



HAL
open science

Nouvelles microcapsules fonctionnalisées et standardisées : Application à la thérapie cellulaire du diabète de type 1

Roxane Crouigneau

► **To cite this version:**

Roxane Crouigneau. Nouvelles microcapsules fonctionnalisées et standardisées : Application à la thérapie cellulaire du diabète de type 1. Médecine humaine et pathologie. Université Grenoble Alpes, 2019. Français. NNT : 2019GREAS033 . tel-02935632v2

HAL Id: tel-02935632

<https://theses.hal.science/tel-02935632v2>

Submitted on 11 Sep 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 COMMUNAUTÉ UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **BIS – Biotechnologie, Instrumentation, Signal et
Imagerie pour la Biologie, la Médecine et l'Environnement**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Roxane CROIGNEAU

Thèse dirigée par **Pierre-Yves BENHAMOU, Professeur,
Directeur de recherche, Université Grenoble Alpes**

préparée au sein du **Laboratoire Systèmes Microfluidiques et
Bio-Ingénierie (DTBS, LETI, CEA)**
dans l'**École Doctorale Ingénierie pour la Santé, la Cognition et
l'Environnement**

Nouvelles microcapsules fonctionnalisées et standardisées : Application à la thérapie cellulaire du diabète de type 1

Thèse soutenue publiquement le **6 décembre 2019**,
devant le jury composé de :

Madame Marianne WEIDENHAUPT

Maitre de conférences, Grenoble INP, Présidente

Madame Rosaria FERRIGNO

Professeure, Université Lyon 2, Rapportrice

Madame Séverine SIGRIST

Directrice de recherche, Université de Strasbourg, Rapportrice

Madame Sandrine GERBER

Professeure, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Examinatrice

Monsieur Pierre-Yves BENHAMOU

Professeur, CHU Grenoble Alpes, Directeur de thèse

Madame Florence RIVERA

Ingénieure-chercheuse, CEA-LETI, Co-encadrante, Invitée

Monsieur Frédéric BOTTAUSCI

Ingénieur-chercheur, CEA-LETI, Co-encadrant, Invité



Table des matières

Introduction générale	8
Chapitre 1 : Etat de l'art	14
1. Diabète de type 1 : thérapies existantes	18
2. Matériau d'encapsulation	38
3. Technologies de microencapsulation.....	50
4. Bilan et choix pour la thèse	68
Chapitre 2 : Positionnement de l'étude	70
1. Description du projet.....	72
2. Méthodologie suivie.....	73
3. Contraintes de l'étude	75
Chapitre 3 : Matériel et Méthodes	80
1. Banc expérimental et fabrication microfluidique	82
2. Solutions utilisées.....	90
3. Caractérisations physico-chimiques des solutions.....	93
4. Caractérisation des capsules	96
5. Encapsulation de cellules et d'îlots	98
Chapitre 4 : Pré-encapsulation	108
1. Phase de pré-encapsulation, méthodologie de l'étude.....	110
2. Caractérisation des alginates	116
3. Impact des fluides sur la viabilité.....	143
4. Bilan	145
Chapitre 5 : Encapsulation	148
1. Formation de gouttes, gélification, passage de l'interface	150
2. Caractérisation de l'interaction système microfluidique - fluide.....	158
3. Formation de gouttes	162
4. Gélification.....	174
5. Passage de l'interface huile-solution aqueuse de calcium	178
6. Bilan et production de capsules (choix du système microfluidique).....	181
Chapitre 6 : Post-Encapsulation	184
1. Caractérisation des capsules	186
2. Encapsulation de cellules.....	198
3. Encapsulation d'îlots.....	203

4. Test in vivo	221
5. Discussion	229
Conclusion Générale.....	232
Annexe 1 :	238
Proceedings 25th International conference on Bioencapsulation,	238
Juillet 2017.....	238
Annexe 2 :	242
Proceedings BioEngineering 2019 Summit.....	242
Références.....	246

Remerciements

Cette thèse s'est achevée après un CDD et un stage, de 6 mois chacun, c'est donc plus de quatre années passées aux côtés de mes collègues et partenaires que je vais tenter de résumer dans ces remerciements.

