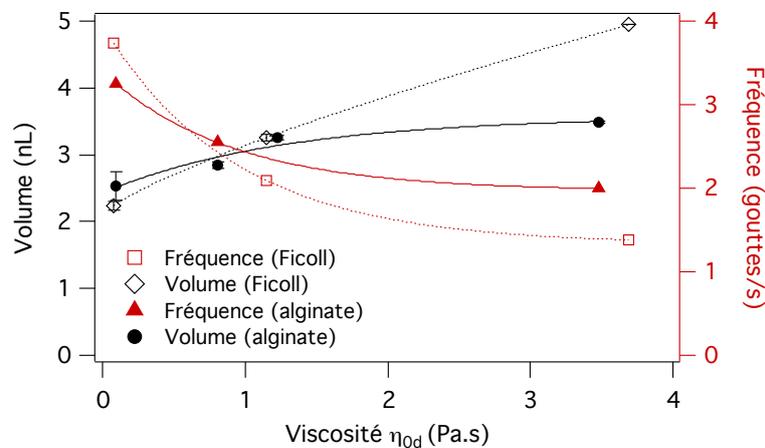


Figure 6-14 : Influence de la viscosité et du caractère rhéofluidifiant de la phase dispersée sur la taille et la fréquence de production de gouttes à $Q_d/Q_c = 0,01$. Phase continue : huile de soja. Géométrie A. $Q_c \approx 40$ $\mu\text{L}/\text{min}$.

Lorsque $\eta_{0d} > 800$ mPa.s, les gouttes formées à partir de l'alginate sont plus petites et produites avec une fréquence plus importante que celles formées à partir du Ficoll de même viscosité à cisaillement nul. La différence entre les valeurs obtenues dans le cas du Ficoll et de l'alginate augmente lorsque η_{0d} augmente. Or, la taille des gouttes diminue lorsque η_{0d} diminue à phase continue constante. Il semble donc que la viscosité apparente de l'alginate soit plus faible que celle du Ficoll lors de la formation des gouttes, ce qui est en accord avec le caractère rhéofluidifiant de l'alginate. Ces résultats mettent donc en évidence que **le caractère rhéofluidifiant de la phase dispersée entraîne une diminution de la taille des gouttes et favorise la productivité du système de génération de gouttes.**

La tendance inverse est observée lorsque $\eta_{0d} < 800$ mPa.s. Toutefois, pour ces valeurs de η_{0d} , le caractère rhéofluidifiant de l'alginate est quasiment négligeable (voir 4.1.1.1). Il semble donc qu'il y ait un autre facteur intervenant dans la détermination de la taille et de la fréquence de production.

L'influence du caractère rhéofluidifiant a été étudiée ici en comparant deux polymères ayant des caractères rhéofluidifiants significativement différents. Toutefois, ces deux polymères présentent également un caractère élastique non négligeable (voir 4.1.2). Les études sur l'influence de l'élasticité, effectuées sur des polymères de viscosité faible (< 6 mPa.s) et constante en fonction du cisaillement, ont montré que l'élasticité influençait la production de gouttes : lorsque l'élasticité augmente, la taille des gouttes augmente et la fréquence diminue [173]. L'étude de l'influence de la rhéofluidification devrait donc en théorie être réalisée en utilisant des polymères d'élasticité égale afin de s'affranchir de l'influence de l'élasticité. L'élasticité des solutions d'alginate et de Ficoll a été caractérisée au Chapitre 4 mais il est difficile de conclure sur les résultats obtenus. Il semble que les solutions d'alginate soient plus élastiques que les solutions de Ficoll.

Dans nos expériences, lorsque $\eta_{0d} < 800$ mPa.s, les variations de taille et fréquence observées en comparant l'alginate et le Ficoll sont en accord avec les variations décrites lorsque l'élasticité augmente. Les tendances sur la taille et la fréquence observées sont donc probablement dues à l'élasticité des solutions. Toutefois, lorsque $\eta_{0d} > 800$ mPa.s, la taille des gouttes est plus faible dans le cas de l'alginate que dans le cas du Ficoll alors que l'alginate serait plus élastique. La tendance est donc ici inverse à celle décrite lorsque l'élasticité augmente. Dans cette gamme de viscosité, l'influence de l'élasticité sur la formation des gouttes semble donc négligeable ou moindre devant l'influence de la rhéofluidification. La différence d'élasticité entre les deux polymères ne remet *a priori* pas en cause les conclusions obtenues sur l'influence du caractère rhéofluidifiant sur la taille et la fréquence de production.

6.4.3 Influence de la tension interfaciale

Les couples de phases dispersées et phases continues 2 et 12 à 14 permettent d'étudier l'influence de la tension interfaciale à viscosités constantes, dans une gamme de tension interfaciale de 8,3 à 25,1 mN/m.

Des solutions de tension interfaciale plus faibles (≤ 6 mN/m) ont été testées mais n'ont pas permis la génération de gouttes. En effet, lorsque la tension interfaciale devient inférieure à 6 mN/m, la phase dispersée mouille les parois de canaux et il n'est alors plus possible de générer des gouttes. Ce phénomène a également été observé dans la littérature [171].

La Figure 6-15 présente le volume des gouttes en fonction du produit du rapport de débit Q_c/Q_d et du nombre Capillaire Ca_c de la phase continue pour les différentes solutions d'huile de soja contenant du Span80.

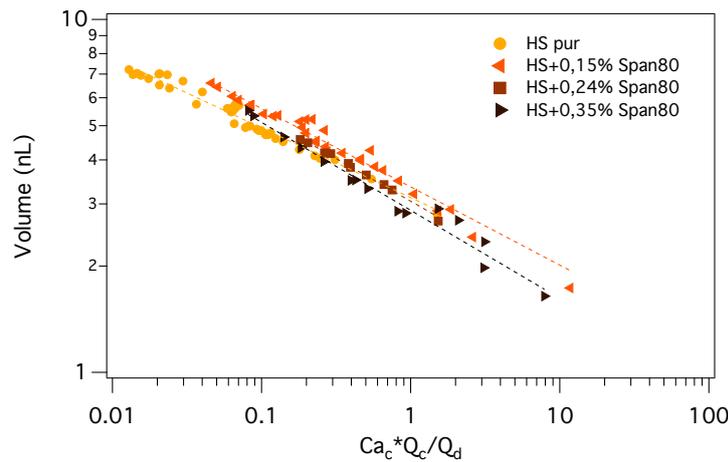


Figure 6-15 : Influence de la tension interfaciale sur le volume des gouttes. Les marqueurs correspondent aux points expérimentaux et les lignes correspondent à l'ajustement des données par une loi de puissance. La phase dispersée est une solution d'alginate 3%.

Les résultats montrent que, quelle que soit la concentration en Span80, tous les points s'alignent sur une même droite. Les puissances α_{inf} et les facteurs $V_{0,inf}$ sont quasiment égaux quelle que soit la concentration en Span80 dans la phase continue (Figure 6-16 et Figure 6-17). Cela montre que **la tension interfaciale est bien prise en compte dans la loi établie précédemment et confirme sa validité**. La puissance α_{inf} est comprise entre -0.25 et -0.2, ce qui est cohérent avec les résultats présentés à la Figure 6-13.

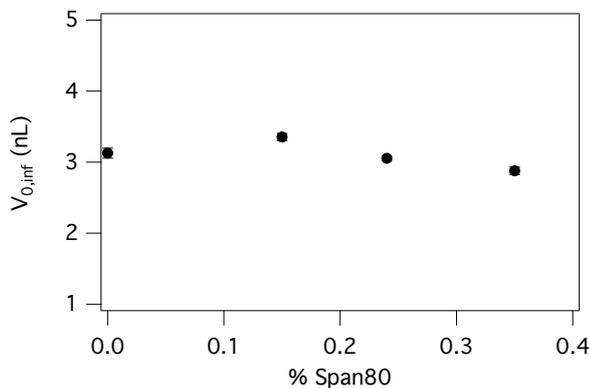


Figure 6-16 : Variation de $V_{0,inf}$ en fonction de la concentration en Span80

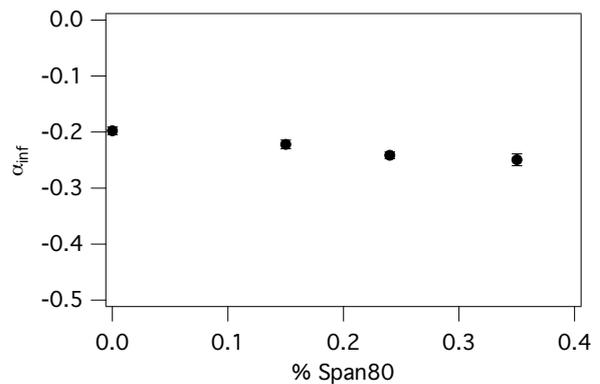


Figure 6-17 : Variation de la puissance α_{inf} en fonction de la concentration en Span80

D'après la loi établie, à géométrie, débits et viscosités fixes, lorsque la tension interfaciale augmente, la taille des gouttes augmente et la fréquence diminue en suivant les lois suivantes :

$$V \propto \sigma^{-\alpha} \text{ et } f \propto \sigma^{\alpha} \text{ avec } \alpha \in [-0,4; -0,1]$$

α dépend du rapport de viscosité entre les deux phases et augmente en valeur absolue lorsque le rapport de viscosité diminue. L'influence de la tension interfaciale sur la taille et le volume est donc d'autant plus importante que le rapport de viscosité entre les deux phases est faible.

La Figure 6-18 présente les valeurs de volume et de fréquence obtenues expérimentalement en fonction de la concentration en Span80 dans le cas de l’alginate 3% et pour $Q_c \approx 40 \mu\text{L}/\text{min}$ et $Q_d/Q_c = 0,01$. Dans le cas de l’alginate 3% et de l’huile de soja, lorsque la tension interfaciale est réduite de 25,1 mN/m à 8,3 mN/m, alors l’augmentation de fréquence est d’environ de 20%.

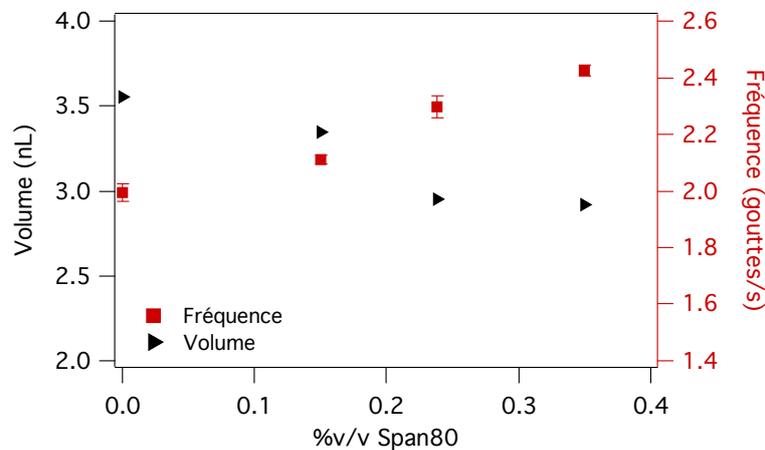


Figure 6-18 : Fréquence de production des gouttes en fonction de la concentration en tensioactifs Span80 à $Q_d/Q_c = 0,01$. Phase dispersée : alginate 3%. Géométrie A. $Q_c \approx 40 \mu\text{L}/\text{min}$.

Pour des phases dispersée et continue données et à débits fixes, **la fréquence de production peut donc être augmentée en réduisant la tension interfaciale entre les deux phases.**

Ces résultats sont toutefois à prendre avec précaution. En effet, l’influence de la tension interfaciale a été ici étudiée en ajoutant différentes quantités de tensioactifs dans une même huile. La tension interfaciale entre l’eau et ces huiles a été caractérisée au Chapitre 4 par la méthode de la goutte pendante. Les valeurs obtenues et utilisées ici correspondent donc à une mesure en statique. Dans le système microfluidique, la production de gouttes est un phénomène dynamique. Il a été montré que lorsque des tensioactifs sont utilisés, ceux-ci pouvaient s’accumuler à l’interface lors de la génération de gouttes [174]. La tension interfaciale au moment de la formation des gouttes peut donc être différente de la valeur mesurée en statique. La dynamique des tensioactifs n’est pas prise en compte ici. C’est la raison pour laquelle les résultats sont présentés en fonction de la concentration en tensioactifs et non en fonction de la tension interfaciale. L’étude a été réalisée avec des tensioactifs car il est difficile de trouver des huiles de viscosités égales et de tensions interfaciales avec l’eau significativement différentes.

En résumé, le volume et la fréquence de production des gouttes produites dans la géométrie A sont déterminés par les relations suivantes :

$$V = V_0 \left(\frac{Q_c}{Q_d} C a_c \right)^\alpha = V_0 \left(\frac{Q_c^2 \eta_c}{Q_d 2\sigma d} \left[\frac{1}{w_{or}} - \frac{1}{2w} \right] \right)^\alpha$$

$$f = \frac{1}{V_0} Q_c^{-2\alpha} Q_d^{1+\alpha} \left(\frac{\eta_c}{2\sigma d} \left[\frac{1}{w_{or}} - \frac{1}{2w} \right] \right)^{-\alpha}$$

avec α et V_0 tels que :

lorsque $V > V_t$: $\alpha = \alpha_{sup} \approx -0,6$ et $V_0 = V_{0,sup} \approx 0,6 \text{ nL}$

lorsque $V < V_t$: $\alpha = \alpha_{inf} \approx -0,15 - 0,22e^{-(\eta_{od}/\eta_c)/40,3}$

et $V_0 = V_{0,inf} \approx 4,2 - 2,3e^{-(\eta_{od}/\eta_c)/69}$ pour l'alginat

$V_0 = V_{0,inf} \approx 4,5 - 2,8e^{-(\eta_{od}/\eta_c)/47}$ pour le Ficoll

6.4.4 Vers une généralisation des lois et une prédiction de la taille et de la fréquence

CONFIDENTIEL

6.5 Transition *dripping/jetting* et optimisation de la fréquence de production

Les expériences précédentes montrent que la fréquence maximale de production de gouttes, à débit de phase continue fixe, est atteinte juste avant que le *jetting* n'apparaisse. Cela met donc en évidence **l'intérêt de caractériser la transition *dripping/jetting* dans le cadre de l'optimisation de la fréquence de production du système**. Lorsque la taille des gouttes dépasse la taille critique de transition entre les deux domaines de fonctionnement ($V > V_t$), la fréquence de production se stabilise voire diminue. Dans ce cas, la fréquence maximale n'est donc pas toujours atteinte juste avant le *jetting*. Dans le cadre de notre application, il est préférable de produire des gouttes dans le domaine où $V < V_t$, **la fréquence maximale est alors déterminée par la transition *dripping/jetting***.

Selon les études décrites dans la littérature et présentées au Chapitre 3, cette transition serait déterminée par des valeurs de rapports de débits, nombre Capillaire et/ou nombre de Weber critiques. La Figure 6-19 : Transition *dripping/jetting* pour les différentes phases dispersées utilisées présente les valeurs du nombre Capillaire Ca_d et du nombre de Weber We_d de la phase dispersée pour lesquels a lieu la transition *dripping/jetting*, en fonction du nombre Capillaire Ca_c de la phase continue. Ces valeurs sont représentées pour les différentes solutions d'alginate utilisées dans le cadre de cette étude.

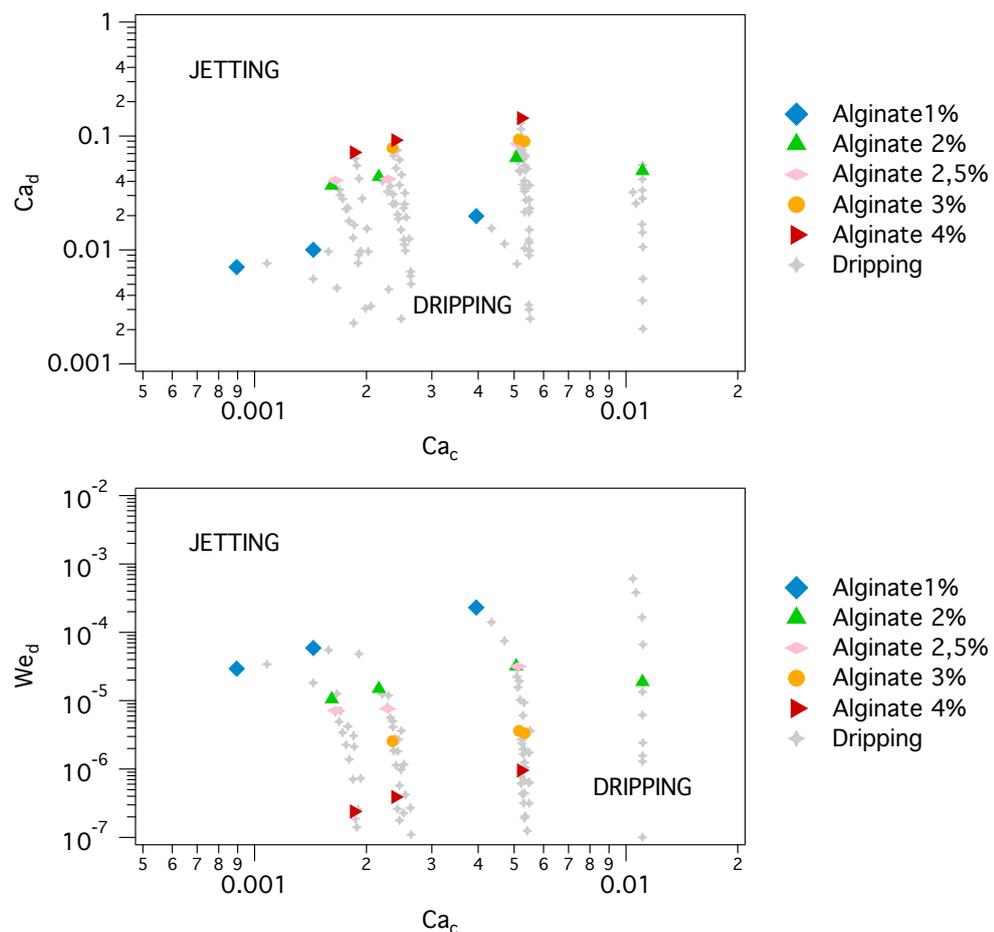


Figure 6-19 : Transition *dripping/jetting* pour les différentes phases dispersées utilisées

Tout d'abord, les nombres Capillaire Ca_d et de Weber We_d critique de transition dépendent du nombre Capillaire Ca_c de la phase continue. D'autre part, ces nombres critiques varient sur plusieurs ordres de grandeur selon la viscosité de la phase dispersée. Le nombre Capillaire Ca_d de transition varie entre 10^{-2} et 10^{-1} et augmente lorsque la viscosité de la phase dispersée augmente. Au contraire, le nombre de Weber We_d de transition, qui varie entre 10^{-7} et 10^{-3} , diminue lorsque la viscosité de la phase dispersée augmente. Dans notre système, la transition n'est donc pas simplement déterminée par un ordre de grandeur des nombres Capillaires Ca_d et Ca_c contrairement à ce qui est décrit par Cubaud et Mason [171] et Nunes *et al.* [175], ou par un nombre de Weber We_d critique contrairement à ce qui est décrit par Li *et al.* [172].

Cette partie de la thèse s'attache à identifier les variables déterminant cette transition. Pour cela, comme pour la taille et la fréquence de production, l'influence des propriétés des fluides sur la transition *dripping/jetting* a été étudiée.

CONFIDENTIEL

6.6 Conclusions et discussion

6.6.1 Apports vis-à-vis de la littérature

Tout d’abord, ces expériences ont montré qu’il était **possible de générer des gouttes d’environ 200 μm de diamètre à partir de polymère de viscosité pouvant dépasser 10 Pa.s**. La taille et la fréquence de production de ces gouttes et la transition *dripping/jetting* ont alors été étudiées en fonction des débits, des viscosités des phases, du caractère rhéofluidifiant de la phase dispersée et de la tension interfaciale entre les deux phases.

La caractérisation de la taille des gouttes a permis de mettre en évidence que le mécanisme de rupture n’est pas uniquement contrôlé par la géométrie ou par le cisaillement. **La dynamique de rupture est contrôlée à la fois par le cisaillement et par la géométrie, dans toute la gamme de viscosité étudiée, et pour différents degrés de rhéofluidification**. La loi obtenue, loi de puissance du rapport de débit et du nombre Capillaire de la phase continue, met en évidence d’une part que le mécanisme de rupture dans un dispositif contrôlé en pression est semblable à celui d’un dispositif contrôlé en débits, et d’autre part que ce mécanisme reste valable pour les phases dispersées de très forte viscosité (>10 Pa.s) et rhéofluidifiantes, ce qui n’avait pas encore été montré dans la littérature.