Je souhaite tout d'abord remercier l'Agence Nationale de la Recherche, qui a financé le projet FUTURCAPS et m'a donc permis de rester trois années supplémentaires au CEA afin d'effectuer cette thèse ; ainsi que Claude Vauchier, Béatrice Icard, et Fabrice Navarro, qui m'ont permis d'intégrer le Laboratoire de Bio-Chip et Bio-Packaging, puis le Laboratoire Systèmes Microfluidiques et Bio-ingénierie.

Je souhaite également remercier l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse. Merci à Séverine Sigrist et Rosaria Ferrigno, rapportrices, pour le temps précieux qu'elles ont accordé à la lecture et l'analyse approfondie de mon manuscrit, ainsi que pour leurs rapports très constructifs et positifs. Un grand merci également à Marianne Weidenhaupt, présidente du jury, ainsi qu'à Sandrine Gerber, d'avoir accepté d'examiner ces travaux. Je remercie tous les membres du jury pour les discussions passionnantes et enrichissantes qui ont suivi ma présentation.

Je remercie mon directeur de thèse Pierre-Yves Benhamou, pour les échanges toujours enrichissants et bienveillants que nous avons eu au cours de ces trois années. Un immense merci également à mes encadrants CEA Florence Rivera et Frédéric Bottausci, pour la confiance et le soutien sans faille qu'ils m'ont accordé. Ces trois années n'ont pas toujours été facile, et je ne sais pas si j'y serais arrivée sans votre aide, vos conseils, votre confiance, et votre encadrement. Florence, pour ta clarté d'esprit, tes remarques toujours pertinentes, qui m'ont poussée à donner le meilleur de moi-même, et Fred pour ton calme, ta patience et ta capacité à me faire prendre du recul, qui m'ont recentrée dans les moments de stress et de doute. Les liens que nous avons créés sont très importants pour moi, et j'espère qu'ils perdureront de très nombreuses années, je pense que c'est bien parti !

Les travaux effectués pendant cette thèse n'auraient également pas pu aboutir sans la collaboration précieuse avec tous les différents partenaires du projet, alors je tiens à adresser un grand merci à toute l'équipe de l'EPFL, en premier lieu Sandrine Gerber, avec qui les discussions ont toujours été très éclairantes, bienveillantes, et efficaces. I also would like to say a huge thank you to Luca Szabo, I feel really lucky to have ended up in partnership with you, the long days spent encapsulating were always very fun thanks to our discussions, your kindness and liveliness, and your precious help made those experiments really easier. Merci également à François Noverraz, dont le calme et l'assurance m'ont inspiré.

L'équipe de l'Hôpital de Genève a également été d'une aide très précieuse pendant cette thèse. Un grand merci tout d'abord à Léo Bühler, et Carmen Gonelle-Gispert, en particulier pour mon unique manipe in vivo (et je sais que j'ai été un peu insistante pour l'avoir !), et les moments passés à la paillasse ensemble, qui étaient très enrichissants et plaisants. Merci également à Elisa Montanari pour tout son travail sur l'isolation des îlots, l'optimisation des paramètres d'envoi, et également les moments passés au labo ensemble, qui m'ont toujours beaucoup plu. Un merci enfin à Joel Pimenta pour son aide avec les différents équipements du labo.

Un autre partenaire essentiel du projet était l'Université Grenoble Alpes, et plus précisément Sandrine Lablanche et Emily Tubbs. Je tiens à vous adresser un grand merci pour votre aide avec les expérimentations biologiques, et en particulier pour toutes nos journées passées au labo Emily, ton expertise scientifique m'a été autant utile que tes qualités humaines m'ont été

agréables. Enfin, merci à l'Établissement Français du Sang pour les îlots humains fournis au cours de ces trois ans de thèse.

Outre les différents partenaires du projet cités précédemment, cette thèse n'aurait pas pu aboutir, tant sur le plan scientifique qu'humain, sans l'aide de tous mes collègues au CEA. En premier lieu bien-sûr, je tiens à adresser un immense merci à Thibault Krammer, sans toi je ne sais pas si j'aurais réussi à aller au bout de ces trois années (qui ont connu des hauts et des bas, c'est le moins qu'on puisse dire !). Je pense que j'ai épuisé mon quota de chance pour un bon moment en tombant sur toi comme partenaire de thèse ! Ton humour, ta bonne humeur, ton soutien, tes valeurs, ta patience à m'écouter raconter ma vie, et nos duos sur Lady Gaga dans le labo, ont vraiment donné une saveur particulière à cette thèse. J'espère qu'on ne se perdra pas de vue, même si on finit à l'autre bout de la planète l'un de l'autre !

Je tiens également à adresser un grand merci à Claire Authesserre, ma maman de stage, qui m'a tout appris quand je suis arrivée. J'étais un peu trop impressionnée au début pour sympathiser, mais on a finalement noué une amitié qui en valait l'attente. J'espère qu'elle se maintiendra même maintenant que je suis loin de Grenoble !

Je souhaite également remercier toutes les personnes avec qui j'ai pu travailler au sein du département Biologie et Santé. J'ai eu la chance de travailler dans un environnement pluridisciplinaire et riche en compétences diverses en biologie, chimie, microfluidique, optique, mécanique... Un grand merci à François Boizot et Manuel Alessio pour la fabrication et l'assemblage des nombreuses cartes microfluidiques (et je sais qu'on était gourmands, entre le projet BIOCAPAN et FUTURCAPS !). Merci à Raymond Charles pour ses conseils et son aide lors de mes expérimentations sur cartes plastiques, ainsi qu'à Nathalie Dussert-Rosset et Barbara Coynel pour leur aide et leur efficacité sur les différentes missions et commandes (les tâches administratives ce n'est pas mon fort). Merci également à Pascal Mailley et Bertrand Bourlon pour leur aide sur ma présentation de soutenance, et à toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin au projet, que ce soit scientifiquement, ou humainement lors des pauses et des petits dej où j'ai dû faire prendre quelques kilos à plus d'une personne avec les viennoiseries que j'amenais ! Je ne citerai pas tout le monde de peur d'oublier des noms, mais j'espère que tout le monde se reconnaîtra.

Je tiens également à adresser un grand merci à toutes les personnes qui m'ont permis de passer de si bons moments au CEA, mais aussi en dehors, avec les sorties au bar, raclette, à la Bastille, ou au ski ! Sophie, dans mon top de coups de cœur CEA, même si tu m'as lâchée avant la fin de ma thèse ! Charlotte et Eloïse, les Tic et Tac, je suis heureuse d'avoir fait votre connaissance et gardé contact ; Thomas, même si tu nous as fait chier avec tes espaces insécables et la chute du grand capital, je suis vraiment contente d'avoir fait ta connaissance, et je garderai de supers souvenirs de nos discussions (et c'est une noble cause la chute du grand capital) ; Guillaume, même si on s'est moins vus sur la fin de ma thèse, je garde en mémoire toutes nos randos et sorties ; Mathilde et Prisca, la coloc de choc, j'aurais bien aimé passer plus de temps avec vous ; Raphaël, Charlotte, Mélissa, Clémentine, Emilie, Mathilde, Morgane, Maxime, David, Vivian, Hadrien, Emeric, Thomas.