Les coefficients des lois obtenues ici diffèrent de ceux obtenus dans la littérature mais sont du même ordre de grandeur. Il a été observé dans nos expériences que pour un même dispositif, il y a deux domaines de fonctionnement pour lesquels les coefficients de lois diffèrent. Ces domaines sont délimités par une taille de gouttes critique, mettant ainsi en évidence que le confinement détermine la taille des gouttes produites et la variation de la taille avec les débits. Les différences de coefficient entre les études sont donc probablement dues au confinement qui est variable selon les géométries employées.

En ce qui concerne la transition *dripping/jetting*,

CONFIDENTIEL

L’influence de la viscosité des phases a été étudiée dans une large gamme de viscosité de phase dispersée, allant jusqu’à >10 Pa.s. Dans la littérature, l’influence de la viscosité de la phase dispersée a été étudiée pour des viscosités inférieures à 2 Pa.s et les tendances observées ne sont pas claires et semblent parfois contradictoires (voir 3.1.3.3). **Les résultats obtenus ici permettent de confirmer les observations et de les étendre aux phases dispersées très visqueuses (>2 Pa.s) et non-Newtoniennes**.

L’influence du caractère rhéofluidifiant a été étudiée ici en comparant deux polymères ayant des caractères rhéofluidifiants significativement différents. A rapport de débit fixe, la rhéofluidification de la phase dispersée entraîne une diminution de la taille des gouttes et une augmentation de la fréquence de production, par rapport à une phase dispersée de viscosité à cisaillement nul comparable et non (ou significativement moins) rhéofluidifiante. La taille et la fréquence de production semblent donc être déterminées par la viscosité apparente de la phase dispersée lors de la formation et rupture des gouttes.

En ce qui concerne l'influence de la tension interfaciale, celle-ci a très peu été étudiée dans la littérature. Nos résultats montrent que lorsque la tension interfaciale augmente, la taille des gouttes augmente et la fréquence diminue. Toutefois, les résultats ne permettent pas de conclure clairement sur l'influence de la tension interfaciale sur la transition *dripping/jetting*. Comme discuté au paragraphe 6.4.3, l'étude ayant été réalisée en modifiant la tension interfaciale d'une huile par ajout de tensioactifs, ces résultats sont à prendre avec précaution.

L'étude de l'influence des débits, des propriétés physico-chimiques des fluides et des dimensions des canaux a permis d'établir une loi sur le volume des gouttes ainsi qu'une loi sur la transition *dripping/jetting* en fonction de tous ces paramètres. La loi sur la fréquence de production peut alors être directement déduite de la loi sur le volume des gouttes.

CONFIDENTIEL

6.7 Bilan sur le régime de *dripping*

CONFIDENTIEL

Chapitre 7

OPTIMISATION DE LA FREQUENCE ET PREDICTION DES PARAMETRES D'ENTREE DU SYSTEME

CONFIDENTIEL

PARTIE II

OPTIMISATION DE LA SURFACE DES CASPULES

Chapitre 8

DEVELOPPEMENT D'UN SYSTEME MICROFLUIDIQUE D'ENCAPSULATION MULTICOUCHE

8.1	Techniques d'encapsulation multicouche	169
8.1.1	Techniques de recouvrement des capsules après leur formation	169
8.1.1.1	Techniques classiques.....	169
8.1.1.2	Intégration en microsystemes et automatisation	171
8.1.2	Techniques d'encapsulation multicouche lors de la formation.....	173
8.1.2.1	Techniques classiques d'extrusion	173
8.1.2.2	Techniques microfluidiques	174
8.1.3	Conclusions et démarche mise en œuvre.....	176
8.2	Présentation des expériences.....	177
8.3	Régime de formation de gouttes multicouches.....	177
8.4	Confidentiel.....	177
8.5	Fréquence de production des gouttes multicouches	177
8.6	Caractérisation des capsules multicouches	177
8.7	Conclusions et perspectives	178
8.8	Premiers essais d'encapsulation d'îlots de Langerhans humains	178

Les premiers résultats d'essais cliniques d'implantation d'îlots de pancréas montrent que la durée de vie de la greffe est limitée, notamment à cause de la perte d'immunoprotection et du développement de fibroses à la surface des capsules. D'autre part, la présence de cellules en surface des capsules (protrusions) attire le système immunitaire du receveur et peut entraîner le rejet de la greffe. L'encapsulation multicouche apparaît alors comme étant une solution potentielle pour améliorer les performances des capsules à la fois en termes de résistance mécanique et d'état de surface (voir 1.2.3). L'encapsulation multicouche consiste à recouvrir les capsules d'une ou plusieurs couche(s) de polymère. Elle permet alors d'optimiser la surface des capsules, d'une part en évitant les protrusions et d'autre part en optimisant indépendamment le polymère au contact des cellules du polymère au contact du milieu dans lequel elles sont implantées.

Le deuxième objectif de la thèse a donc été de développer un système microfluidique d'encapsulation multicouche intégrable à la plateforme CellEnc® développée au sein du laboratoire (voir Introduction générale). L'étude se focalise sur le développement du système et non sur le choix du polymère d'encapsulation et du polymère de couche. L'étude a alors été réalisée en utilisant de l'alginate SLG100 à la fois pour le polymère constituant le cœur des capsules et pour le polymère constituant la couche.

Ce chapitre décrit tout d'abord l'état de l'art sur les techniques actuelles de formation de capsules multicouches puis la démarche adoptée pour le développement du système. Il présente ensuite la caractérisation du système en termes de régimes de fonctionnement, d'écoulements et productivité ainsi que la caractérisation des capsules obtenues. Les premiers essais d'encapsulation de cellules avec ce système sont présentés.

8.1 Techniques d'encapsulation multicouche

Classiquement, l'ajout de couches de polymère est réalisé après formation et gélification des capsules. Pour limiter le nombre d'étapes dans la fabrication des capsules, certaines équipes s'attachent désormais à former directement des gouttes multicouches qui sont ensuite gélifiées. Les différentes techniques employées sont présentées dans les paragraphes suivants.

8.1.1 Techniques de recouvrement des capsules après leur formation

8.1.1.1 Techniques classiques

L'ajout de couche en surface des capsules repose sur la technique du « layer-by-layer » dont le principe est de créer des films multicouches par adsorptions successives de polymères alternativement cationiques et anioniques. Lorsque des polymères de charges opposées sont mis en contact, des liaisons électrostatiques se créent entre les deux polymères, ce qui induit la formation d'un complexe stable. L'alginate étant chargé négativement, la première couche déposée est une couche de polycations [211].

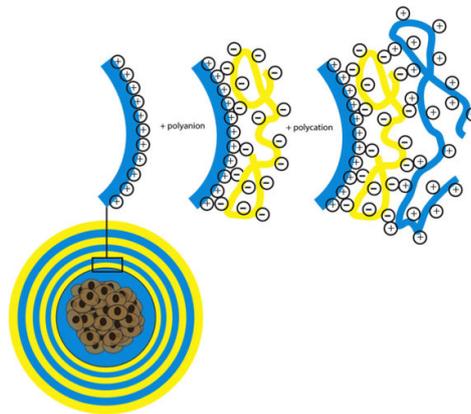


Figure 8-1: Principe du layer-by-layer pour la formation de capsules multicouches contenant des cellules

Plusieurs techniques ont été mises en place pour réaliser un dépôt « layer-by-layer » sur des capsules de polymère :

- La nébullisation ou « spray coating » est une autre méthode permettant le dépôt de couches de polymère sur des capsules par pulvérisation de la solution de polymère sur les capsules. Avec cette technique, il est plus difficile d'obtenir une couche uniforme et de contrôler son épaisseur. Cette technique est donc peu répandue pour l'encapsulation multicouche pour la thérapie cellulaire.
- La méthode de « dip-coating », c'est à dire de dépôt par trempage, est la méthode la plus classiquement utilisée pour la formation de capsules multicouches. Elle consiste à tremper les capsules dans des bains successifs de polymère, séparés par des bains de rinçage. Les étapes de rinçage permettent d'éliminer les excédents de polymère déposé.

La méthode du dip-coating est donc très utilisée pour le dépôt des couches de polymères sur les capsules d'alginate. Après gélification, les capsules sont trempées dans une solution de polycations tels que le PLL, le PLO ou le chitosan qui se lient à l'alginate puis les capsules sont soit transférées dans un bain d'alginate pour former les capsules APA [55], APO [53][54] ou ACA [109][115] (respectivement) soit trempées dans des bains successifs de polyanions (tels que le PSS) et de polycations. **Le type et le nombre de couches déposées permettent d'ajuster la résistance mécanique et la perméabilité des capsules [212].**

Après chaque dépôt de polymère, les capsules sont transférées dans des solutions de rinçage permettant d'éliminer l'excédent de polymère. Les couches déposées sont alors très fines (de l'ordre de quelques nm).

Le dépôt d'une couche de polymère plus épaisse, notamment pour recouvrir efficacement les polycations peu biocompatibles ou les protrusions, est réalisé en introduisant les capsules d'alginate gélifiées et recouvertes de polycations dans une solution d'alginate qui est ensuite incorporée dans le système d'extrusion pour former les capsules multicouches [30].

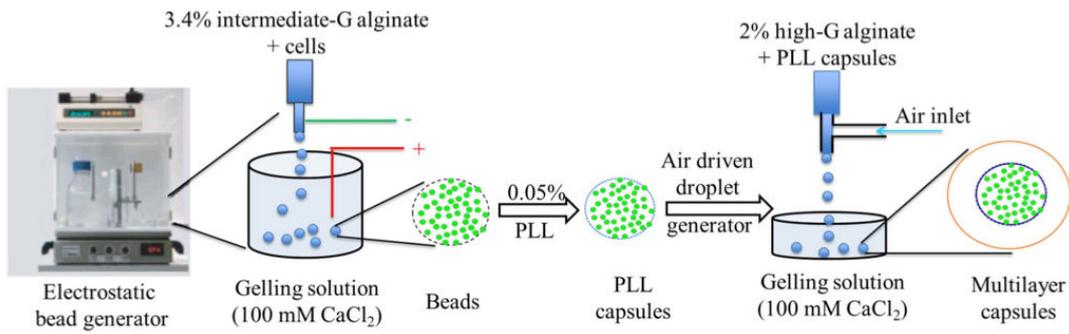


Figure 8-2: Etapes de formation des capsules multicouches [30]

Tout comme dans le cas du transfert des capsules après gélification dans un bain de solution physiologique, les transferts en bains de polymères sont effectués de façon manuelle et sont alors coûteux en temps, dépendant de l'expérimentateur et peuvent introduire des contaminations. Il en résulte que **les dépôts obtenus sont peu reproductibles d'un lot à un autre.**

8.1.1.2 Intégration en microsystèmes et automatisation

De façon à s'affranchir des transferts manuels entre les différents bains de polymère et bains de rinçage et ainsi d'automatiser la procédure, la méthode de « dip-coating » a été intégrée en microfluidique. Plusieurs dispositifs ont été mis en place qui sont basés sur le même principe : un co-écoulement laminaire de solutions de polymère séparées par des solutions de rinçage et l'utilisation soit d'une force extérieure telle qu'un champ magnétique [213], soit de piliers [214], qui permettent de dévier les capsules préalablement formées dans le système d'une solution à l'autre. Outre les avantages liés à l'automatisation, la microfluidique en flux continu permet de contrôler précisément le temps de contact de la capsule avec la solution de polymère en ajustant la longueur du canal contenant le flux de ce polymère. **Cette technique permet donc d'optimiser le temps de contact de façon à obtenir un dépôt uniforme d'épaisseur contrôlée.**

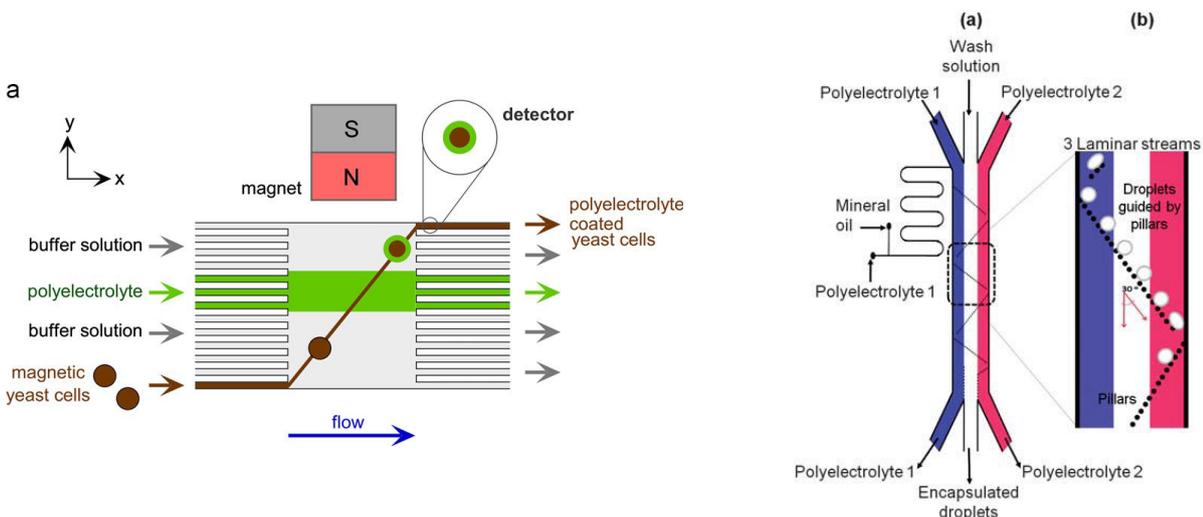


Figure 8-3: Dispositifs de dépôt de polyélectrolytes en microsystèmes (a) déviation des cellules par un champ magnétique [215] (b) déviation des gouttelettes d'huile par des piliers [214]

Dans la littérature, cette méthode n'est pas utilisée pour le dépôt de couches de polymère en surface de billes d'hydrogel.

Dans le laboratoire, cette méthode a été intégrée dans la carte CellEnc (voir Introduction générale) par ajout de polyélectrolyte cationique dans la solution de calcium gélifiante (Figure 8-4). Les capsules formées en flux d'huile sont ainsi transférées grâce au premier transfert de phase en solution de polyélectrolyte puis transférées grâce au second transfert de phase en solution de rinçage. **Ce procédé permet donc la formation de capsule avec une monocouche de polyélectrolyte en surface de façon automatisée et reproductible.** L'analyse des capsules obtenues au microscopie confocale montre que le dépôt est uniforme et d'épaisseur constante (de l'ordre de 5 µm). La preuve de concept du procédé a été réalisée en utilisant du poly(hydrochlorure d'allylamine) (PAH) mais ce système pourrait être utilisé avec tout autre polyélectrolyte cationique. Un module semblable à celui de Katak *et al.* [214] a également été développé et intégré dans la carte CellEnc pour permettre le dépôt bicouche de polymère sur les capsules.

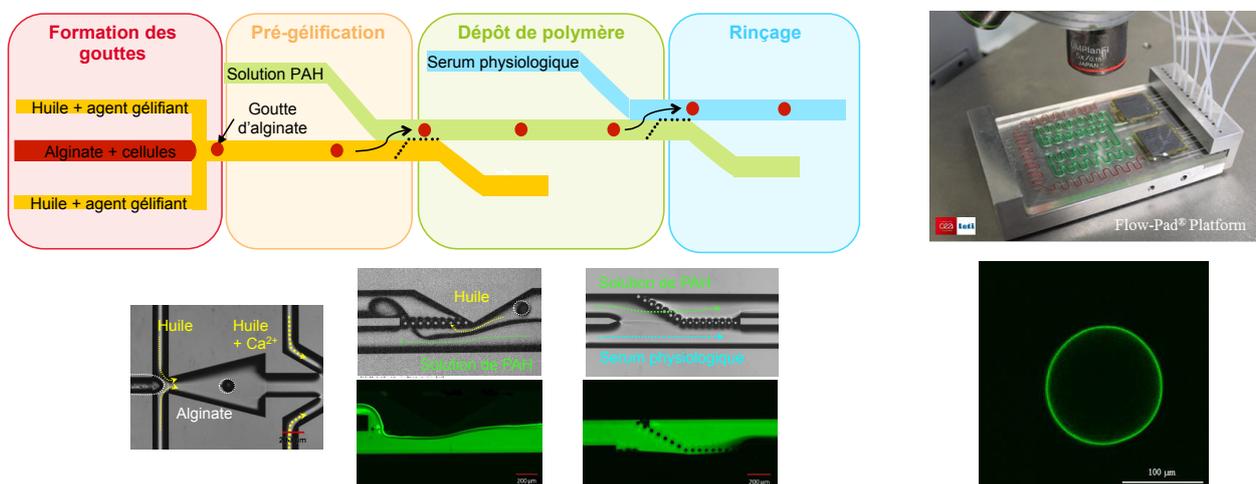


Figure 8-4 : Principe de la carte développée au CEA-Leti pour la formation de capsules d'alginate recouverte de polyélectrolytes, de façon automatisée et reproductible. Les capsules obtenues ont une épaisseur uniforme de polyélectrolytes en surface.

En ce qui concerne le dépôt de couche plus épaisse, le même principe que celui présenté dans le cas de l'extrusion a été utilisé pour les capsules formées en microfluidique [216][217]. Dans un premier temps, des capsules sont formées par un MFFD simple. Ensuite, les capsules obtenues sont suspendues dans une solution puis introduites dans un système formé par deux jonctions MFFD en série, la première pour apporter le fluide servant à former la couche et la deuxième pour former l'émulsion de gouttes contenant les capsules (Figure 8-5).

Ce type de système a notamment été utilisé pour l'encapsulation de cellules dans des capsules multicouches d'alginate [217] ou de gélatine [218] ayant un cœur contenant les cellules et une coque sans cellule. Le système de Yu *et al.* [217] a permis d'obtenir des capsules de 180 µm de diamètre ayant une coque d'alginate de 70 µm. Cependant, au final, 18% des capsules ne contiennent pas de capsules avec cellules et 4% en contiennent deux. **Le contrôle de l'encapsulation et la reproductibilité sont donc faibles.**

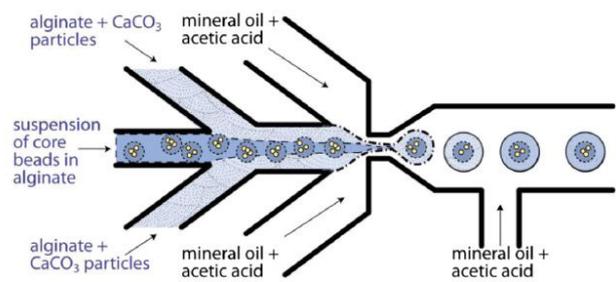
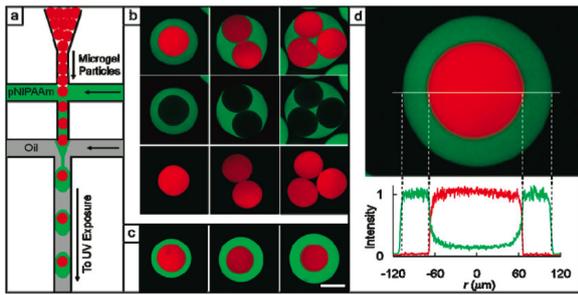


Figure 8-5 : Systèmes microfluidiques d'encapsulation multicouche en 2 étapes : (gauche) système de Seiffert *et al.* [216], (droite) système de Yu *et al.* [217]

8.1.2 Techniques d'encapsulation multicouche lors de la formation

De façon à limiter le nombre d'étapes de fabrication et à augmenter la reproductibilité, l'encapsulation multicouche peut être réalisée directement lors de la formation des capsules. Pour cela, les dispositifs utilisent un co-écoulement laminaire de la solution formant le cœur de la capsule entourée de la solution formant la couche de la capsule. Les gouttes sont formées à partir de ce co-écoulement par les mêmes méthodes que celles présentées dans le cas de la formation de gouttes à partir d'un seul polymère : les techniques classiques d'extrusion à travers une aiguille ou les techniques microfluidiques de formation d'émulsion. Les paragraphes suivants présentent l'état de l'art des dispositifs existants pour ces deux types de techniques.

8.1.2.1 Techniques classiques d'extrusion

Le principe de l'encapsulation multicouche a été intégré dans les systèmes classiques de formation de capsules tels que les systèmes d'extrusion. Ma *et al.* [113] ont développé un système d'extrusion co-axial dans lequel le jet segmenté est un co-écoulement co-axial d'alginate contenant des îlots de Langherans entouré par de l'alginate sans cellules. Dans ce système, la taille du cœur d'alginate contenant les cellules et l'épaisseur de la couche d'alginate sans cellule sont contrôlables en ajustant les débits de chaque fluide. Ce système permet **une encapsulation complète des cellules puisqu'aucune des capsules obtenues ne présente de protrusion cellulaire** alors que sans la couche d'alginate supplémentaire 30% des capsules en possédaient. Cependant, les capsules obtenues ont **une taille importante ($\approx 500 \mu\text{m}$) et semblent polydisperses** (Figure 8-6).