Un grand merci à mes super colocs, trois ans ensemble ça crée des liens ! Et un immense merci à toute ma famille, qui m'a soutenu et a cru en moi tout le long, et plus particulièrement à Mamette pour s'être déplacée à ma soutenance avec ses 88 ans, ça m'a fait chaud au cœur de voir la fierté dans tes yeux !

Enfin, un immense merci à Aurélie, tout d'abord pour les moments passés ensemble au CEA, et ensuite pour ton soutien, ta patience, ta présence, ton écoute et tes conseils. Une des principales réussites de cette thèse aura été de me permettre de te rencontrer.

Introduction générale

Le diabète est une maladie qui constitue un problème de santé publique majeur : d'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), c'est « un des principaux tueurs au monde », avec l'hypertension artérielle et le tabagisme, et c'est la première pandémie de maladie non-contagieuse dans le monde. En effet, la prévalence du diabète a presque doublé depuis 1980, passant de 4,7 % à 8,5 %, et 422 millions de personnes sont aujourd'hui atteintes, soit 1 adulte sur 11. Malgré les efforts de prévention, la pandémie se poursuit, et la Fédération Internationale du Diabète (FID) prévoit 640 millions de diabétiques en 2040, soit 1 adulte sur 10.

Chez un individu sain, lorsque le taux de glucose dans le sang (ou glycémie) augmente (après un repas par exemple), une hormone est sécrétée par les cellules β des amas de cellules pancréatiques (appelés îlots de Langerhans) : l'insuline. Cette hormone permet aux organes possédant des récepteurs à insuline (comme le foie, les tissus adipeux et les muscles) d'utiliser ou de stocker le glucose. A l'inverse, lorsque la glycémie diminue (hypoglycémie), les cellules α des îlots de Langerhans sécrètent une autre hormone, le glucagon, qui permet au foie de libérer du glucose stocké au préalable. Chez un individu atteint de diabète, la régulation en cas d'hyperglycémie ne s'effectue plus correctement, pour deux raisons possibles : une production insuffisante d'insuline (diabète de type 1), ou une mauvaise utilisation de l'insuline par l'organisme (diabète de type 2).

Le diabète de type 1 touche environ 10 % de la population de diabétiques, et en particulier les enfants et jeunes adultes. C'est une maladie auto-immune, où le système immunitaire des malades détruit les cellules β des îlots de Langerhans, produisant l'insuline. La très faible quantité, voire absence d'insuline, entraîne alors une hyperglycémie, pouvant donner lieu à des complications multiples et sévères. D'après l'OMS et le Centre Européen d'Etude du Diabète (CEED), les principaux risques (concernant le diabète de type 1 et de type 2) sont les suivants :

- Multiplication par 7 du risque d'amputation : on compte en France 8 000 cas d'amputation dues au diabète par an, et 5 à 10 % des diabétiques seront amputé·e·s de l'orteil, du pied ou de la jambe.
- Multiplication par 2,2 et 1,6 du risque d'infarctus du myocarde ou d'accident vasculaire cérébral respectivement.
- Multiplication par 9 du risque de dialyse pour insuffisance rénale terminale.
- Cécité : 2,6 % de la cécité dans le monde peut être attribuée au diabète¹.

Dans le cadre du diabète de type 1, le traitement utilisé dans la majorité des cas par les patient·e·s est l'injection pluriquotidienne d'insuline exogène. Ce traitement permet de réguler la glycémie et de réduire certains effets du diabète, mais la régulation n'est pas aussi précise et rapide que celle obtenue naturellement avec les cellules β des îlots de Langerhans. Les malades peuvent donc être confronté·e·s à des pics d'hyperglycémie ou d'hypoglycémie, pouvant entraîner le décès du·de la patient·e.

C'est la raison pour laquelle la médecine s'intéresse depuis des années à l'utilisation de la thérapie cellulaire. Cette technique consiste à implanter des cellules chez un·e patient·e, pour remplacer ou suppléer des cellules défaillantes ou absentes. Dans le cadre du diabète de type 1, les cellules greffées sont des îlots de Langerhans provenant d'un·e donneur·se en état de mort cérébrale. Ces îlots sont tout d'abord isolés du pancréas du·de la donneur·se, selon un protocole développé dans les années 2000 (le protocole Edmonton), et sont ensuite greffés chez le·a patient·e, généralement au niveau du foie par cathétérisme de la veine porte. Ce traitement a montré de bons résultats dans la régulation de la glycémie, cependant, il est utilisé uniquement dans des cas de diabètes graves, pour lesquels les traitements habituels ne fonctionnent plus, car il présente un inconvénient majeur, qui est la nécessité de le coupler à des traitements immunosuppresseurs. En effet, sans ces derniers, la greffe est rejetée par le·a patient·e, or ces traitements

immunosuppresseurs rendent les patient·e·s plus vulnérables face à d'autres maladies et infections, et provoquent de nombreux effets secondaires comme une diminution de la guérison des plaies, ou un dysfonctionnement rénal².

Afin de contourner la nécessité d'utiliser les traitements immunosuppresseurs, la recherche s'est donc concentrée depuis quelques années sur l'encapsulation des îlots au préalable de la greffe. L'encapsulation d'îlots consiste à appliquer une membrane semi-perméable autour des îlots, afin de les protéger d'un contact direct avec l'hôte, tout en maintenant un transport bidirectionnel des molécules importantes : insuline, glucose, oxygène et nutriments. Cette technique permet donc de greffer les patient·e·s sans avoir recours à un traitement immunosuppresseur. La taille de la membrane peut varier, et définit trois catégories d'encapsulation : la macroencapsulation, la microencapsulation, et la nanoencapsulation. La méthode qui semble la plus adaptée est la microencapsulation. Elle a été utilisée pour la thérapie cellulaire du diabète de type 1 pour la première fois en 1980³, et a fait l'objet de nombreuses études depuis, *in vitro* et *in vivo*. Les résultats obtenus sont très encourageants, mais des optimisations sont encore nécessaires.

Les matériaux utilisés pour former ces microcapsules sont principalement des hydrogels, et parmi les hydrogels, l'alginate est celui qui est le plus largement utilisé. Ce polymère présente en effet les avantages d'être biocompatible, de gélifier en conditions physiologiques grâce à des cations divalents, et de présenter une perméabilité adaptée à l'application souhaitée. Cependant, il présente également certaines limitations, comme ses propriétés mécaniques.

Afin d'améliorer les propriétés mécaniques de l'alginate, certaines équipes développent donc des procédés de modification chimique de ce dernier, afin de former des liaisons covalentes au sein des gels. Ces liaisons covalentes, qui s'ajoutent aux liaisons ioniques formées avec les cations divalents lors de la gélification, confèrent à l'alginate une plus grande stabilité mécanique et déformation élastique.⁴⁻⁶

Concernant l'encapsulation, deux principales technologies sont utilisées : les technologies de goutte à goutte, et les technologies en microfluidique. Les technologies de goutte à goutte consistent en une formation de gouttes d'alginate contenant les cellules, à travers une seringue, ces gouttes tombent ensuite dans une solution aqueuse contenant l'agent gélifiant. Cette technique présente l'avantage de permettre d'atteindre des fréquences de productions élevées pour des alginates peu visqueux, et d'être facile d'utilisation ; cependant, différents inconvénients s'en dégagent, comme le contrôle limité de la taille et de la forme des capsules obtenues, et une gamme de fonctionnement limitée en termes de taille de capsules (minimum 500 μm de diamètre en moyenne) et de viscosité de polymère (maximum 200 mPa.s en moyenne). D'autre part, après un certain temps de production de capsules, ces dernières sont récupérées, rincées, et transférées dans une solution de sérum physiologique ou de milieu de culture, manuellement. Ces capsules présentent donc des temps de gélification variables (entre la première et la dernière produite), et sont peu reproductibles au sein d'un même lot.