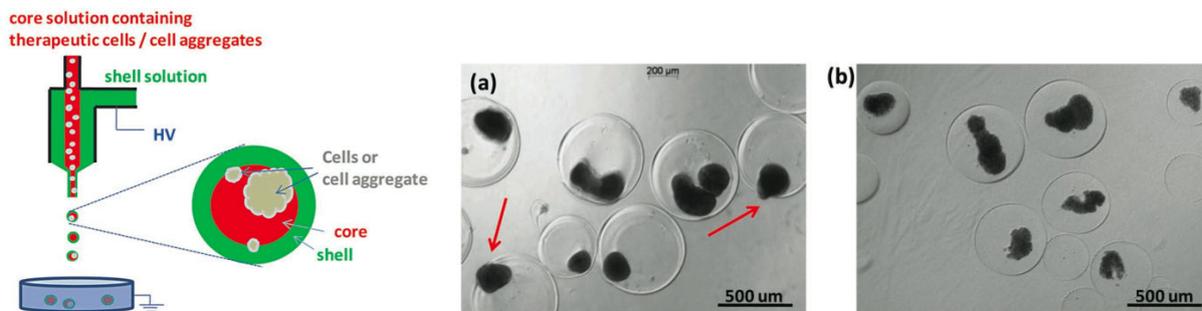


Figure 8-6 : Formation de capsules multicouche par extrusion co-axiale : (a) capsules obtenues par encapsulation simple : 30% des capsules possèdent des protrusions, (b) capsules obtenues par encapsulation multicouche : aucune protrusion observée (Extrait de [113])

8.1.2.2 Techniques microfluidiques

Lorsque ce type de configuration est utilisé en géométrie rectangulaire, le co-écoulement n'est alors plus co-axial mais stratifié. La formation de gouttes à partir d'un tel co-écoulement entraîne alors la formation de particules dites « de Janus », binaires ou ternaires selon le nombre de fluides utilisés (co-écoulement de deux ou trois fluides respectivement) (Figure 8-7). De tels dispositifs sont utilisés pour la formation de particules ayant des propriétés différentes sur chaque face (particules bicolores, amphiphiles, dipolaires et autres).

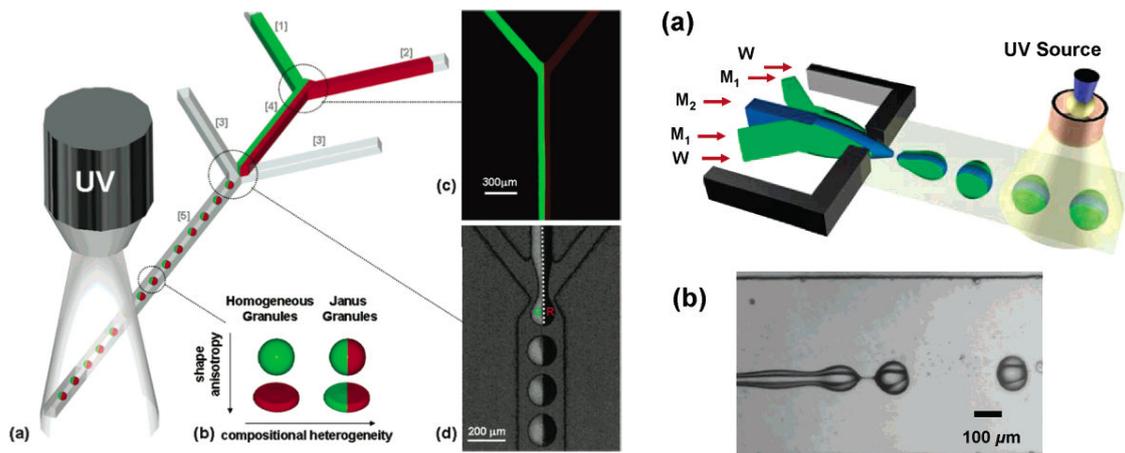


Figure 8-7 : Co-écoulement de polymères en géométrie rectangulaire : formation de particules de Janus binaires [219], particules d'acrylamide contenant des microsphères de silice) et ternaires [220]

Les seuls dispositifs permettant actuellement de former des capsules multicouches en géométrie rectangulaire utilisent des géométries non planaires complexes et seulement deux dispositifs ont été répertoriés dans la littérature.

Kim *et al.* [161] ont développé un système microfluidique permettant la formation de capsules composées d'un cœur d'alginate contenant des cellules et d'une coque d'alginate sans cellule. Ils utilisent également ce dispositif pour la formation de capsules à cœur liquide et coque d'alginate. Le dispositif consiste en une géométrie à focalisation d'écoulement (« *flow focusing* ») formée par un canal central contenant le fluide de cœur et deux canaux périphériques contenant le fluide de coque permettant la création d'un co-écoulement, suivie d'une deuxième géométrie à focalisation d'écoulement permettant de former les gouttes à partir du co-écoulement. Ce dispositif permet d'obtenir un co-écoulement co-axial des deux fluides grâce à l'introduction au niveau de la première jonction d'une sur-épaisseur dans le canal (appelée « *hillock* ») qui permet de centrer le fluide de cœur qui est alors complètement entouré par le fluide de coque. Ce dispositif permet l'obtention de capsules multicouches, avec une épaisseur de couche contrôlée par le rapport des débits des deux fluides.

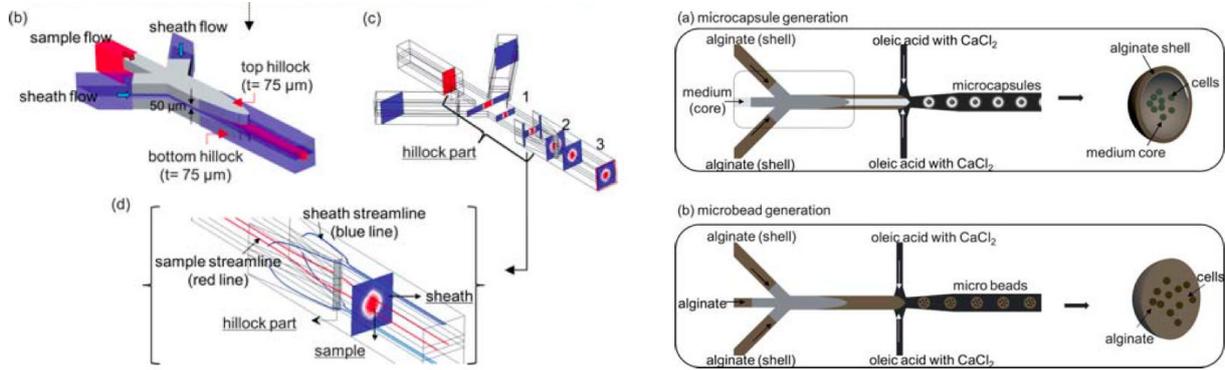


Figure 8-8 : Formation de capsules multicouches dans un système microfluidique à section rectangulaire [161]

Le deuxième dispositif existant a été développé par Agarwal *et al.* [144]. Il consiste en une géométrie « *flow-focusing* » non plane dans laquelle les canaux du polymère de cœur, du polymère de coque et d'huile ont des sections de dimensions croissantes de façon à ce que les flux soient imbriqués les uns dans les autres (Figure 8-9). Ce dispositif est utilisé pour former des capsules contenant un cœur de carboxyméthylcellulose de sodium (CMC) liquide contenant des cellules et une coque d'alginate, dont l'épaisseur dépend du débit de ce fluide.

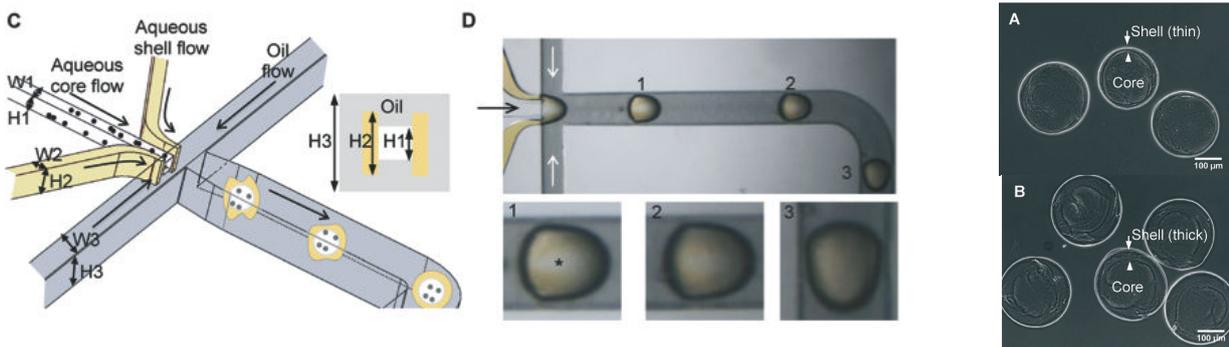


Figure 8-9 : Formation de capsules multicouches dans un système microfluidique à section rectangulaire, non plane [144]

Les dispositifs présentés ci-dessus permettent la **formation de capsules multicouches en microfluidique grâce à l'utilisation de canaux de profondeurs différentes**. Cependant, l'utilisation de telles géométries dites non planes complexifie la fabrication de ces systèmes, notamment par l'ajout d'étapes d'alignement qui doivent être très précises et qui augmentent le coût de fabrication du système.

8.1.3 Conclusions et démarche mise en œuvre

La méthode couramment utilisée d'encapsulation multicouche par dépôt de polymère en surface a été intégrée en microsystèmes permettant ainsi la formation de capsules avec une monocouche ou une bicouche de polymère en surface. Toutefois, l'encapsulation multicouche réalisée directement lors de la formation des gouttes permet une réduction du nombre d'étapes nécessaires à la fabrication de capsules multicouches, et ainsi une réduction du temps et du coût de fabrication. Cependant, les dispositifs actuellement utilisés pour ce type d'encapsulation utilisent soit :

- des techniques classiques de formation de gouttes par extrusion comportant alors les inconvénients présentés au paragraphe 1.3 (taille minimale limitée, polydispersité, viscosité limitée)
- des géométries microfluidiques non planaires nécessitant des étapes de fabrication complexes plus longues et plus coûteuses

Technique de formation des gouttes	Méthode de recouvrement	Matériaux		Application	Intérêts du multicouche	Références
		cœur	coque			
<i>Procédés en deux étapes : Formation des gouttes puis recouvrement</i>						
Extrusion (Potentiel électrostatique)	Dip-coating	Alginate	Alginate		Empêcher les protrusions et augmenter la stabilité	Ehrhart, 2013 [221]
	Dip-coating	Alginate	Chitosan – Alginate (ACA)			Zhang, 2013 [109]
	Dip-coating	Alginate	Chitosan – Alginate (ACA)		Augmenter la stabilité et réduire l'adhésion cellulaire	Zheng, 2014 [115]
	Extrusion du flux contenant les billes Extrusion du flux contenant les billes	Gelatine + cellules Alginate-PLL	Gelatine-Ph Alginate	Encapsulation cellulaire Thérapie cellulaire du diabète	Capsules à cœur liquide Empêcher les protrusions et augmenter la stabilité	Sakai, 2011 [218] Bhujbal, 2014 [30]
Microcanaux (flow focusing)	Emulsification du flux contenant les billes	pNIPAAm	pNIPAAm		Capsule avec coque thermosensible	Seiffert, 2010 [216]
	Emulsification du flux contenant les billes	Alginate + cellules	Alginate	Culture 3D	Empêcher les protrusions	Yu, 2015 [217]
<i>Procédés en une étape : Formation de gouttes à partir d'un co-écoulement</i>						
Extrusion (co-axial electrojetting)	Co-écoulement avant extrusion	Alginate ou Matrigel	Alginate	Thérapie cellulaire du diabète	Empêcher les protrusions	Ma, 2013 [113]
	Co-écoulement avant extrusion	PLGA	Alginate	Délivrance thérapeutique		Choi
Capillaires co-axiaux	(W/O/W emulsions)	PLGA	Alginate	Délivrance de médicament	Contrôler le relargage	Wu, 2013
Microcanaux non planaires	Ecoulement co-axial avant FFD	Alginate + cellules	Alginate		Empêcher les protrusions	Kim, 2011 [161]
		CMC + cellules	Alginate	Culture 3D	Capsules à cœur liquide	Agarwal, 2013 [144]

Tableau 8-1: Récapitulatif de l'état de l'art sur la formation de capsules multicouche

CONFIDENTIEL

8.2 Présentation des expériences

CONFIDENTIEL

8.3 Régime de formation de gouttes multicouches

CONFIDENTIEL

8.4 Confidentiel

CONFIDENTIEL

8.5 Fréquence de production des gouttes multicouches

CONFIDENTIEL

8.6 Caractérisation des capsules multicouches

CONFIDENTIEL

8.7 Conclusions et perspectives

CONFIDENTIEL

8.8 Premiers essais d'encapsulation d'îlots de Langerhans humains

Des premiers essais d'encapsulation d'îlots de Langerhans humains ont été réalisés avec ce système. Ces îlots ont un diamètre variant entre 150 et 400 μm (Figure 2-10).

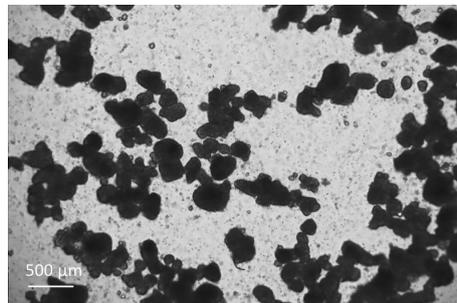


Figure 8-10 : Îlots de Langerhans en milieu de culture

CONFIDENTIEL

La Figure 8-11 présente des capsules contenant un îlot de Langerhans obtenues par ce système. Le diamètre des capsules est d'environ 200 μm . Dans ces capsules, bien que le centrage de l'îlot au sein de la capsule soit variable, l'îlot est bien encapsulé dans l'alginate, il ne touche pas la surface des capsules.

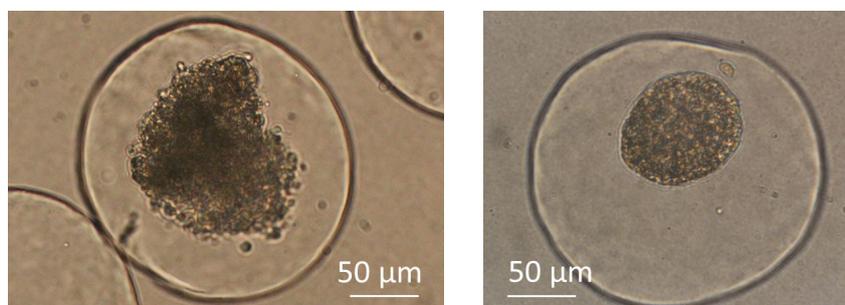


Figure 8-11 : Îlots de Langerhans encapsulés dans des capsules d'alginate. Ces capsules ont été produites avec la géométrie D.

La Figure 8-12 présente quelques capsules obtenues dans les conditions d'encapsulation simple et d'encapsulation multicouche.

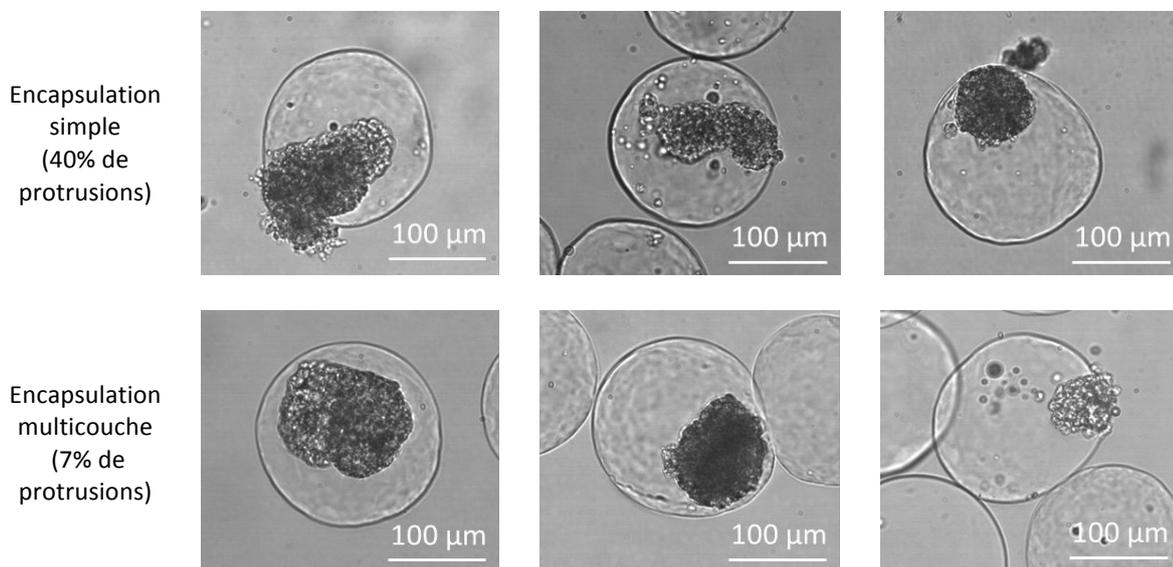


Figure 8-12 : Comparaison de l'encapsulation simple et de l'encapsulation multicouche

Dans le cas de l'encapsulation simple, 7 capsules sur 18 présentent des protrusions soit environ 40%. Dans le cas de l'encapsulation multicouche, sur 97 capsules produites contenant un îlot, seulement 7 présentent des protrusions soit environ 7%. D'autre part, les images semblent montrer que dans le cas de l'encapsulation multicouche, même lorsque l'îlot est complètement décentré et proche de la surface de la capsule, il y a le plus souvent une fine épaisseur d'alginate entre la surface de la capsule et l'îlot. **L'encapsulation multicouche semble donc réduire considérablement le taux de protrusions.**

Ces résultats sont toutefois à prendre avec précaution puisque le pourcentage de protrusions donné dans le cas de l'encapsulation simple a été établi sur un nombre d'îlots encapsulés plus de cinq fois inférieur au nombre d'îlots encapsulés dans la configuration multicouche. D'autre part, les îlots encapsulés sont très polydisperses en taille et les gros îlots sont davantage susceptibles d'entraîner des protrusions. Il serait donc préférable au préalable de trier les îlots en taille et d'effectuer la comparaison entre encapsulation simple et encapsulation multicouche pour une gamme de taille assez restreinte et équivalente dans les deux cas.

Afin de caractériser la répartition de l'alginate périphérique au sein de la capsule lors de la présence d'un îlot, les capsules contenant des îlots de Langerhans ont été analysées au microscope confocal. Les îlots ont été marqués au colorant fluorescent DRAQ5 (marqueur de l'ADN) afin de les visualiser dans le rouge.

CONFIDENTIEL

CONCLUSION GENERALE

Ce travail de thèse s'intègre dans une démarche de caractérisation et de modélisation du fonctionnement général du système microfluidique d'encapsulation de cellules. L'objectif à terme est de pouvoir prédire les variables d'entrée du système afin d'obtenir des capsules répondant à tous les critères requis pour la transplantation d'îlots encapsulés pour la thérapie du diabète (cf. Chapitre 1). Ces critères concernent la taille et la forme des capsules, leur état et chimie de surface, leurs propriétés mécaniques ainsi que la productivité du système. Dans un premier temps, la démarche consiste à étudier l'influence des variables d'entrée du système sur chacune de ces variables de sortie. Ensuite, elle consiste à déterminer pour chacune de ces variables de sortie le point de fonctionnement optimal permettant de répondre aux critères exigés. Cela définit alors des contraintes sur les variables d'entrée. Enfin, la combinaison de ces contraintes permet alors *a priori* de déterminer un point de fonctionnement global optimal.

Dans la première partie de la thèse, l'étude s'est concentrée sur le contrôle de la taille et l'optimisation de la fréquence de production des capsules. Pour cela, nous nous sommes attachés à caractériser la production de gouttes dans un système microfluidique de type MFFD, contrôlé en pression, dans le cas de phases dispersées non-Newtoniennes de forte viscosité (jusqu'à 10 Pa.s). L'étude s'est focalisée sur la détermination de la taille, de la fréquence de production et de la transition *dripping/jetting* en fonction des variables d'entrée du système, à savoir les pressions appliquées à chaque fluide, leurs propriétés physico-chimiques et les dimensions géométriques du système. Pour cela, il a d'abord été mis en place un modèle analytique permettant d'obtenir les débits de chaque fluide en fonction des pressions appliquées (Chapitre 5). Ensuite, ce travail a mené à l'établissement de lois décrivant la taille des gouttes, leur fréquence de production et la transition *dripping/jetting* (Chapitre 6) en fonction de ces débits et des autres variables d'entrée.

En ce qui concerne la taille et la fréquence de production des gouttes, les résultats obtenus permettent de confirmer ceux décrits dans la littérature dans le cas de phases dispersées Newtoniennes de faible viscosité (< 2 Pa.s) et de les étendre au cas de phases dispersées de forte viscosité (jusqu'à 10 Pa.s) et non-Newtoniennes. Les résultats indiquent que la rhéofluidification de la phase dispersée entraîne une diminution de la taille des gouttes et une augmentation de la fréquence de production. L'utilisation de polymères rhéofluidifiants favorise donc la productivité des systèmes de génération de gouttes. Ces résultats ont été divulgués partiellement lors d'une présentation orale à la conférence NanoTech 2016 (Annexe 1) et de la présentation d'un poster au GDR Microfluidique 2016 et à la conférence MicroTas 2016 (Annexe 2).

Pour ce qui est de la transition *dripping/jetting*,

CONFIDENTIEL

Le modèle analytique et les lois empiriques obtenues tout au long de cette partie ont abouti à l'établissement d'un modèle permettant de prédire les variables d'entrée du système afin d'optimiser la fréquence de production de gouttes d'une taille donnée, pour une géométrie donnée (Chapitre 7). La démarche complète a donc été réalisée pour ce point, permettant ainsi de répondre à un des critères exigés.

En ce qui concerne la forme des capsules, celle-ci est déterminée par leur pré-gélification. Grâce au modèle analytique mis en place au cours de cette première partie de thèse (Chapitre 5), il est possible de déterminer la vitesse des capsules dans le canal de pré-gélification et ainsi d'en déduire le temps de pré-gélification. D'autre part, la connaissance des débits permettent également de déterminer la proportion de chacune des huiles dans le canal de co-écoulement et ainsi d'en déduire la quantité d'agent gélifiant circulant dans ce canal. La validation du modèle concernant le temps de pré-gélification et l'épaisseur relative des flux dans le co-écoulement a été réalisé mais n'a pas été présenté dans cette thèse. L'étude de la forme des capsules obtenues en fonction de ces variables ainsi que la détermination du point de fonctionnement optimal en termes de gélification reste encore à mener. L'étude menée dans cette partie est donc une première étape de la démarche concernant l'optimisation de la forme des capsules.

Par ailleurs, le modèle analytique mis en place a conduit au développement d'un rhéomètre microfluidique par génération de gouttes, faisant l'objet d'un brevet (en cours de dépôt). La partie de ce brevet concernant le cas des fluides non-Newtoniens n'a pas été présentée dans ce manuscrit. Ce système s'avère avantageux pour la caractérisation de fluides complexes lorsqu'uniquement un faible volume d'échantillon (< 500 μL) est disponible pour effectuer la mesure. Cela peut être le cas de la caractérisation d'échantillons biologiques tels que des échantillons sanguins ou la caractérisation de polymères utilisés pour des applications biomédicales qui sont de grade pharmaceutique, le plus souvent stériles et alors coûteux.

La deuxième partie de cette thèse a été consacrée à l'optimisation de la surface des capsules. L'étude s'est focalisée sur le développement d'un système microfluidique d'encapsulation multicouche (Chapitre 8). Les capsules de type cœur-couche permettent en effet de réduire les protrusions et d'optimiser indépendamment le polymère au contact des cellules du polymère au contact avec le milieu d'implantation. La preuve de concept a été réalisée sans cellule encapsulée puis des premiers essais d'encapsulation d'îlots de Langerhans humains ont été menés. Le système développé semble permettre de réduire considérablement le taux de protrusions.

L'optimisation de la surface des capsules concerne également la chimie et la rugosité de surface. Concernant ces points, une étude a été menée dans le cadre de cette thèse mais n'a pas abouti, une grande partie du travail de caractérisation et d'optimisation reste à mener. Toutefois, parallèlement au travail présenté dans cette thèse et en collaboration avec deux équipes du CEA/LETI/DTSI, nous avons explorés deux techniques susceptibles d'être utilisées pour mener à bien ces études :

- la spectroscopie de masse à ionisation secondaire temps de vol (ToF-SIMS) pour la caractérisation de la chimie de surface, en collaboration avec l'équipe de J.-P. Barnes.
- la microscopie à force atomique (AFM) pour la caractérisation de la topographie, en collaboration avec l'équipe de N. Chevalier et D. Mariolle

Les expériences de ToF-SIMS ont montré la faisabilité de la caractérisation de la chimie de surface d'éléments sphériques, montrant alors le potentiel de cette technique dans la caractérisation de la chimie de surface des capsules. Les résultats ont été exposés lors de la conférence SIMS Europe 2014 et font également l'objet d'une publication en cours d'écriture.

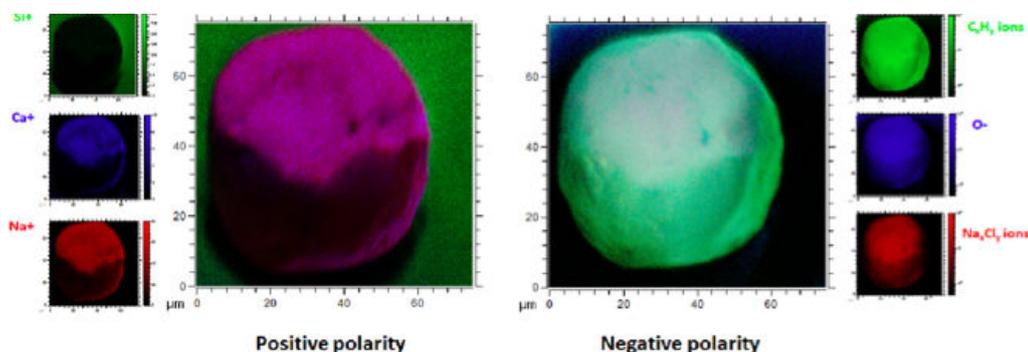


Figure 8-13 : Caractérisation de la chimie de surface de capsule d'alginate par ToF-SIMS

Les expériences d'AFM ont montré la faisabilité de la caractérisation de capsule d'hydrogel (matériau relativement mou comparé aux matériaux typiquement analysés par AFM) en milieu liquide (Figure 8-14). Elles ont également permis de déterminer les conditions opératoires à utiliser pour l'analyse d'échantillons. Cette technique de caractérisation apporte ainsi une méthode pour mener une étude quantitative sur la rugosité de surface des capsules. Cette technique peut également être utilisée pour la caractérisation des propriétés mécaniques de ces capsules.

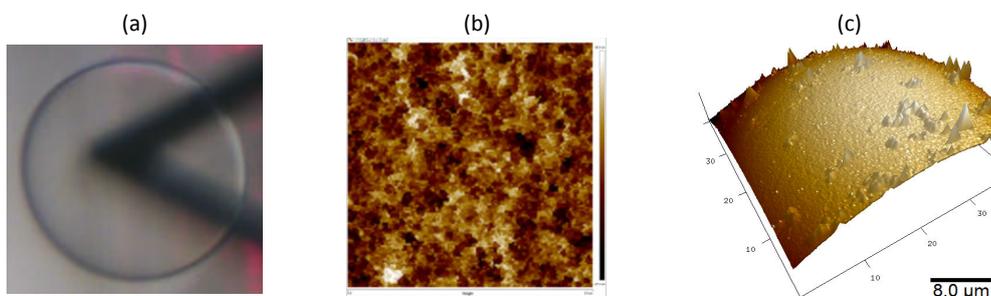


Figure 8-14 : Caractérisation de la topographie de surface par microscopie à force atomique (AFM) en milieu liquide : (a) Positionnement du levier sur la capsule d'alginate à analyser ; (b) Cartographie de la topographie sur une surface de $2\mu\text{m} \times 2\mu\text{m}$; (c) Reconstruction 3D de la topographie.

Ces deux techniques offrent de belles perspectives de caractérisation et permettront d'engager les études à mener sur l'optimisation de la chimie et de l'état de surface des capsules ainsi que de leurs propriétés mécaniques.

Le schéma de la

Figure 8-15 synthétise la démarche générale en mettant en avant les étapes effectuées (partiellement ou entièrement) au cours de cette thèse ainsi que les étapes restantes afin d'aboutir à un modèle complet. Ce travail apporte des briques dans la caractérisation, la modélisation et l'optimisation du

système d'encapsulation. Les travaux vont être poursuivis dans le cadre d'une thèse et de projets de recherche.

L'étude a ici été réalisée dans le cadre de l'encapsulation de cellules pour la thérapie du diabète. Toutefois, les résultats et les développements peuvent s'avérer intéressants pour diverses applications. Le travail concernant l'optimisation de la fréquence de production de gouttes peut être applicable à d'autres systèmes de génération de gouttes nécessitant une forte productivité, comme par exemple les systèmes de criblage à haut débit [227]–[229]. La formation de gouttes ou capsules multicouches en microfluidique peut aussi être utilisée pour la délivrance thérapeutique de médicaments [109] ou encore la culture cellulaire 3D [144].

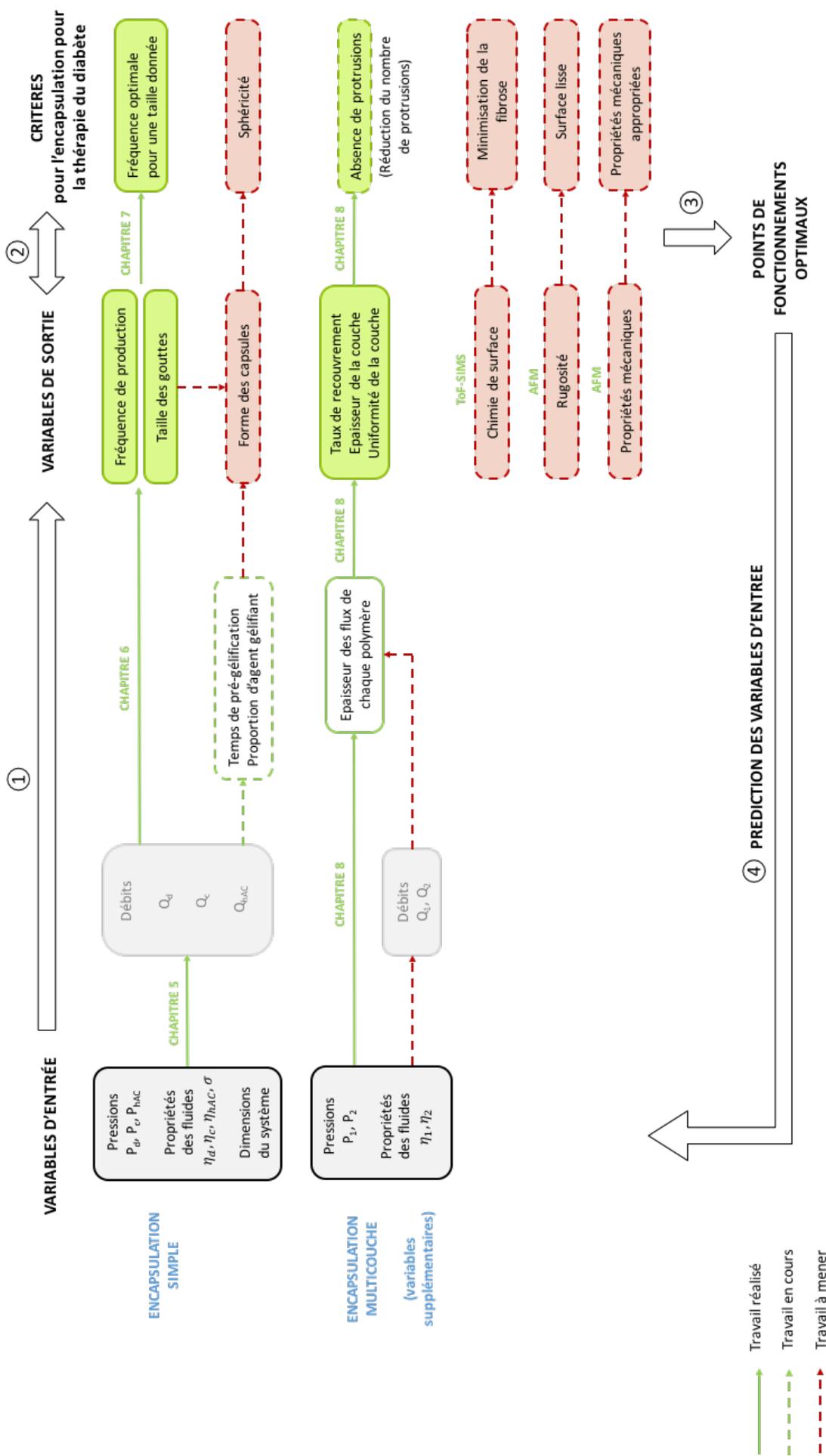


Figure 8-15 : Démarche générale pour l'optimisation du système d'encapsulation de cellules pour la thérapie du diabète : bilan des travaux réalisés, en cours et à mener
 d = phase dispersée (encapsulation simple), 1 = polymère de cœur et 2 = polymère de couche (encapsulation multicouche), c = phase continue, hAC = phase pré-gélfifiante

ANNEXE 1 :
Proceedings NanoTech 2016

Droplet formation of highly viscous newtonian and non-newtonian fluids in a microfluidic flow focusing device : scaling of droplet size and production frequency

C. Authesserre^{*}, F. Bottausci^{*}, G. Costa^{*}, M. Alessio^{*}, P.Y. Benhamou^{**}, B. Icard^{*} and F. Rivera^{*}

^{*}CEA-LETI, MINATEC Campus, 17 avenue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9, France,

^{**}Department of Endocrinology, Grenoble University Hospital, 38043 Grenoble, France

Contacts: claire.authesserre@cea.fr, florence.rivera@cea.fr

ABSTRACT

In this paper, we report for the first time the production of ~200 μm -size monodispersed droplets using highly viscous newtonian and non-newtonian fluids (up to 3.6Pa.s) in a pressure actuated device. Droplet size and production frequency have been characterized regarding flow rates and fluid properties (viscosity of the dispersed phase, interfacial tension, shear-thinning properties) and scaling laws are presented. Shear-thinning behavior results in smaller droplet size and higher production frequency than droplets produced with a newtonian fluid having the same zero-shear rate viscosity.

Keywords: microfluidics, flow-focusing device, droplet, high viscosity, non-newtonian, shear-thinning

1 INTRODUCTION

Polymer particles are largely used for different applications such as chromatography columns, calibration standards, drug delivery or cell encapsulation [1]. For all these applications, high size monodispersity and production frequency are required.

Microfluidics flow focusing devices (MFFD) allows the continuous production of monodispersed droplets. Droplet formation and break-up mechanism in MFFD have been extensively investigated using air or low viscosity newtonian fluids as dispersed phase (<0.1Pa.s) [2–4]. However, for many applications, polymers need to be used at high concentration and are therefore highly viscous and non-newtonian. Only few studies on MFFD report the use of high viscosity newtonian fluids (up to 1.8Pa.s) [1,3]. Non-newtonian behavior have been studied only for Boger fluids (fluids with constant viscosity over shear rate) [5,6].

Here, focusing on the dripping regime, we study the droplet formation of highly viscous (up to 3.6Pa.s) newtonian and non-newtonian polymers to understand the influence of the shear-thinning behavior.

First, rheological behavior of the dispersed phase solutions is investigated. Then, results on droplet volume and production frequency are presented with the obtained scaling laws.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Microfluidic chip design and fabrication

A flow focusing design previously described [7] was used to produce droplets. Microfluidic chips were made of poly(dimethylsiloxane) (PDMS) using molds produced with common soft-lithography techniques. Chips were bonded on a glass slide using plasma O_2 treatment and then silanized to make hydrophobic channels. The channel height is $h=200\mu\text{m}$ and the channel width is $w=200\mu\text{m}$.

2.2 Solutions and fluid characterization

Alginate and Ficoll® solutions were used as the dispersed phase (d). Alginate (Pronova SLG100, NovaMatrix) was prepared in deionized water containing 150mM NaCl and 25mM HEPES (pH=7.4) at concentration ranging from 1 to 3%wt/wt. Ficoll® (PM400, F8016, Sigma) was diluted in deionized water at concentration ranging from 0.5 to 1.2g/mL. Viscosity (η_d) and non-newtonian behavior of these solutions were characterized on a rheometer (Bohlin Gemini, Malvern) using a cone/plate geometry with a cone 1/60 (60mm in diameter, cone angle of 1°) and a plate equipped with a temperature control unit. Results are presented in section 3.

Super-refined soybean oil (Croda) was used as the continuous phase (c). The viscosity of this newtonian fluid is $\eta_c=52\text{mPa.s}$ (Brookfield DVII+ Pro). Interfacial tension (σ) between the dispersed phase and the continuous phase was tuned adding Span80 (S6760, Sigma) to soybean oil. Interfacial tensions were respectively $\sigma=21.1, 16.2, 14.2$ and 8.3mN/m for 0, 0.15, 0.24, 0.35%v/v Span80 (Krüss DSA100).

All measurements were carried out at 22.5°C (room temperature).

2.3 Experimental setup

Fluids were motioned by regulated driving pressures delivered by micropumps (MFCS-8C 0-1000mbar, Fluigent). Experiments were visualized under a microscope (Olympus AX70, objective 5x) and image sequences were acquired using a high speed camera (Mikrotron GmbH, MotionBlitz Eosens), up to 1600 fps.

2.4 Flow characterization

Volumetric flow rate of the continuous phase (Q_c) was calculated using an analytical model of the microfluidic system, previously validated using experimental data (data not shown). Volumetric flow rate of the dispersed phase (Q_d) was determined doing the product of the production frequency f and the droplet volume V . In all experiments presented in this paper, Q_c was kept constant ($Q_c=2.45\text{mL/h}$) and Q_d ranged from 0mL/h to the maximal flow rate before jetting regime occurs.

2.5 Droplet characterization

Droplet diameter (D) was measured using ImageJ software. For $D < h$, the droplet volume (V) was calculated as $V=(4/3)\pi(D/2)^3$. For $D > h$, the flattening of the droplet is taken into account and its volume was approximated using Nieu's expression [2].

Droplet production frequency (f) was calculated using the number of images separating the break-up of two consecutive droplets and the frame rate of the camera.

3 DISPERSED PHASE RHEOLOGY

Viscosity and shear-thinning behavior of the dispersed phase were characterized (Table 1). Figure 1 shows that Ficoll® viscosity is quasi-constant over shear rate whereas alginate viscosity decreases when the shear rate increases, showing a shear-thinning behavior.

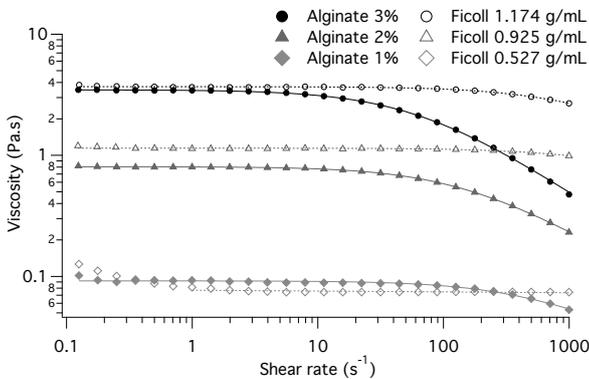


Figure 1: Viscosity of alginate and Ficoll® solutions versus shear rate. Markers correspond to experimental data and lines correspond to the Carreau-Yasuda model.

Different models have been proposed to describe the shear-thinning behavior of polymers. Here, data fitting is performed using the Carreau-Yasuda model in which fluids behave as a newtonian fluid at low shear rate ($\dot{\gamma} \ll 1/\tau$) and as a power-law fluid at high shear rate ($\dot{\gamma} \gg 1/\tau$). In this model, the viscosity follows the law:

$$\eta(\dot{\gamma}) = \eta_0 \left[1 + (\tau\dot{\gamma})^a \right]^{\frac{1-n}{a}} \quad (1)$$

where η is the apparent viscosity, η_0 is the zero-shear rate viscosity, $\dot{\gamma}$ is the shear rate, τ is the relaxation time that sets the cross-over shear rate (λ), a is a constant that sets the size and shape of the cross-over region ($a=1$) and n is a dimensionless constant that characterizes the shear-thinning degree ($n=1$ for newtonian fluids and $0 < n < 1$ for shear-thinning fluids).

Dispersed phase (d)	η_{0d} (mPa.s)	τ (s)	$\lambda=1/\tau$ (s ⁻¹)	n
Alginate 3% wt/wt	3480	0.0162	62	0.32
Alginate 2% wt/wt	806	0.0075	133	0.42
Alginate 1% wt/wt	92	0.0024	417	0.57
Ficoll® 1.174 g/mL	3693	0.0013	769	0.63
Ficoll® 0.925 g/mL	1147	0.0012	833	0.82
Ficoll® 0.527 g/mL	78	-	-	0.99

Table 1: Rheological properties of alginate and Ficoll® solutions. η_{0d} is the viscosity at zero-shear rate, τ is the characteristic relaxation time and n is a constant that characterizes the degree of shear-thinning.