La microfluidique est la science et la technologie de la manipulation de faibles volumes de fluides dans des canaux micrométriques. L'utilisation de la microfluidique pour l'encapsulation de cellules a démarré dans les années 2000, et n'a cessé de se développer depuis. Les différents dispositifs utilisés permettent de former des capsules sphériques, monodisperses, de taille contrôlée pouvant aller de quelques micromètres à 1 mm de diamètre, avec des polymères sur une large gamme de viscosité (jusqu'à plusieurs Pa.s). De plus, l'utilisation de la microfluidique permet de développer un transfert automatique des capsules, et d'être ainsi plus reproductible.

Au sein du laboratoire dans lequel a été effectué cette thèse, une plateforme microfluidique d'encapsulation automatisée de cellules, appelée carte Cellenc™, a été développée (Figure 1),

notamment dans le cadre des thèses de Sophie Le Vot, Prisca Dalle⁷, et Claire Authesserre⁸. Elle permet d'encapsuler des cellules avec un système utilisant en entrée de l'alginate contenant les cellules, et produisant en sortie, de manière automatique et reproductible, les cellules encapsulées directement en sérum physiologique ou milieu de culture (transférées automatiquement au sein du système).

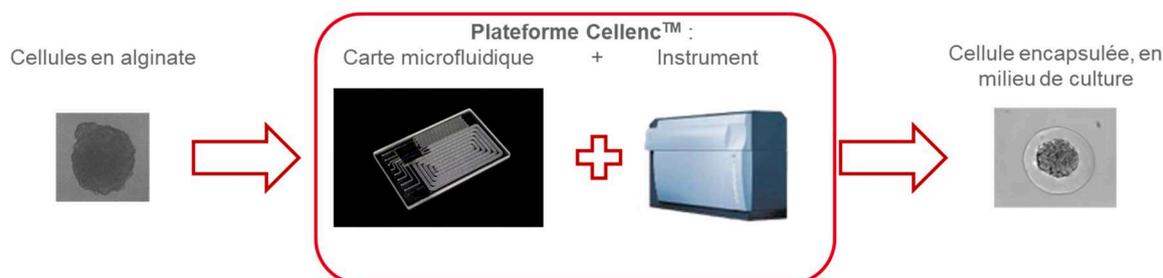


Figure 1 : Plateforme Cellenc™ : système d'encapsulation microfluidique automatisé et reproductible

Cette thèse a pour but de combiner les avancées effectuées au niveau des modifications chimiques de l'alginate, aux développements effectués au sein du laboratoire au niveau du système microfluidique d'encapsulation. Pour cela, elle s'inscrit dans un projet collaboratif entre plusieurs partenaires : le CEA de Grenoble (qui développe le système microfluidique et effectue les encapsulations), l'Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (qui développe les alginates modifiés chimiquement), l'Hôpital de Genève (qui fournit les îlots de porc et font les implantations in vivo), l'Université Grenoble Alpes (qui effectue des caractérisations in vitro), et l'Etablissement Français du Sang (qui fournit des îlots humains).

Les objectifs précis de cette thèse sont donc :

- De réussir à produire des capsules d'alginates modifiés chimiquement, dont les propriétés physico-chimiques sont différentes, avec le système microfluidique ayant été développé sur des alginates de référence commerciaux.
- De caractériser ces capsules pour s'assurer de la possibilité de les utiliser pour des applications biologiques.
- De réussir à encapsuler des îlots de porc et humains avec les différents alginates étudiés.
- De caractériser les îlots encapsulés in vitro et in vivo.