While increasing polymer concentration, one can note that shear-thinning behavior increases (n decreases) and the cross-over shear rate decreases. For shear rates and concentrations used, alginate is non-newtonian ($n < 0.6$) whereas Ficoll® exhibits only a slight shear-thinning behavior for the highest concentration. The constant n and the cross-over shear rate λ are significantly lower for alginate than for Ficoll®, suggesting that this latter is a good candidate to study the influence of shear-thinning behavior on droplet formation of highly viscous fluids.

4 DROPLET SIZE VS FLOW RATE RATIO

Figure 2 and Figure 3 show that droplet volume scales with the flow rate ratio as a power law. Moreover, at a fixed Q_d/Q_c , droplet volume increases when dispersed phase viscosity or interfacial tension increases (see section 6).

Figure 2 shows two distinct domains. The change occurs at a critical volume $V_{cr}=8.2 \times 10^{-11} \text{m}^3$ ($Q_d/Q_c \approx 0.3$) corresponding to $D=250\mu\text{m}$, the nozzle width. For $D > 250\mu\text{m}$, droplet volume seems to be linearly proportional to Q_d/Q_c ($\alpha=1$). This is in accordance with results from Garstecki *et al.* [8] for air droplet in oil, meaning that in this domain droplet formation probably results from a geometry-controlled breakup mechanism. For $D < 250\mu\text{m}$, droplet volume scales with Q_d/Q_c as a power law with a power $0 < \alpha < 0.5$ (see equation 2) depending on η_d (see inset in Figure 2). This suggests a shear-rate-controlled breakup mechanism. When η_d increases, the dependence of the volume on the flow rate ratio becomes weaker. Results show that such type of dependency, previously described for low viscosity newtonian fluids [2,9], can also be applied for highly viscous newtonian and non-newtonian fluids.

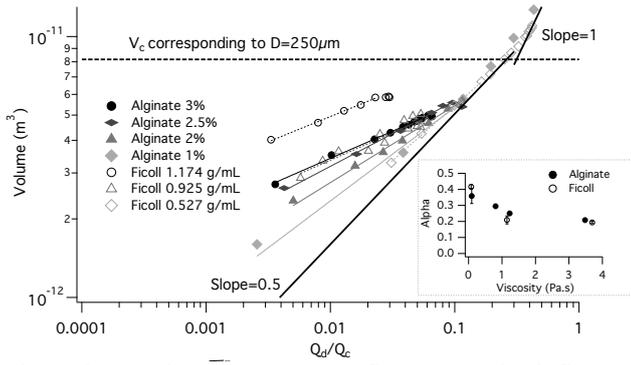


Figure 2: Droplet volume versus flow rate ratio: influence of the dispersed phase viscosity. σ is kept constant at $\sigma=21.1\text{mN/m}$ using pure soybean oil as the continuous phase.

Figure 3 also shows two distinct domains. For $Q_d/Q_c < 0.02$, σ significantly influences the droplet volume, suggesting a capillary-controlled breakup mechanism. The coefficient of the power law V_0 (see equation 2) is influenced by σ (see inset in Figure 3). For $Q_d/Q_c > 0.02$, it seems that droplet volume is less influenced by σ . This could be explained by the fact that for these flow rate ratios, shear stresses increase and become more important than interfacial tension, in accordance with the shear-rate controlled domain in Figure 2.

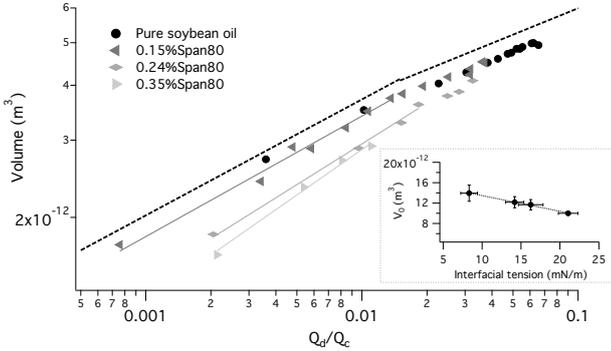


Figure 3: Droplet volume versus flow rate ratio: influence of interfacial tension. η_d is kept constant using 3%wt/wt alginate as the dispersed phase.

To summarize, we find that when flow rate ratio increases, droplet breakup is progressively controlled by the interfacial tension ($Q_d/Q_c < 0.02$), the shear stress ($0.02 < Q_d/Q_c < 0.3$) and then the geometry of the MFFD ($Q_d/Q_c > 0.3$). Moreover, we find that droplet volume follows the relation:

$$V \propto V_0 \left(\frac{Q_d}{Q_c} \right)^\alpha \quad (2)$$

where $V_0(\sigma)$ and $0 < \alpha(\eta_d) < 0.5$ for $Q_d/Q_c < 0.3$ and $\alpha \approx 1$ for $Q_d/Q_c > 0.3$.

5 DROPLET PRODUCTION FREQUENCY VS FLOW RATE RATIO

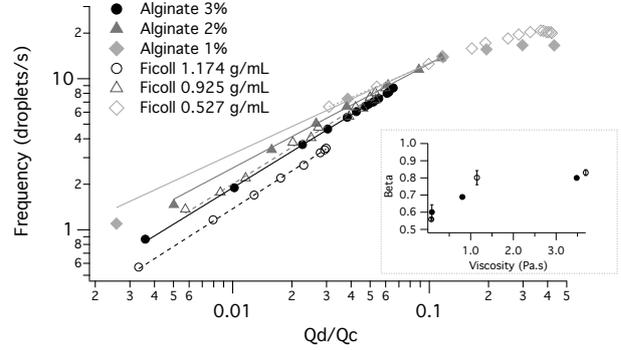


Figure 4: Droplet production frequency versus flow rate ratio: influence of the dispersed phase viscosity. σ is kept constant at $\sigma=21.1\text{mN/m}$ using pure soybean oil as the continuous phase.

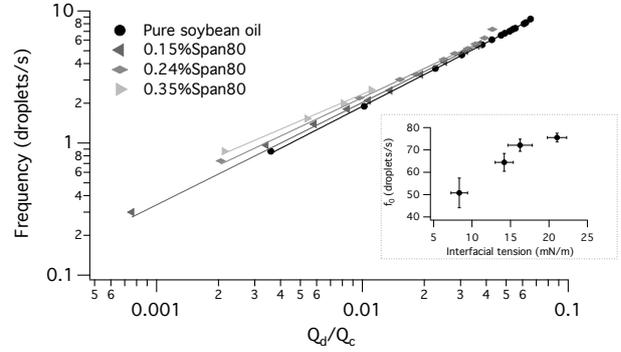


Figure 5: Droplet production frequency versus flow rate ratio: influence of the interfacial tension. η_d is kept constant using 3%wt/wt alginate as the dispersed phase.

Figure 4 shows that when the flow rate ratio increases, droplet frequency increases until a critical flow rate ratio $Q_d/Q_c=0.2$ where droplet frequency becomes constant. This is in accordance with the two domains observed in Figure 2. When $Q_d/Q_c > 0.2-0.3$, as droplet volume rapidly increases with Q_d/Q_c , frequency stops increasing to satisfy mass conservation during breakup. For $Q_d/Q_c < 0.2$, droplet production frequency scales with the flow rate ratio as a power law, with a power $0.5 < \beta < 1$ depending on viscosity (see inset in Figure 4). Figure 5 shows that σ slightly influences the production frequency. That is the coefficient of the power law f_0 (see equation 3) which is influenced by σ (see inset in Figure 5). At fixed Q_d/Q_c , frequency increases when η_{0d} and σ decrease (see section 6).

To summarize, we find that droplet volume follows the relation:

$$f \propto f_0 \left(\frac{Q_d}{Q_c} \right)^\beta \quad (3)$$

where $f_0(\sigma)$ and $0.5 < \beta(\eta_d) < 1$

6 INFLUENCE OF FLUID PROPERTIES AT FIXED FLOW RATE RATIO

At fixed Q_d/Q_c , droplet volume and production frequency respectively increases and decreases when η_{0d} increases (see Figure 6). Moreover, for same η_{0d} , alginate droplets are smaller than Ficoll droplets and are produced with a higher frequency. This means that alginate has a lower apparent viscosity than Ficoll during droplet formation. The volume and frequency differences between alginate and Ficoll increase when η_{0d} increases. This is in accordance with the shear-thinning behavior of alginate and the results presented in section 3 where it has been shown that the difference in shear-thinning degree between alginate and Ficoll increases with increasing η_{0d} . We show here that the shear-thinning behavior of the polymers therefore facilitates the droplet formation of highly viscous fluids.

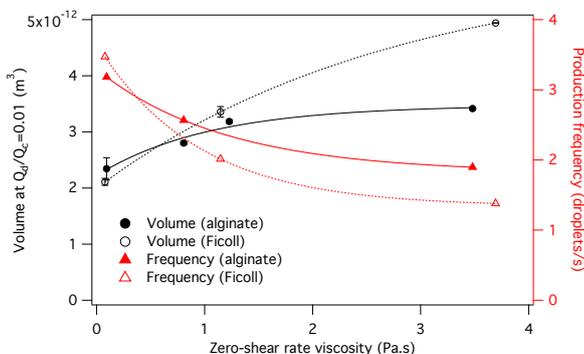


Figure 6: Influence of fluid properties on droplet volume and production frequency at $Q_d/Q_c=0.01$

At fixed Q_d/Q_c , droplet volume and production frequency respectively increases and decreases when σ increases (Figure 7). For a given dispersed phase and flow rate ratio, droplet production frequency can therefore be maximized using a low interfacial tension between the dispersed phase and the continuous phase.

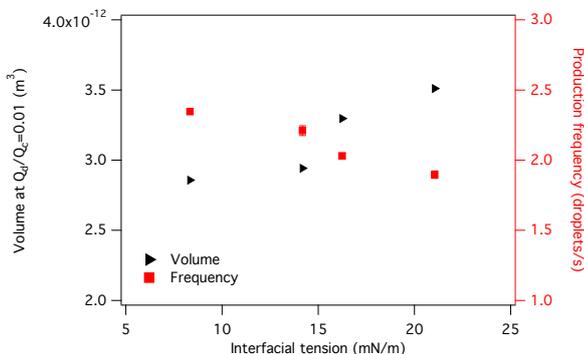


Figure 7: Influence of interfacial tension on droplet volume and production frequency at $Q_d/Q_c=0.01$

7 CONCLUSION

In this paper, we characterize for the first time the droplet formation of both newtonian and non-newtonian polymers with a viscosity up to 3.6 Pa.s, showing that shear-thinning behavior results in smaller droplet size and higher production frequency.

The defined scaling laws will be helpful for the future development of microfluidic droplet generation systems, in particular to optimize the production frequency.

REFERENCES

- [1] Z. Nie, S. Xu, M. Seo, P. C. Lewis, and E. Kumacheva, "Polymer particles with various shapes and morphologies produced in continuous microfluidic reactors," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, no. 22, pp. 8058–8063, 2005.
- [2] Z. Nie, M. Seo, S. Xu, P. C. Lewis, M. Mok, E. Kumacheva, G. M. Whitesides, P. Garstecki, and H. a. Stone, "Emulsification in a microfluidic flow-focusing device: Effect of the viscosities of the liquids," *Microfluid. Nanofluidics*, vol. 5, pp. 585–594, 2008.
- [3] T. Cubaud and T. G. Mason, "Capillary threads and viscous droplets in square microchannels," *Phys. Fluids*, vol. 20, no. 5, 2008.
- [4] W. Lee, L. M. Walker, and S. L. Anna, "Role of geometry and fluid properties in droplet and thread formation processes in planar flow focusing," *Phys. Fluids*, vol. 21, no. 2009, 2009.
- [5] B. Steinhaus, A. Q. Shen, and R. Sureshkumar, "Dynamics of viscoelastic fluid filaments in microfluidic devices," *Phys. Fluids*, vol. 19, no. 7, 2007.
- [6] P. E. Arratia, J. P. Gollub, and D. J. Durian, "Polymeric filament thinning and breakup in microchannels," *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.*, vol. 77, pp. 1–6, 2008.
- [7] J. Berthier, S. Le Vot, P. Tiquet, N. David, D. Lauro, P. Y. Benhamou, and F. Rivera, "Highly viscous fluids in pressure actuated flow focusing devices," *Sensors Actuators A Phys.*, vol. 158, no. 1, pp. 140–148, Mar. 2010.
- [8] P. Garstecki, H. a. Stone, and G. M. Whitesides, "Mechanism for flow-rate controlled breakup in confined geometries: A route to monodisperse emulsions," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 94, no. April, pp. 1–4, 2005.
- [9] T. Ward, M. Faivre, M. Abkarian, and H. a. Stone, "Microfluidic flow focusing: Drop size and scaling in pressure versus flow-rate-driven pumping," *Electrophoresis*, vol. 26, no. 19, pp. 3716–3724, 2005.

ANNEXE 2 :
Proceedings MicroTas 2016

SCALING OF HIGHLY VISCOUS NON-NEWTONIAN DROPLET FORMATION IN A MICROFLUIDIC FLOW FOCUSING DEVICE

C. Authesserre^{1,2}, F. Bottausci^{1,2}, G. Costa^{1,2}, M. Alessio^{1,2}, P.-Y. Benhamou^{1,3},
B. Icard^{1,2}, and F. Rivera^{1,2}

¹Univ. Grenoble Alpes, F-38000 Grenoble FRANCE, ²CEA LETI Minatec Campus, F-38054 Grenoble FRANCE, ³Grenoble University Hospital, 38043 Grenoble FRANCE

ABSTRACT

In this paper, we report for the first time the study of droplet formation using highly viscous non-Newtonian fluids (up to 3.7 Pa.s) in a pressure actuated microfluidic flow focusing device (MFFD). Droplet size, production frequency and dripping to jetting transition have been characterized regarding flow rates and fluid properties (viscosity and shear-thinning behavior of the dispersed phase) and scaling laws are presented.

KEYWORDS: Microfluidics, flow-focusing device, droplet, non-newtonian

INTRODUCTION

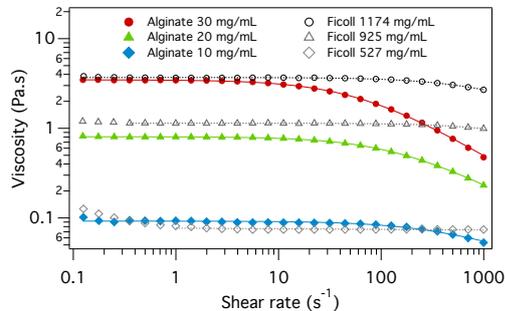
Droplet based microfluidic systems are widely used to encapsulate chemicals or cells for applications such as drug delivery or cell therapy. Droplet formation in MFFD have been extensively investigated using air or low viscosity Newtonian fluids as dispersed phase (<0.5 Pa.s) [1-3]. However, for most of these applications, polymers used are highly viscous and non-Newtonian. Here, we study for the first time droplet formation for highly viscous non-Newtonian fluids.

EXPERIMENTAL

Droplet were produced using a MFFD previously described (channels height $h=200\ \mu\text{m}$ and width $w=200\ \mu\text{m}$) [4]. Alginate (Pronova SLG100, NovaMatrix) and Ficoll® (PM400, Sigma) solutions were used as the dispersed phase (d). Viscosity (η_d) and non-newtonian behavior of these solutions were characterized on a rheometer (Bohlin Gemini, Malvern). Super-refined soybean oil (Croda, $\eta_c=52\ \text{mPa.s}$) was used as the continuous phase (c).

Fluids were motioned by regulated driving pressures delivered by micropumps (MFCS, Fluigent). Continuous phase flow rate (Q_c) was calculated using an analytical model of the microfluidic system. Dispersed phase flow rate (Q_d) was determined doing the product of the production frequency f and the droplet volume V . Droplet diameter (D) was measured using ImageJ software. For $D < h$, $V=(4/3)\pi(D/2)^3$. For $D > h$, flattening of the droplet was taken into account and its volume was approximated using Nie's expression [1].

RESULTS AND DISCUSSION



Solutions	η_{0d} (Pa.s)	τ (ms)	n
Alginate 30 mg/mL	3.48	16.2	0.32
Alginate 20 mg/mL	0.81	7.5	0.42
Alginate 10 mg/mL	0.09	2.4	0.57
Ficoll 1174 mg/mL	3.69	1.3	0.63
Ficoll 925 mg/mL	1.15	1.2	0.82
Ficoll 525 mg/mL	0.08	-	0.99

Figure 1: Rheological properties of the dispersed phases. Curves were fitted with Carreau-Yasuda model (η_{0d} : zero-shear rate viscosity; τ : relaxation time; n : shear-thinning degree).

Rheological measurements show that all solutions exhibit a non-Newtonian shear-thinning behavior with zero-shear rate viscosity (η_{0d}) ranging from 80 mPa.s to 3.7 Pa.s. Alginate has a significantly higher shear-thinning behavior than Ficoll. Thus, these solutions allow to study the

influence of viscosity and shear-thinning behavior on droplet formation in the case of highly viscous non-Newtonian fluids.

Droplets were produced for various Q_d and Q_c . For each solution, droplet volumes V collapse on a single master curve when plotted as a function of the product of the flow rate ratio Q_c/Q_d and the continuous phase capillary number Ca_c (Figure 2). V scales this product as a power law (1) with exponent α depending on η_d (Figure 2 inset). At fixed Q_c and Q_d (Figure 3), when η_{0d} increases, V increases and f decreases. Higher shear-thinning behavior results in smaller droplets produced with a higher frequency.

$$V \sim \left(\frac{Q_c}{Q_d} Ca_c \right)^\alpha \text{ with } -0.5 < \alpha(\eta_{0d}) < 0 \quad (1)$$

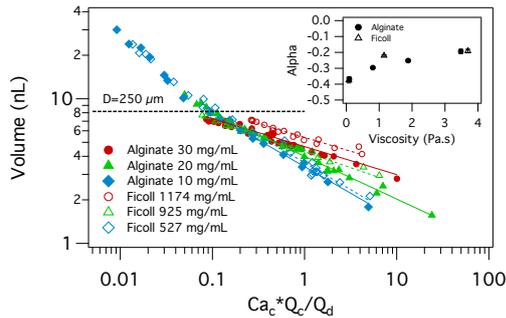


Figure 2: Scaling of droplet size

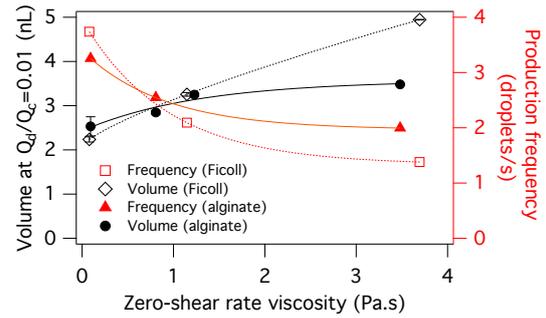


Figure 3: Influence on dispersed phase viscosity and shear-thinning on droplet size and frequency

As f is such as $Q_d = f * V$, equation (1) also allows to scale f . At fixed Q_c , f increases when Q_d increases until jetting occurs [4]. We found that maximal frequency increases when Ca_c increases or η_d decreases (Figure 4). We also found that dripping to jetting transition is determined by a critical flow rate ratio above which jetting occurs. This latter decreases when Ca_c or η_d increases (Figure 5).

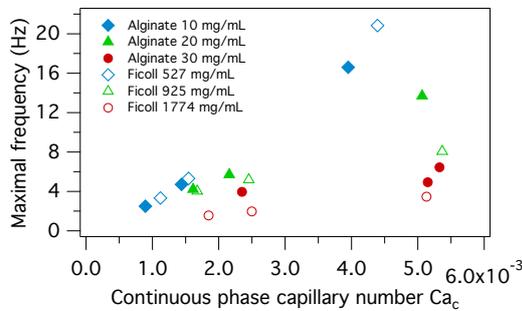


Figure 4: Maximal production frequency

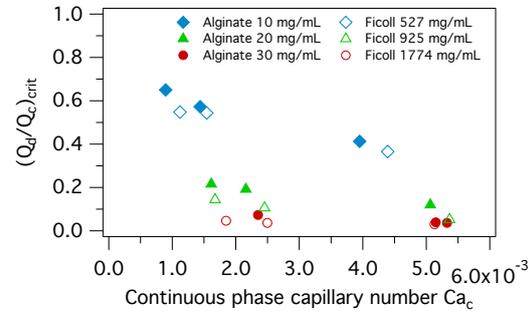


Figure 5: Dripping to jetting transition

CONCLUSION

In this paper, we show for the first time scaling laws for droplet formation in the case of highly viscous non-Newtonian fluids. These laws will be helpful for the design of microfluidic droplet generation systems, in particular to optimize production frequency.

REFERENCES

- [1] Z. Nie *et al.*, *Microfluid. Nanofluidics*, vol. 5, pp. 585–594, 2008.
- [2] W. Lee, L. M. Walker, and S. L. Anna, *Phys. Fluids*, vol. 21, no. 2009, 2009.
- [3] T. Cubaud and T. G. Mason, *Phys. Fluids*, vol. 20, no. 5, 2008.
- [4] C. Authesserre *et al.*, *NanoTech Conference Technical Proceedings 2016*

CONTACT

* F. Rivera; phone: +33 438 782 654; florence.rivera@cea.fr

REFERENCES

- [1] S. Le Vot, "Microsystème pour l'encapsulation de cellules pancréatiques," 2009.
- [2] P. Dalle, "Système intégré pour l'encapsulation multicouche de cellules," 2012.
- [3] H. Zhang, E. Tumarkin, R. M. a. Sullan, G. C. Walker, and E. Kumacheva, "Exploring Microfluidic Routes to Microgels of Biological Polymers," *Macromol. Rapid Commun.*, vol. 28, no. 5, pp. 527–538, Mar. 2007.
- [4] P.-Y. Benhamou, S. Lablanche, P. Dalle, F. Rivera, M.-J. Richard, and S. Halimi, "Thérapie cellulaire du diabète de type 1 : un pancréas bio-artificiel, sinon rien ?," *Médecine des Mal. Métaboliques*, vol. 6, no. 5, pp. 397–402, 2012.
- [5] A. J. Shapiro, J. R. Lakey, E. A. Ryan, G. S. Korbitt, E. Toth, G. L. Warnock, M. Norman, M. D. Kneteman, and R. V Rajotte, "Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen," *N. Engl. J. Med.*, vol. 343, no. 4, pp. 230–238, 2000.
- [6] F. B. Barton, M. R. Rickels, R. Alejandro, B. J. Hering, S. Wease, B. Naziruddin, J. Oberholzer, J. S. Odorico, M. R. Garfinkel, M. Levy, F. Pattou, T. Berney, A. Secchi, S. Messinger, P. a. Senior, P. Maffi, A. Posselt, P. G. Stock, D. B. Kaufman, X. Luo, F. Kandeel, E. Cagliero, N. a. Turgeon, P. Witkowski, A. Naji, P. J. O'Connell, C. Greenbaum, Y. C. Kudva, K. L. Brayman, M. J. Aull, C. Larsen, T. W. H. Kay, L. a. Fernandez, M. C. Vantyghem, M. Bellin, and a. M. J. Shapiro, "Improvement in outcomes of clinical islet transplantation: 1999-2010," *Diabetes Care*, vol. 35, no. 7, pp. 1436–1445, 2012.
- [7] C. I. T. R. (CTIR), "Eighth annual report," 2014.
- [8] M. D. Bellin, F. B. Barton, a. Heitman, J. V. Harmon, R. Kandaswamy, a. N. Balamurugan, D. E. R. Sutherland, R. Alejandro, and B. J. Hering, "Potent induction immunotherapy promotes long-term insulin independence after islet transplantation in type 1 diabetes," *Am. J. Transplant.*, vol. 12, no. 6, pp. 1576–1583, 2012.
- [9] P. Y. Benhamou, J. Oberholzer, C. Toso, L. Kessler, a Penfornis, F. Bayle, C. Thivolet, X. Martin, F. Ris, L. Badet, C. Colin, and P. Morel, "Human islet transplantation network for the treatment of Type I diabetes: first data from the Swiss-French GRAGIL consortium (1999-2000). Groupe de Recherche Rhin Rhône Alpes Genève pour la transplantation d'Ilots de Langerhans.," *Diabetologia*, vol. 44, no. 7, pp. 859–864, 2001.
- [10] S. Lablanche, S. Borot, A. Wojtuszczyzn, F. Bayle, R. Tétaz, L. Badet, C. Thivolet, E. Morelon, L. Frimat, A. Penfornis, L. Kessler, C. Brault, C. Colin, I. Tauveron, D. Bosco, T. Berney, and P.-Y. Benhamou, "Five-years metabolic, functional and safety results of patients with type 1 diabetes transplanted with allogenic islets within the Swiss-French GRAGIL network," *Diabetes Care*, 2015.
- [11] A. Bruni, B. Gala-Lopez, A. R. Pepper, N. S. Abualhassan, and a. M. James Shapiro, "Islet cell transplantation for the treatment of type 1 diabetes: Recent advances and future challenges," *Diabetes, Metab. Syndr. Obes. Targets Ther.*, vol. 7, pp. 211–223, 2014.
- [12] P. Y. Benhamou, L. Milliat-Guittard, a. Wojtuszczyzn, L. Kessler, C. Toso, R. Baertschiger, I. Debaty, L. Badet, a. Penfornis, C. Thivolet, E. Renard, F. Bayle, P. Morel, E. Morelon, C. Colin, and T. Berney, "Quality of life after islet transplantation: Data from the GRAGIL 1 and 2 trials," *Diabet. Med.*, vol. 26, no. 6, pp. 617–621, 2009.
- [13] C. B. Leitão, T. Tharavanij, P. Cure, A. Pileggi, D. a. Baidal, C. Ricordi, and R. Alejandro, "Restoration of hypoglycemia awareness after islet transplantation," *Diabetes Care*, vol. 31, no. 11, pp. 2113–2115, 2008.

- [14] Y. D. Muller, E. M. Gutzwiller, F. Negro, C. Wandrey, A. Sgroi, P. Morel, and L. H. Bühler, "Transplantation cellulaire : traitements actuels et perspectives d'avenir," pp. 1350–1355, 2014.
- [15] R. W. G. Gruessner and A. C. Gruessner, "The current state of pancreas transplantation.," *Nat. Rev. Endocrinol.*, vol. 9, no. 9, pp. 555–62, 2013.
- [16] D. T. Hatzivramidis, T. M. Karatzas, and G. P. Chrousos, "Pancreatic islet cell transplantation: An update," *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 41, no. 3, pp. 469–476, 2013.
- [17] R. Krishnan, M. Alexander, L. Robles, C. E. Foster, and J. R. T. Lakey, "Islet and Stem Cell Encapsulation for Clinical Transplantation," *Rev. Diabet. Stud.*, vol. 11, no. 1, pp. 84–101, 2014.
- [18] a M. J. Shapiro, C. Ricordi, B. J. Hering, H. Auchincloss, R. Lindblad, R. P. Robertson, A. Secchi, M. D. Brendel, T. Berney, D. C. Brennan, E. Cagliero, R. Alejandro, E. a Ryan, B. DiMercurio, P. Morel, K. S. Polonsky, J.-A. Reems, R. G. Bretzel, F. Bertuzzi, T. Froud, R. Kandaswamy, D. E. R. Sutherland, G. Eisenbarth, M. Segal, J. Preiksaitis, G. S. Korbutt, F. B. Barton, L. Viviano, V. Seyfert-Margolis, J. Bluestone, and J. R. T. Lakey, "International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 355, no. 13, pp. 1318–1330, 2006.
- [19] W. Bennet, B. Sundberg, C. G. Groth, M. D. Brendel, D. Brandhorst, H. Brandhorst, R. G. Bretzel, G. Elgue, R. Larsson, B. Nilsson, and O. Korsgren, "Incompatibility between human blood and isolated islets of langerhans: A finding with implications for clinical intraportal islet transplantation?," *Diabetes*, vol. 48, no. 10, pp. 1907–1914, 1999.
- [20] L. Moberg, "The role of the innate immunity in islet transplantation," *Ups. J. Med. Sci.*, vol. 110, pp. 17–56, 2005.
- [21] P.-O. Carlsson, "Influence of microenvironment on engraftment of transplanted β -cells.," *Ups. J. Med. Sci.*, vol. 116, no. 1, pp. 1–7, 2011.
- [22] P. O. Carlsson, F. Palm, and G. Mattsson, "Low revascularization of experimentally transplanted human pancreatic islets," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 87, no. 12, pp. 5418–5423, 2002.
- [23] J. Lau and P.-O. Carlsson, "Low revascularization of human islets when experimentally transplanted into the liver.," *Transplantation*, vol. 87, no. 3, pp. 322–325, 2009.
- [24] F. Lim and a M. Sun, "Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas.," *Science*, vol. 210, no. 4472, pp. 908–910, 1980.
- [25] M. Chayosumrit, B. Tuch, and K. Sidhu, "Alginate microcapsule for propagation and directed differentiation of hESCs to definitive endoderm," *Biomaterials*, vol. 31, no. 3, pp. 505–514, 2010.
- [26] G. Karoubi, M. L. Ormiston, D. J. Stewart, and D. W. Courtman, "Single-cell hydrogel encapsulation for enhanced survival of human marrow stromal cells," *Biomaterials*, vol. 30, no. 29, pp. 5445–5455, 2009.
- [27] T. a Read, D. R. Sorensen, R. Mahesparan, P. O. Enger, R. Timpl, B. R. Olsen, M. H. Hjelstuen, O. Haraldseth, and R. Bjerkvig, "Local endostatin treatment of gliomas administered by microencapsulated producer cells," *Nat. Biotechnol.*, vol. 19, no. 1, pp. 29–34, 2001.
- [28] M. Johansson, A. Oudin, K. Tiemann, A. Bernard, A. Golebiewska, O. Keunen, F. Fack, D. Stieber, B. Wang, H. Hedman, and S. P. Niclou, "The soluble form of the tumor suppressor Lrig1 potently inhibits in vivo glioma growth irrespective of EGF receptor status," *Neuro. Oncol.*, vol. 15, no. 9, pp. 1200–1211, 2013.

- [29] M. Löhr, A. Hoffmeyer, J. C. Kröger, M. Freund, J. Hain, A. Holle, P. Karle, W. T. Knöfel, S. Liebe, P. Müller, H. Nizze, M. Renner, R. M. Saller, T. Wagner, K. Hauenstein, W. H. Günzburg, and B. Salmons, "Microencapsulated cell-mediated treatment of inoperable pancreatic carcinoma," *Lancet*, vol. 357, no. 9268, pp. 1591–1592, 2001.
- [30] S. V. Bhujbal, B. de Haan, S. P. Niclou, and P. de Vos, "A novel multilayer immunoisolating encapsulation system overcoming protrusion of cells," *Sci. Rep.*, vol. 4, no. figure 1, p. 6856, 2014.
- [31] P. Garcia, I. Youssef, J. K. Utvik, S. Florent-Bécharde, V. Barthélémy, C. Malaplate-Armand, B. Kriem, C. Stenger, V. Koziel, J.-L. Olivier, M.-C. Escanye, M. Hanse, A. Allouche, C. Desbène, F. T. Yen, R. Bjerkvig, T. Oster, S. P. Niclou, and T. Pillot, "Ciliary neurotrophic factor cell-based delivery prevents synaptic impairment and improves memory in mouse models of Alzheimer's disease.," *J. Neurosci.*, vol. 30, no. 22, pp. 7516–7527, 2010.
- [32] D. Emerich, S. Winn, P. Hantraye, M. Peschanski, E. Chen, Y. Chu, P. McDermott, E. Baetge, and J. Kordower, "Protective effect of encapsulated cells producing neurotrophic factor CNTF in a monkey model of Huntington's disease," *Nature*, vol. 386, no. 6623, pp. 395–399, 1997.
- [33] Y. Teramura and H. Iwata, "Bioartificial pancreas. Microencapsulation and conformal coating of islet of Langerhans," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 62, no. 7–8, pp. 827–840, 2010.
- [34] A. a Tomei, V. Manzoli, C. a Fraker, J. Giraldo, D. Velluto, M. Najjar, A. Pileggi, R. D. Molano, C. Ricordi, C. L. Stabler, and J. a Hubbell, "Device design and materials optimization of conformal coating for islets of Langerhans.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 111, no. 29, pp. 10514–10519, 2014.
- [35] D. W. Scharp and P. Marchetti, "Encapsulated islets for diabetes therapy: History, current progress, and critical issues requiring solution," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 67–68, pp. 35–73, 2014.
- [36] H. Uludag, P. De Vos, and P. a Tresco, "Technology of mammalian cell encapsulation.," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 42, no. 1–2, pp. 29–64, 2000.
- [37] S. Renvall and J. Niinikoski, "Intraperitoneal oxygen and carbon dioxide tensions in experimental adhesion disease and peritonitis.," *Am. J. Surg.*, vol. 130, no. 3, pp. 286–292, 1975.
- [38] D. Dufrane, M. Van Steenberghe, R. M. Goebbels, A. Saliez, Y. Guiot, and P. Gianello, "The influence of implantation site on the biocompatibility and survival of alginate encapsulated pig islets in rats," *Biomaterials*, vol. 27, no. 17, pp. 3201–3208, 2006.
- [39] K. a Heel and J. C. Hall, "Peritoneal defences and peritoneum-associated lymphoid tissue.," *Br. J. Surg.*, vol. 83, no. 8, pp. 1031–1036, 1996.
- [40] E. S. O'Sullivan, A. Vegas, D. G. Anderson, and G. C. Weir, "Islets transplanted in immunoisolation devices: A review of the progress and the challenges that remain," *Endocr. Rev.*, vol. 32, no. 6, pp. 827–844, 2011.
- [41] A. M. a Rokstad, I. Lacík, P. de Vos, and B. L. Strand, "Advances in biocompatibility and physico-chemical characterization of microspheres for cell encapsulation," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 67–68, pp. 111–130, 2014.
- [42] P. de Vos, M. Bučko, P. Gemeiner, M. Navrátil, J. Švitel, M. Faas, B. L. Strand, G. Skjak-Braek, Y. a. Morch, A. Vikartovská, I. Lacík, G. Kolláriková, G. Orive, D. Poncetlet, J. L. Pedraz, and M. B. Ansoerge-Schumacher, "Multiscale requirements for bioencapsulation in medicine and biotechnology," *Biomaterials*, vol. 30, no. 13, pp. 2559–2570, 2009.

- [43] R. Calafiore, G. Basta, G. Luca, C. A. R. L. Boselli, A. Bufalari, G. Mario, L. Moggi, P. Brunetti, and V. E. D. Pozzo, "Alginate / Polyaminoacidic Coherent Microcapsules for Pancreatic Islet Graft Immunoisolation in Diabetic Recipients," pp. 313–322.
- [44] M. De Groot, D. Ph, T. A. Schuurs, D. Ph, R. Van Schilfgaarde, and D. Ph, "Causes of Limited Survival of Microencapsulated Pancreatic Islet Grafts," vol. 150, pp. 141–150, 2004.
- [45] P. De Vos, B. De Haan, G. H. Wolters, and R. Van Schilfgaarde, "Factors influencing the adequacy of microencapsulation of rat pancreatic islets.," *Transplantation*, vol. 62, no. 7, pp. 888–893, 1996.
- [46] G. Basta, P. Sarchielli, G. Luca, L. Racanicchi, C. Nastruzzi, L. Guido, F. Mancuso, G. MacChiarulo, G. Calabrese, P. Brunetti, and R. Calafiore, "Optimized parameters for microencapsulation of pancreatic islet cells: An in vitro study clueing on islet graft immunoprotection in type 1 diabetes mellitus," *Transpl. Immunol.*, vol. 13, no. 4, pp. 289–296, 2004.
- [47] C. G. Thanos, B. E. Bintz, and D. F. Emerich, "Stability of alginate-polyornithine microcapsules is profoundly dependent on the site of transplantation," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 81, no. 1, pp. 1–11, 2007.
- [48] P. De Vos, C. G. Van Hoogmoed, J. Van Zanten, S. Netter, J. H. Strubbe, and H. J. Busscher, "Long-term biocompatibility, chemistry, and function of microencapsulated pancreatic islets," *Biomaterials*, vol. 24, pp. 305–312, 2003.
- [49] P. De Vos, H. A. Lazarjani, D. Poncelet, and M. M. Faas, "Polymers in cell encapsulation from an enveloped cell perspective," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 67–68, pp. 15–34, 2014.
- [50] B. Buder, M. Alexander, R. Krishnan, D. W. Chapman, and J. R. Lakey, "Encapsulated Islet Transplantation: Strategies and Clinical Trials.," *Immune Netw.*, vol. 13, no. 6, pp. 235–239, 2013.
- [51] R. Calafiore and G. Basta, "Clinical application of microencapsulated islets: Actual prospectives on progress and challenges," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2013.
- [52] P. Soon-Shiong, R. E. Heintz, N. Merideth, Q. X. Yao, Z. Yao, T. Zheng, M. Murphy, M. K. Moloney, M. Schmehl, M. Harris, R. Mendez, R. Mendez, and P. A. Sandford, "Insulin independence in a type 1 diabetic patient after encapsulated islet transplantation," *Lancet*, vol. 343, no. 8903, pp. 950–951, 1994.
- [53] R. Calafiore, G. Basta, G. Luca, A. Lemmi, M. P. Montanucci, G. Calabrese, L. Racanicchi, F. Mancuso, and P. Brunetti, "Microencapsulated pancreatic islet allografts into nonimmunosuppressed patients with type 1 diabetes," *Diabetes Care*, vol. 29, no. 1, pp. 137–138, 2006.
- [54] G. Basta, P. Montanucci, G. Luca, C. Boselli, G. Noya, B. Barbaro, M. Qi, K. P. Kinzer, J. Oberholzer, and R. Calafiore, "Long-term metabolic and immunological follow-up of nonimmunosuppressed patients with type 1 diabetes treated with microencapsulated islet allografts: Four cases," *Diabetes Care*, vol. 34, no. 11, pp. 2406–2409, 2011.
- [55] R. B. Elliott, L. Escobar, P. L. J. Tan, M. Muzina, S. Zwain, and C. Buchanan, "Live encapsulated porcine islets from a type 1 diabetic patient 9.5 yr after xenotransplantation," *Xenotransplantation*, vol. 14, no. 2, pp. 157–161, 2007.
- [56] B. E. Tuch, G. W. Keogh, L. J. Williams, W. Wu, J. Foster, V. Vaithilingam, and R. Phlips, "Safety and Viability of Microencapsulated," *Diabetes Care*, vol. 32, no. 10, pp. 1887–1889, 2009.
- [57] P. De Vos, a F. Hamel, and K. Tatrakiewicz, "Considerations for sucessful transplantation of encapsulated pancreatic islets," *Diabetologia*, vol. 45, pp. 159–173, 2002.

- [58] B. V Slaughter, S. S. Khurshid, and O. Z. Fisher, "Hydrogels in Regenerative Medicine," *Adv. ...*, 2009.
- [59] K. Y. Lee and D. J. Mooney, "Hydrogels for Tissue Engineering Applications," *Chem. Rev.*, vol. 101, no. 7, pp. 203–225, 2001.
- [60] P. De Vos, B. J. De Haan, G. H. J. Wolters, J. H. Strubbe, and R. Van Schilfgaarde, "Improved biocompatibility but limited graft survival after purification of alginate for microencapsulation of pancreatic islets," *Diabetologia*, vol. 40, no. 3, pp. 262–270, 1997.
- [61] H. Iwata, T. Takagi, H. Amemiya, H. Shimizu, K. Yamashita, K. Kobayashi, and T. Akutsu, "Agarose for a bioartificial pancreas," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 26, no. 7, pp. 967–977, 1992.
- [62] T. Kobayashi, Y. Aomatsu, H. Iwata, T. Kin, H. Kanehiro, M. Hisanaga, S. Ko, M. Nagao, and Y. Nakajima, "Indefinite islet protection from autoimmune destruction in nonobese diabetic mice by agarose microencapsulation without immunosuppression," *Transplantation*, vol. 75, no. 5, pp. 619–625, 2003.
- [63] B. A. Zielinski and P. Aebischer, "Chitosan as a matrix for mammalian cell encapsulation," vol. 15, no. 13, 1994.
- [64] C. H. Lee, A. Singla, and Y. Lee, "Biomedical applications of collagen," vol. 221, pp. 1–22, 2001.
- [65] G. M. Cruise, O. D. Hegre, F. V. Lamberti, S. R. Hager, R. Hill, D. S. Scharp, and J. A. Hubbell, "In vitro and in vivo performance of porcine islets encapsulated in interfacially photopolymerized poly(ethylene glycol) diacrylate membranes," *Cell Transplant.*, vol. 8, no. 3, pp. 293–306, 1999.
- [66] A. Sabnis, M. Rahimi, C. Chapman, and K. T. Nguyen, "Cytocompatibility studies of an in situ photopolymerized thermoresponsive hydrogel nanoparticle system using human aortic smooth muscle cells," 2008.
- [67] L. M. Weber, J. He, B. Bradley, K. Haskins, and K. S. Anseth, "PEG-based hydrogels as an in vitro encapsulation platform for testing controlled ??-cell microenvironments," *Acta Biomater.*, vol. 2, no. 1, pp. 1–8, 2006.
- [68] D. F. Emerich, J. P. Hammang, E. E. Baetge, and S. R. Winn, "Implantation of polymer-encapsulated human nerve growth factor-secreting fibroblasts attenuates the behavioral and neuropathological consequences of quinolinic acid injections into rodent striatum," *Exp. Neurol.*, vol. 130, pp. 141–150, 1994.
- [69] S. S. Prakash, "Strategy for Cell Therapy: Polymers for Live Cell Encapsulation and Delivery," *Trends Biomater. Artif. Organs*, vol. 18, no. 1, pp. 24–35, 2004.
- [70] A. M. A. Rokstad, *Alginate capsules as bioreactors for cell therapy*, no. March. 2006.
- [71] H. Grasdalen, "Carbohydrate Research, 118 (1983) 255-260," vol. 118, pp. 255–260, 1983.
- [72] Ý. Mørch, *Novel Alginate Microcapsules for Cell Therapy*, no. February. 2008.
- [73] A. Haug and O. Smidsrød, "Selectivity of some anionic polymers for divalent metal ions," *Acta Chem. Scand.*, vol. 24, pp. 843–854, 1970.
- [74] O. Smidsrod, "Molecular basis for some physical properties of alginates in the gel state," *Faraday Discuss. Chem. Soc.*, vol. 57, p. 263, 1974.
- [75] G. T. Grant, E. R. Morris, D. a. Rees, P. J. C. Smith, and D. Thom, "Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model," *FEBS Lett.*, vol. 32, no. 1, pp. 195–198,

1973.

- [76] R. Kohn and B. Larsen, "Preparation of water-soluble polyuronic acids and their calcium salts, and the determination of calcium ion activity in relation to the degree of polymerization.," *Acta chemica Scandinavica*, vol. 26, no. 6. pp. 2455–2468, 1972.
- [77] B. T. Stokke, O. Smidsrød, F. Zanetti, W. Strand, and G. Skjåk-Bræk, "Distribution of uronate residues in alginate chains in relation to alginate gelling properties — 2: Enrichment of β -d-mannuronic acid and depletion of α -l-guluronic acid in sol fraction," *Carbohydr. Polym.*, vol. 21, no. 1, pp. 39–46, 1993.
- [78] K. Draget, G. Skjakbrak, and O. Smidsrod, "Alginic acid gels: the effect of alginate chemical composition and molecular weight," *Carbohydr. Polym.*, vol. 25, no. 1, pp. 31–38, 1994.
- [79] a Martinsen, G. Skjåk-Braek, and O. Smidsrød, "Alginate as immobilization material: I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads.," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 33, no. 1, pp. 79–89, 1989.
- [80] S. V. Bhujbal, G. a. Paredes-Juarez, S. P. Niclou, and P. de Vos, "Factors influencing the mechanical stability of alginate beads applicable for immunoisolation of mammalian cells," *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 37, pp. 196–208, 2014.
- [81] P. J. Flory, "Statistical Mechanics of Swelling of Network Structures," *J. Chem. Phys.*, vol. 18, no. 1, p. 108, 1950.
- [82] P. Del Gaudio, P. Colombo, G. Colombo, P. Russo, and F. Sonvico, "Mechanisms of formation and disintegration of alginate beads obtained by prilling," *Int. J. Pharm.*, vol. 302, no. 1–2, pp. 1–9, 2005.
- [83] I. Machida-Sano, M. Hirakawa, H. Matsumoto, M. Kamada, S. Ogawa, N. Satoh, and H. Namiki, "Surface characteristics determining the cell compatibility of ionically cross-linked alginate gels.," *Biomed. Mater.*, vol. 9, no. 2, p. 25007, 2014.
- [84] G. Orive, S. K. Tam, J. L. Pedraz, and J. P. Hallé, "Biocompatibility of alginate-poly-l-lysine microcapsules for cell therapy," *Biomaterials*, 2006.
- [85] J. Dusseault, S. K. Tam, M. Ménard, S. Polizu, G. Jourdan, L. Yahia, and J. P. Hallé, "Evaluation of alginate purification methods: Effect on polyphenol, endotoxin, and protein contamination," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 76, no. 2, pp. 243–251, 2006.
- [86] G. a. Paredes-Juarez, B. J. De Haan, M. M. Faas, and P. De Vos, "The role of pathogen-associated molecular patterns in inflammatory responses against alginate based microcapsules," *J. Control. Release*, vol. 172, no. 3, pp. 983–992, 2013.
- [87] R. Calafiore, G. Basta, G. Luca, A. Lemmi, L. Racanicchi, F. Mancuso, M. P. Montanucci, and P. Brunetti, "Standard Technical Procedures for Microencapsulation of Human Islets for Graft into Nonimmunosuppressed Patients With Type 1 Diabetes Mellitus," vol. 1157, pp. 1156–1157, 2006.
- [88] D. Sainz Vidal-Serp and C. Wandrey, "Purification of natural anionic polymers," *Minerva Biotechnol.*, vol. 17, no. 4, pp. 215–229, 2005.
- [89] G. Langlois, J. Dusseault, S. Bilodeau, S. K. Tam, D. Magassouba, and J. P. Hallé, "Direct effect of alginate purification on the survival of islets immobilized in alginate-based microcapsules," *Acta Biomater.*, vol. 5, no. 9, pp. 3433–3440, 2009.
- [90] S. K. Tam, J. Dusseault, S. Polizu, M. Me, L. H. Yahia, and J. Halle, "Impact of residual contamination

- on the biofunctional properties of purified alginates used for cell encapsulation," vol. 27, pp. 1296–1305, 2006.
- [91] B. Thu, P. Bruheim, T. Espevik, O. Smidsrod, P. Soon-Shiong, and G. Skjak-Braek, "Alginate polycation microcapsules. II. Some functional properties," *Biomaterials*, vol. 17, no. 11, pp. 1069–1079, 1996.
- [92] B. T. Stokke, K. I. Draget, O. Smidsrød, Y. Yuguchi, H. Urakawa, and K. Kajiwara, "Small-angle X-ray scattering and rheological characterization of alginate gels. 3. Alginic acid gels," *Macromolecules*, vol. 33, pp. 1853–1863, 2000.
- [93] M. Otterlei, K. Ostgaard, G. Skjåk-Braek, O. Smidsrød, P. Soon-Shiong, and T. Espevik, "Induction of cytokine production from human monocytes stimulated with alginate," *J. Immunother. (1991).*, vol. 10, no. 4, pp. 286–291, 1991.
- [94] T. Espevik, M. Otterlei, G. Skjak-Braek, L. Ryan, S. D. Wright, and A. Sundan, "The involvement of CD14 in stimulation of cytokine production by uronic acid polymers," *Eur. J. Immunol.*, vol. 23, no. 1, pp. 255–261, 1993.
- [95] C. Toso, Z. Mathe, P. Morel, J. Oberholzer, D. Bosco, D. Sainz-Vidal, D. Hunkeler, L. H. Buhler, C. Wandrey, and T. Berney, "Effect of microcapsule composition and short-term immunosuppression on intraportal biocompatibility," *Cell Transplant.*, vol. 14, no. 2–3, pp. 159–167, 2005.
- [96] P. De Vos, M. Spasojevic, B. J. De Haan, and M. M. Faas, "The association between in vivo physicochemical changes and inflammatory responses against alginate based microcapsules," *Biomaterials*, vol. 33, no. 22, pp. 5552–5559, 2012.
- [97] R. P. Lanza, R. Jackson, A. Sullivan, J. Ringeling, C. McGrath, W. KÜhtreiber, and W. L. Chick, "Xenotransplantation of Cells Using Biodegradable," *Tranplantation*, vol. 67, no. 8, pp. 1105–1111, 1999.
- [98] Å. a Mørch, I. Donati, B. L. Strand, and G. Skja, "Effect of Ca²⁺, Ba²⁺, and Sr²⁺ on Alginate Microbeads," pp. 1471–1480, 2006.
- [99] H. Zimmermann, D. Zimmermann, R. Reuss, P. J. Feilen, B. Manz, a. Katsen, M. Weber, F. R. Ihmig, F. Ehrhart, P. Geßner, M. Behringer, a. Steinbach, L. H. Wegner, V. L. Sukhorukov, J. a. Vásquez, S. Schneider, M. M. Weber, F. Volke, R. Wolf, and U. Zimmermann, "Towards a medically approved technology for alginate-based microcapsules allowing long-term immunoisolated transplantation," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 16, no. 6, pp. 491–501, 2005.
- [100] H. Zimmermann, F. Ehrhart, D. Zimmermann, K. Müller, a. Katsen-Globa, M. Behringer, P. J. Feilen, P. Gessner, G. Zimmermann, S. G. Shirley, M. M. Weber, J. Metze, and U. Zimmermann, "Hydrogel-based encapsulation of biological, functional tissue: fundamentals, technologies and applications," *Appl. Phys. A*, vol. 89, no. 4, pp. 909–922, Sep. 2007.
- [101] Y. A. Mørch, M. Qi, P. O. M. Gundersen, K. Formo, I. Lacik, J. Oberholzer, and B. L. Strand, "Binding and leakage of barium in alginate microbeads," pp. 2939–2947, 2012.
- [102] O. Gåserød, I. G. Jolliffe, F. C. Hampson, P. W. Dettmar, and G. Skjåk-Bræk, "The enhancement of the bioadhesive properties of calcium alginate gel beads by coating with chitosan," *Int. J. Pharm.*, vol. 175, pp. 237–246, 1998.
- [103] V. Vaithilingam, G. Kollarikova, M. Qi, I. Lacik, J. Oberholzer, G. J. Guillemin, and B. E. Tuch, "Effect of prolonged gelling time on the intrinsic properties of barium alginate microcapsules and its biocompatibility," *J. Microencapsul.*, vol. 28, no. 6, pp. 499–507, 2011.

- [104] B. L. Strand, Y. a. Mørch, T. Espevik, and G. Skjåk-Bræk, "Visualization of alginate-poly-L-lysine-alginate microcapsules by confocal laser scanning microscopy," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 82, no. 4, pp. 386–394, 2003.
- [105] S. Juste, M. Lessard, N. Henley, M. Ménard, and J. P. Hallé, "Effect of poly-L-lysine coating on macrophage activation by alginate-based microcapsules: Assessment using a new in vitro method," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 72, no. 4, pp. 389–398, 2005.
- [106] S. K. Tam, J. Dusseault, S. Polizu, M. Ménard, J. P. Hallé, and L. Yahia, "Physicochemical model of alginate-poly-L-lysine microcapsules defined at the micrometric/nanometric scale using ATR-FTIR, XPS, and ToF-SIMS," *Biomaterials*, vol. 26, pp. 6950–6961, 2005.
- [107] J. T. Wilson, W. Cui, V. Kozlovskaya, E. Kharlampieva, D. Pan, Z. Qu, V. R. Krishnamurthy, J. Mets, V. Kumar, J. Wen, Y. Song, V. V Tsukruk, E. L. Chaikof, and U. States, "Cell Surface Engineering with Polyelectrolyte Multilayer Thin Films," pp. 7054–7064, 2011.
- [108] L. Baruch and M. Machluf, "Alginate-chitosan complex coacervation for cell encapsulation: Effect on mechanical properties and on long-term viability," *Biopolymers*, vol. 82, no. 6, pp. 570–579, 2006.
- [109] W. Zhang, S. Zhao, W. Rao, J. Snyder, J. K. Choi, J. Wang, I. a Khan, N. B. Saleh, P. J. Mohler, J. Yu, T. J. Hund, C. Tang, and X. He, "A Novel Core-Shell Microcapsule for Encapsulation and 3D Culture of Embryonic Stem Cells.," *J. Mater. Chem. B*, vol. 2013, pp. 1002–1009, 2013.
- [110] J. Lin, W. Yu, X. Liu, H. Xie, W. Wang, and X. Ma, "In Vitro and in Vivo characterization of alginate-chitosan-alginate artificial microcapsules for therapeutic oral delivery of live bacterial cells.," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 105, no. 6, pp. 660–665, 2008.
- [111] H. G. Xie, X. X. Li, G. J. Lv, W. Y. Xie, J. Zhu, T. Luxbacher, R. Ma, and X. J. Ma, "Effect of surface wettability and charge on protein adsorption onto implantable alginate-chitosan-alginate microcapsule surfaces," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 92, no. 4, pp. 1357–1365, 2009.
- [112] C. M. Bünger, C. Gerlach, T. Freier, K. P. Schmitz, M. Pilz, C. Werner, L. Jonas, W. Schareck, U. T. Hopt, and P. de Vos, "Biocompatibility and surface structure of chemically modified immunoisolating alginate-PLL capsules.," *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 67, no. 4, pp. 1219–1227, 2003.
- [113] M. Ma, A. Chiu, G. Sahay, J. C. Doloff, N. Dholakia, R. Thakrar, J. Cohen, A. Vegas, D. Chen, K. M. Bratlie, T. Dang, R. L. York, J. Hollister-Lock, G. C. Weir, and D. G. Anderson, "Core-Shell Hydrogel Microcapsules for Improved Islets Encapsulation," *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 2, pp. 667–672, 2013.
- [114] M. Ma, W. F. Liu, P. S. Hill, K. M. Bratlie, D. J. Siegwart, J. Chin, M. Park, J. Guerreiro, and D. G. Anderson, "Development of cationic polymer coatings to regulate foreign-body responses," *Adv. Mater.*, vol. 23, no. 24, pp. 189–194, 2011.
- [115] G. Zheng, X. Liu, X. Wang, L. Chen, H. Xie, F. Wang, H. Zheng, W. Yu, and X. Ma, "Improving Stability and Biocompatibility of Alginate / Chitosan Microcapsule by Fabricating Bi-Functional Membrane a," pp. 1–12, 2014.
- [116] J. Zheng, H. Xie, W. Yu, M. Tan, F. Gong, X. Liu, F. Wang, G. Lv, W. Liu, G. Zheng, Y. Yang, W. Xie, and X. Ma, "Enhancement of surface graft density of MPEG on alginate/chitosan hydrogel microcapsules for protein repellency," *Langmuir*, vol. 28, no. 37, pp. 13261–13273, 2012.
- [117] J. N. Zheng, H. G. Xie, W. T. Yu, X. D. Liu, W. Y. Xie, J. Zhu, and X. J. Ma, "Chitosan-g-MPEG-modified alginate/chitosan hydrogel microcapsules: A quantitative study of the effect of polymer architecture on the resistance to protein adsorption," *Langmuir*, vol. 26, no. 22, pp. 17156–17164, 2010.

- [118] J. A. M. Steele, J. Hallé, D. Poncelet, and R. J. Neufeld, "Therapeutic cell encapsulation techniques and applications in diabetes ☆," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 67–68, pp. 74–83, 2014.
- [119] H. Lee, O. Park, J. Park, and J. Yang, "Continuous production of uniform calcium alginate beads by sound wave induced vibration," *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 67, pp. 255–259, 1996.
- [120] S. Mazzitelli, a Tosi, C. Balestra, C. Nastruzzi, G. Luca, F. Mancuso, R. Calafiore, and M. Calvitti, "Production and characterization of alginate microcapsules produced by a vibrational encapsulation device.," *J. Biomater. Appl.*, vol. 23, no. 2, pp. 123–145, 2008.
- [121] B. G. Amsden and M. F. a Goosen, "An examination of factors affecting the size, distribution and release characteristics of polymer microbeads made using electrostatics," *J. Control. Release*, vol. 43, no. 2–3, pp. 183–196, 1997.
- [122] R. J. Neufeld, "Formation of Microgel Beads by Electric Dispersion of Polymer Solutions," vol. 45, no. 9, 1999.
- [123] C. Rodriguez-Rivero, E. M. M. Del Valle, and M. a. Galán, "Development of a new technique to generate microcapsules from the breakup of non-newtonian highly viscous fluid jets," *AIChE J.*, vol. 57, no. 12, pp. 3436–3447, 2011.
- [124] P. De Vos, B. J. De Haan, and R. Van Schilfgarrde, "Upscaling the production of microencapsulatedpancreatic islets," *Biomaterials*, vol. 18, no. 16, pp. 1085–1090, 1997.
- [125] U. Prüsse, L. Bilancetti, M. Bučko, B. Bugarski, J. Bukowski, P. Gemeiner, D. Lewińska, V. Manojlovic, B. Massart, C. Nastruzzi, V. Nedovic, D. Poncelet, S. Siebenhaar, L. Tobler, A. Tosi, A. Vikartovská, and K.-D. Vorlop, "Comparison of different technologies for alginate beads production," *Chemical Papers*, vol. 62, no. 4. pp. 364–374, 2008.
- [126] M. F. A. Goosen, A. S. Al-ghafri, O. El Mardi, M. I. J. Al-belushi, H. A. Al-hajri, E. S. E. Mahmoud, and E. C. Consolacion, "Electrostatic Droplet Generation for Encapsulat ion of Somatic Tissue : Assessment of High-Voltage Power Supply †," 1997.
- [127] "Nisco." [Online]. Available: www.nisco.ch.
- [128] D. B. Seifert and J. a. Phillips, "Production of small, monodispersed alginate beads for cell immobilization," *Biotechnol. Prog.*, vol. 13, no. 5, pp. 562–568, 1997.
- [129] "Genialab." [Online]. Available: www.genialab.com.
- [130] "Buchi." [Online]. Available: www.buchi.com.
- [131] D. Poncelet, R. Lencki, C. Beaulieu, J. P. Halle, R. J. Neufeid, and A. Fournier, "Production of alginate beads by emulsification / internal gelation . I . Methodology," pp. 39–45, 1992.
- [132] D. Poncelet, B. Poncelet De Smet, C. Beaulieu, M. Huguet, A. Fournier, and R. J. Neufeid, "Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. I1. Physicochemistry," pp. 644–650, 1995.
- [133] C. a. Hoesli, K. Raghuram, R. L. J. Kiang, D. Mocinecová, X. Hu, J. D. Johnson, I. Lacić, T. J. Kieffer, and J. M. Piret, "Pancreatic cell immobilization in alginate beads produced by emulsion and internal gelation," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 108, no. 2, pp. 424–434, 2011.
- [134] T. Thorsen, R. W. Roberts, F. H. Arnold, and S. R. Quake, "Dynamic Pattern Formation in a Vesicle-Generating Microfluidic Device," pp. 4163–4166, 2001.
- [135] C. Cramer, P. Fischer, and E. J. Windhab, "Drop formation in a co-flowing ambient fluid," *Chem. Eng.*

- Sci.*, vol. 59, pp. 3045–3058, 2004.
- [136] P. B. Umbanhowar, V. Prasad, and D. A. Weitz, “Monodisperse Emulsion Generation via Drop Break Off in a Coflowing Stream,” no. 4, pp. 347–351, 2000.
- [137] A. S. Utada, A. Fernandez-Nieves, H. a. Stone, and D. a. Weitz, “Dripping to jetting transitions in coflowing liquid streams,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 99, no. August, pp. 1–4, 2007.
- [138] A. M. Gañán-calvo, “Generation of Steady Liquid Microthreads and Micron-Sized Monodisperse Sprays in Gas Streams in Gas Streams,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 80, no. 2, pp. 1–5, 1998.
- [139] A. M. Gañán-calvo, “Perfectly Monodisperse Microbubbling by Capillary Flow Focusing,” no. JANUARY, 2002.
- [140] S. L. Anna, N. Bontoux, and H. a. Stone, “Formation of dispersions using ‘flow focusing’ in microchannels,” *Appl. Phys. Lett.*, vol. 82, pp. 364–366, 2003.
- [141] P. Garstecki, I. Gitlin, W. Diluzio, G. M. Whitesides, E. Kumacheva, and H. a. Stone, “Formation of monodisperse bubbles in a microfluidic flow-focusing device,” *Appl. Phys. Lett.*, vol. 85, no. 13, pp. 2649–2651, 2004.
- [142] Y. Tan, V. Cristini, and A. P. Lee, “Monodispersed microfluidic droplet generation by shear focusing microfluidic device,” vol. 114, pp. 350–356, 2006.
- [143] B. S. Takeuchi, P. Garstecki, D. B. Weibel, and G. M. Whitesides, “An Axisymmetric Flow-Focusing Microfluidic Device **,” no. 8, pp. 1067–1072, 2005.
- [144] P. Agarwal, S. Zhao, P. Bielecki, W. Rao, J. K. Choi, Y. Zhao, J. Yu, W. Zhang, and X. He, “One-step microfluidic generation of pre-hatching embryo-like core-shell microcapsules for miniaturized 3D culture of pluripotent stem cells.,” *Lab Chip*, vol. 13, no. 207890, pp. 4525–33, 2013.
- [145] V. L. Workman, S. B. Dunnett, P. Kille, and D. D. Palmer, “On-Chip Alginate Microencapsulation of Functional Cells,” *Macromol. Rapid Commun.*, vol. 29, no. 2, pp. 165–170, Jan. 2008.
- [146] V. L. Workman, S. B. Dunnett, P. Kille, and D. D. Palmer, “Microfluidic chip-based synthesis of alginate microspheres for encapsulation of immortalized human cells.,” *Biomicrofluidics*, vol. 1, no. 1, p. 14105, Jan. 2007.
- [147] W.-H. Tan and S. Takeuchi, “Monodisperse Alginate Hydrogel Microbeads for Cell Encapsulation,” *Adv. Mater.*, vol. 19, no. 18, pp. 2696–2701, Sep. 2007.
- [148] L. Capretto, S. Mazzitelli, C. Balestra, A. Tosi, and C. Nastruzzi, “Effect of the gelation process on the production of alginate microbeads by microfluidic chip technology.,” *Lab Chip*, vol. 8, no. 4, pp. 617–21, Apr. 2008.
- [149] S. Akbari and T. Pirbodaghi, “Microfluidic encapsulation of cells in alginate particles via an improved internal gelation approach,” *Microfluid. Nanofluidics*, vol. 16, no. 4, pp. 773–777, Sep. 2013.
- [150] J. S. Hong, S. J. Shin, S. H. Lee, E. Wong, and J. J. Cooper-White, “Spherical and cylindrical microencapsulation of living cells using microfluidic devices,” *Korea-Australia Rheol. J.*, vol. 19, no. 3, pp. 157–164, 2007.
- [151] H. Shintaku, T. Kuwabara, S. Kawano, T. Suzuki, I. Kanno, and H. Kotera, “Micro cell encapsulation and its hydrogel-beads production using microfluidic device,” *Microsyst. Technol.*, vol. 13, no. 8–10, pp. 951–958, Dec. 2006.

- [152] E. Um, D.-S. Lee, H.-B. Pyo, and J.-K. Park, "Continuous generation of hydrogel beads and encapsulation of biological materials using a microfluidic droplet-merging channel," *Microfluid. Nanofluidics*, vol. 5, no. 4, pp. 541–549, Feb. 2008.
- [153] S. Sugiura, T. Oda, Y. Izumida, Y. Aoyagi, M. Satake, A. Ochiai, N. Ohkohchi, and M. Nakajima, "Size control of calcium alginate beads containing living cells using micro-nozzle array.," *Biomaterials*, vol. 26, no. 16, pp. 3327–31, Jun. 2005.
- [154] K. Liu, H.-J. Ding, J. Liu, Y. Chen, and X.-Z. Zhao, "Shape-controlled production of biodegradable calcium alginate gel microparticles using a novel microfluidic device.," *Langmuir*, vol. 22, no. 22, pp. 9453–7, Oct. 2006.
- [155] K. Liu, H. Ding, Y. Chen, and X.-Z. Zhao, "Droplet-based synthetic method using microflow focusing and droplet fusion," *Microfluid. Nanofluidics*, vol. 3, no. 2, pp. 239–243, Sep. 2006.
- [156] E. Rondeau and J. J. Cooper-White, "Biopolymer microparticle and nanoparticle formation within a microfluidic device.," *Langmuir*, vol. 24, no. 13, pp. 6937–45, Jun. 2008.
- [157] C.-H. Choi, J.-H. Jung, Y. W. Rhee, D.-P. Kim, S.-E. Shim, and C.-S. Lee, "Generation of monodisperse alginate microbeads and in situ encapsulation of cell in microfluidic device.," *Biomed. Microdevices*, vol. 9, no. 6, pp. 855–62, Dec. 2007.
- [158] J. H. Xu, S. W. Li, J. Tan, and G. S. Luo, "Controllable Preparation of Monodispersed Calcium Alginate Microbeads in a Novel Microfluidic System," *Chem. Eng. Technol.*, vol. 31, no. 8, pp. 1223–1226, Aug. 2008.
- [159] H. Zhang, E. Tumarkin, R. Peerani, Z. Nie, R. M. a Sullan, G. C. Walker, and E. Kumacheva, "Microfluidic production of biopolymer microcapsules with controlled morphology.," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, no. 37, pp. 12205–10, Sep. 2006.
- [160] C. Kim, K. S. Lee, Y. E. Kim, K.-J. Lee, S. H. Lee, T. S. Kim, and J. Y. Kang, "Rapid exchange of oil-phase in microencapsulation chip to enhance cell viability.," *Lab Chip*, vol. 9, no. 9, pp. 1294–7, May 2009.
- [161] C. Kim, S. Chung, Y. E. Kim, K. S. Lee, S. H. Lee, K. W. Oh, and J. Y. Kang, "Generation of core-shell microcapsules with three-dimensional focusing device for efficient formation of cell spheroid.," *Lab Chip*, vol. 11, no. 2, pp. 246–52, Jan. 2011.
- [162] D.-H. Lee, W. Lee, E. Um, and J.-K. Park, "On-chip gelation of temporally controlled alginate microdroplets," *2011 16th Int. Solid-State Sensors, Actuators Microsystems Conf.*, pp. 234–237, Jun. 2011.
- [163] D. A. Links, "Rapid purification of cell encapsulated hydrogel beads from oil phase to aqueous phase in a microfluidic device †," pp. 4117–4121, 2011.
- [164] E. H. Wong, E. Rondeau, and J. Cooper-white, "A microfluidic-based method for the transfer of biopolymer particles from an oil phase to an aqueous phase," pp. 2582–2590, 2009.
- [165] H. Huang and X. He, "Interfacial tension based on-chip extraction of microparticles confined in microfluidic Stokes flows Interfacial tension based on-chip extraction of microparticles confined in microfluidic Stokes flows," vol. 143704, 2014.
- [166] J. C. McDonald and G. M. Whitesides, "Poly(dimethylsiloxane) as a Material for Fabricating Microfluidic Devices," *Acc. Chem. Res.*, vol. 35, no. 7, pp. 491–499, Jul. 2002.
- [167] Z. Nie, S. Xu, M. Seo, P. C. Lewis, and E. Kumacheva, "Polymer particles with various shapes and

- morphologies produced in continuous microfluidic reactors," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, no. 22, pp. 8058–8063, 2005.
- [168] S. L. Anna, N. Bontoux, and H. a. Stone, "Formation of dispersions using 'flow focusing' in microchannels," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 82, no. 3, p. 364, 2003.
- [169] G. F. Christopher and S. L. Anna, "Microfluidic methods for generating continuous droplet streams," *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 40, no. 19, pp. R319–R336, 2007.
- [170] L. Derzsi, M. Kasprzyk, J. P. Plog, and P. Garstecki, "Flow focusing with viscoelastic liquids," *Phys. Fluids*, vol. 25, no. 2013, 2013.
- [171] T. Cubaud and T. G. Mason, "Capillary threads and viscous droplets in square microchannels," *Phys. Fluids*, vol. 20, no. 5, 2008.
- [172] T. Fu, Y. Wu, Y. Ma, and H. Z. Li, "Droplet formation and breakup dynamics in microfluidic flow-focusing devices: From dripping to jetting," *Chem. Eng. Sci.*, vol. 84, pp. 207–217, 2012.
- [173] C. Zhou, P. Yue, and J. J. Feng, "Formation of simple and compound drops in microfluidic devices," *Phys. Fluids*, vol. 18, no. 2006, 2006.
- [174] S. L. Anna and H. C. Mayer, "Microscale tipstreaming in a microfluidic flow focusing device," *Phys. Fluids*, vol. 18, no. 12, 2006.
- [175] J. K. Nunes, S. S. H. Tsai, J. Wan, and H. a. Stone, "Dripping and jetting in microfluidic multiphase flows applied to particle and fiber synthesis," *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 46, p. 114002, 2013.
- [176] T. Ward, M. Faivre, M. Abkarian, and H. a. Stone, "Microfluidic flow focusing: Drop size and scaling in pressure versus flow-rate-driven pumping," *Electrophoresis*, vol. 26, no. 19, pp. 3716–3724, 2005.
- [177] W. Lee, L. M. Walker, and S. L. Anna, "Role of geometry and fluid properties in droplet and thread formation processes in planar flow focusing," *Phys. Fluids*, vol. 21, no. 2009, 2009.
- [178] Z. Nie, M. Seo, S. Xu, P. C. Lewis, M. Mok, E. Kumacheva, G. M. Whitesides, P. Garstecki, and H. a. Stone, "Emulsification in a microfluidic flow-focusing device: Effect of the viscosities of the liquids," *Microfluid. Nanofluidics*, vol. 5, pp. 585–594, 2008.
- [179] W. Lee, L. M. Walker, and S. L. Anna, "Competition between viscoelasticity and surfactant dynamics in flow focusing microfluidics," *Macromol. Mater. Eng.*, vol. 296, no. 3–4, pp. 203–213, 2011.
- [180] C. X. Zhao and A. P. J. Middelberg, "Two-phase microfluidic flows," *Chem. Eng. Sci.*, vol. 66, no. 7, pp. 1394–1411, 2011.
- [181] B. Steinhaus, A. Q. Shen, and R. Sureshkumar, "Dynamics of viscoelastic fluid filaments in microfluidic devices," *Phys. Fluids*, vol. 19, no. 7, 2007.
- [182] A. Gupta, H. S. Matharoo, D. Makkar, and R. Kumar, "Droplet formation via squeezing mechanism in a microfluidic flow-focusing device," *Comput. Fluids*, vol. 100, pp. 218–226, 2014.
- [183] Y. Shi, G. H. Tang, and H. H. Xia, "Lattice Boltzmann simulation of droplet formation in T-junction and flow focusing devices," *Comput. Fluids*, vol. 90, pp. 155–163, 2014.
- [184] P. Wu, Z. Luo, Z. Liu, Z. Li, C. Chen, L. Feng, and L. He, "Drag-induced breakup mechanism for droplet generation in dripping within flow focusing microfluidics," *Chinese J. Chem. Eng.*, vol. 23, no. 1, pp. 7–14, 2015.

- [185] M. Robert, D. Saint Vincent, M. Robert, and D. Saint Vincent, "Écoulements microfluidiques pilotés sans contact par une onde laser," 2010.
- [186] P. Garstecki, H. a. Stone, and G. M. Whitesides, "Mechanism for flow-rate controlled breakup in confined geometries: A route to monodisperse emulsions," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 94, no. April, pp. 1–4, 2005.
- [187] M. Davidson, "Flow focusing in microchannels," *ANZIAM J.*, vol. 46, no. March, pp. 47–58, 2005.
- [188] S. Le Vot, J. Berthier, N. David, G. Costa, M. Alessio, V. Mourier, P. Y. Benhamou, and F. Rivera, "SCALING RULES FOR FLOW FOCUSING DEVICES : FROM STANDARD TO LARGE FFDS FOR CELL ENCAPSULATION IN ALGINATES," pp. 2003–2006, 2009.
- [189] M. Seo, Z. Nie, S. Xu, M. Mok, P. C. Lewis, R. Graham, and E. Kumacheva, "Continuous microfluidic reactors for polymer particles," *Langmuir*, vol. 21, no. 25, pp. 11614–11622, 2005.
- [190] P. E. Arratia, L. a. Cramer, J. P. Gollub, and D. J. Durian, "The effects of polymer molecular weight on filament thinning and drop breakup in microchannels," *New J. Phys.*, vol. 11, 2009.
- [191] P. E. Arratia, J. P. Gollub, and D. J. Durian, "Polymeric filament thinning and breakup in microchannels," *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.*, vol. 77, pp. 1–6, 2008.
- [192] Y. Lu, T. Fu, C. Zhu, Y. Ma, and H. Z. Li, "Scaling of the bubble formation in a flow-focusing device: Role of the liquid viscosity," *Chem. Eng. Sci.*, vol. 105, pp. 213–219, 2014.
- [193] J. K. Nunes, S. S. H. Tsai, J. Wan, and H. A. Stone, "Dripping and jetting in microfluidic multiphase flows applied to particle and fibre synthesis," *J. Phys. D Appl. Phys. J. Phys. D Appl. Phys.*, vol. 46, no. 46, pp. 114002–114002, 2013.
- [194] P. Guillot, A. Colin, and A. Ajdari, "Stability of a jet in confined pressure-driven biphasic flows at low Reynolds number in various geometries," *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.*, vol. 78, 2008.
- [195] J. Berthier, S. Le Vot, P. Tiquet, N. David, D. Lauro, P. Y. Benhamou, and F. Rivera, "Highly viscous fluids in pressure actuated flow focusing devices," *Sensors Actuators A Phys.*, vol. 158, no. 1, pp. 140–148, Mar. 2010.
- [196] E. R. Morris, A. N. Cutler, S. B. Ross-Murphy, D. A. Rees, and J. Price, "Concentration and shear rate dependence of viscosity in random coil polysaccharide solutions," *Carbohydr. Polym.*, vol. 1, no. 1, pp. 5–21, 1981.
- [197] C. Ouwerx, N. Velings, M. . Mestdagh, and M. A. . Axelos, "Physico-chemical properties and rheology of alginate gel beads formed with various divalent cations," *Polym. Gels Networks*, vol. 6, no. 5, pp. 393–408, 1998.
- [198] J. Berthier, S. Le Vot, P. Tiquet, N. David, D. Lauro, P. Y. Benhamou, and F. Rivera, "Highly viscous fluids in pressure actuated flow focusing devices," vol. 158, pp. 140–148, 2010.
- [199] H. K. Holme, L. Davidsen, A. Kristiansen, and O. Smidsrød, "Kinetics and mechanisms of depolymerization of alginate and chitosan in aqueous solution," *Carbohydr. Polym.*, vol. 73, no. 4, pp. 656–664, 2008.
- [200] Y. Amarouchene, "Etude de l'interaction polymère-écoulement," Université Bordeaux 1, 2002.
- [201] M. M. Awad and Y. S. Muzychka, "Effective property models for homogeneous two-phase flows,"

- Exp. Therm. Fluid Sci.*, vol. 33, no. 1, pp. 106–113, 2008.
- [202] S. Levy, *Two-Phase Flow in Complex System*. 1999.
- [203] A. Cicchitti, C. Lombardi, M. Silvestri, G. Soldaini, and R. Zavattarelli, “Two-phase cooling experiments: pressure drop, heat transfer and burnout measurements,” 1959.
- [204] B. J. Adzima and S. S. Velankar, “Pressure drops for droplet flows in microfluidic channels,” *J. Micromechanics Microengineering*, vol. 16, no. 8, pp. 1504–1510, 2006.
- [205] M. J. Fuerstman, A. Lai, M. E. Thurlow, S. S. Shevkoplyas, H. a Stone, and G. M. Whitesides, “The pressure drop along rectangular microchannels containing bubbles,” *Lab Chip*, vol. 7, no. 11, pp. 1479–1489, 2007.
- [206] V. Hourtané, “Écoulement De Mousse Dans Des Modèles De Milieux Poreux,” Université Bordeaux, 2014.
- [207] W. Engl, M. Roche, A. Colin, P. Panizza, and A. Ajdari, “Droplet traffic at a simple junction at low capillary numbers,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 95, no. 20, pp. 1–4, 2005.
- [208] V. Labrot, M. Schindler, P. Guillot, A. Collin, and M. Joanicot, “Extracting the hydrodynamic resistance of droplets from their behavior in microchannel networks,” *Biomicrofluidics*, vol. 3, no. 1, 2009.
- [209] D. A. Sessoms, M. Belloul, W. Engl, M. Roche, L. Courbin, and P. Panizza, “Droplet motion in microfluidic networks: Hydrodynamic interactions and pressure-drop measurements,” *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.*, vol. 80, no. 1, pp. 1–10, 2009.
- [210] J. Berthier, S. Le Vot, P. Tiquet, F. Rivera, and P. Caillat, “On the influence of non-Newtonian fluids on microsystems for biotechnology,” in *NanoTech 2009*, 2009.
- [211] B. Thu, P. Bruheim, T. Espevik, O. Smidsro, P. Soon-Shiong, and G. Skjak-Braek, “Alginate polycation microcapsules. I. Interaction between alginate and polycation,” *Biomaterials*, vol. 17, no. 10, pp. 1031–1040, 1996.
- [212] S. Schneider, P. J. Feilen, V. Slotty, D. Kampfner, S. Preuss, S. Berger, J. Beyer, and R. Pommersheim, “Multilayer capsules: A promising microencapsulation system for transplantation of pancreatic islets,” *Biomaterials*, vol. 22, pp. 1961–1970, 2001.
- [213] M. D. Tarn, R. F. Fakhrullin, V. N. Paunov, and N. Pamme, “Microfluidic device for the rapid coating of magnetic cells with polyelectrolytes,” *Mater. Lett.*, vol. 95, pp. 182–185, 2013.
- [214] C. Kantak, S. Beyer, L. Yobas, T. Bansal, and D. Trau, “A ‘microfluidic pinball’ for on-chip generation of Layer-by-Layer polyelectrolyte microcapsules,” *Lab Chip*, vol. 11, no. 6, pp. 1030–1035, 2011.
- [215] M. D. Tarn, M. J. Lopez-martinez, and N. Pamme, “On-chip processing of particles and cells via multilaminar flow streams,” pp. 139–161, 2014.
- [216] S. Seiffert, J. Thiele, A. R. Abate, and D. a. Weitz, “Smart microgel capsules from macromolecular precursors,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 132, no. 18, pp. 6606–6609, 2010.
- [217] L. Yu, C. Ni, S. M. Grist, C. Bayly, and K. C. Cheung, “Alginate core-shell beads for simplified three-dimensional tumor spheroid culture and drug screening,” *Biomed. Microdevices*, vol. 17, no. 2, 2015.
- [218] S. Sakai, S. Ito, H. Inagaki, K. Hirose, T. Matsuyama, M. Taya, and K. Kawakami, “Cell-enclosing gelatin-based microcapsule production for tissue engineering using a microfluidic flow-focusing

- system,” *Biomicrofluidics*, vol. 5, no. 1, pp. 1–7, 2011.
- [219] R. F. Shepherd, J. C. Conrad, S. K. Rhodes, D. R. Link, M. Marquez, D. a. Weitz, and J. a. Lewis, “Microfluidic assembly of homogeneous and janus colloid-filled hydrogel granules,” *Langmuir*, vol. 22, no. 21, pp. 8618–8622, 2006.
- [220] Z. Nie, W. Li, M. Seo, S. Xu, and E. Kumacheva, “Janus and ternary particles generated by microfluidic synthesis: Design, synthesis, and self-assembly,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, no. 29, pp. 9408–9412, 2006.
- [221] F. Ehrhart, E. Mettler, T. Böse, M. M. Weber, J. A. Vásquez, and H. Zimmermann, “Biocompatible Coating of Encapsulated Cells Using Ionotropic Gelation,” *PLoS One*, vol. 8, no. 9, pp. 1–9, 2013.
- [222] T. Cubaud and T. G. Mason, “Interacting viscous instabilities in microfluidic systems,” *Soft Matter*, vol. 8, no. 41, p. 10573, 2012.
- [223] C.-H. Choi, H. Yi, S. Hwang, D. A. Weitz, and C.-S. Lee, “Microfluidic fabrication of complex-shaped microfibers by liquid template-aided multiphase microflow.,” *Lab Chip*, vol. 11, no. 8, pp. 1477–1483, 2011.
- [224] M. Nasir, D. R. Mott, M. J. Kennedy, J. P. Golden, and F. S. Ligler, “Parameters affecting the shape of a hydrodynamically focused stream,” *Microfluid. Nanofluidics*, vol. 11, pp. 119–128, 2011.
- [225] S. Tripathi, P. Chakravarty, and A. Agrawal, “On non-monotonic variation of hydrodynamically focused width in a rectangular microchannel,” *Curr. Sci.*, vol. 107, no. 8, pp. 1260–1274, 2014.
- [226] Z. Wu and N. T. Nguyen, “Hydrodynamic focusing in microchannels under consideration of diffusive dispersion: Theories and experiments,” *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 107, no. 2, pp. 965–974, 2005.
- [227] T. Beneyton, I. P. M. Wijaya, P. Postros, M. Najah, P. Leblond, A. Couvent, E. Mayot, A. D. Griffiths, and A. Drevelle, “High-throughput screening of filamentous fungi using nanoliter-range droplet-based microfluidics,” *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 27223, Jun. 2016.
- [228] M. T. Guo, A. Rotem, J. a. Heyman, and D. a. Weitz, “Droplet microfluidics for high-throughput biological assays,” *Lab Chip*, vol. 12, no. 12, p. 2146, 2012.
- [229] J. Lim, O. Caen, J. Vrignon, M. Konrad, V. Taly, and J. C. Baret, “Parallelized ultra-high throughput microfluidic emulsifier for multiplex kinetic assays,” *Biomicrofluidics*, vol. 9, no. 3, 2015.