Afin de présenter les méthodologies suivies et les résultats obtenus, le manuscrit s'organise comme suit :

- Le **Chapitre 1** présente plus en détails les différentes thérapies pour le diabète, les types d'encapsulations, les matériaux utilisés et les technologies de microencapsulation, qui ont été vus brièvement dans cette introduction. La comparaison des différents résultats accessibles dans la littérature permettra de mettre en évidence les choix effectués pour cette thèse, concernant les matériaux et la technologie d'encapsulation.
- Le **Chapitre 2** positionne le contexte de cette étude, les principaux problèmes qui ont été rencontrés, et les méthodologies suivies afin d'y remédier.
- Le **Chapitre 3** décrit les matériels et protocoles utilisés, ainsi que les méthodes mises en œuvre afin d'atteindre les objectifs fixés dans cette thèse.
- Le **Chapitre 4** présente les résultats des différentes caractérisations qui ont dû être faites en amont de l'encapsulation, afin de mieux contrôler les paramètres à appliquer.

- Le **Chapitre 5** se concentre sur les différents paramètres entrant en jeu lors de la formation des gouttes et de leur gélification, ainsi que les caractérisations qui ont dû être effectuées pour mieux maîtriser l'encapsulation.
- Le **Chapitre 6** présente les capsules obtenues, leurs caractérisations, ainsi que les résultats d'encapsulations d'îlots in vitro et in vivo

Les résultats et développements effectués dans cette thèse permettront ainsi de déterminer tout d'abord s'il est possible d'adapter le système microfluidique développé sur un alginate de référence à d'autres alginates, et enfin les conditions optimales en termes de polymère et de procédé d'encapsulation, afin d'obtenir des résultats permettant d'envisager des essais cliniques dans le futur

Chapitre 1 : Etat de l'art

1. Table des matières

1. Diabète de type 1 : thérapies existantes	18
1.1. Thérapies pour le diabète de type 1	18
1.1.1. Injections d'insuline : avantages et inconvénients.....	18
1.1.2. Transplantation de pancréas complet.....	21
1.1.3. Thérapie cellulaire.....	21
1.1.3.1. Allogreffe.....	22
1.1.3.2. Xenogreffe.....	24
1.1.3.3. Traitements immunosuppresseurs.....	25
1.2. Encapsulation d'îlots.....	25
1.2.1. Macroencapsulation.....	26
1.2.1.1. Macroencapsulation extravasculaire	26
1.2.1.2. Macroencapsulation intravasculaire.....	28
1.2.2. Microencapsulation.....	29
1.2.3. Nanoencapsulation.....	30
1.2.4. Résumé des essais cliniques en cours	31
1.3. Bilan et paramètres critiques.....	34
1.3.1. Paramètres dépendant du matériau d'encapsulation.....	35
1.3.1.1. Biocompatibilité-Biotolérance	35
1.3.1.2. Caractère hydrophile et charge	35
1.3.1.3. Perméabilité	35
1.3.1.4. Propriétés mécaniques et biodégradabilité	36
1.3.2. Paramètres dépendant du type d'encapsulation (macro, micro, nano).....	36
1.3.2.1. Taille des capsules	36
1.3.2.2. Forme des capsules et état de surface	36
1.3.2.3. Possibilité d'utiliser des viscosités variées.....	36
1.3.2.4. Cisaillement	36
2. Matériau d'encapsulation	38
2.1. Polymères utilisés pour l'encapsulation de cellules.....	38
2.1.1. Polymères synthétiques.....	38
2.1.2. Polymères naturels.....	41
2.2. Alginate	44
2.2.1. Composition	44

2.2.2.	Gélification.....	45
2.2.3.	Propriétés physico-chimiques des gels d'alginate	47
2.2.3.1.	Propriétés mécaniques	47
2.2.3.2.	Biodégradabilité - stabilité	48
2.2.3.3.	Biotolérance.....	48
2.2.3.4.	Perméabilité	49
2.2.4.	Modifications chimiques de l'alginate	49
3.	Technologies de microencapsulation.....	50
3.1.	Technologies de dripping	51
3.1.1.	Régime de goutte à goutte par gravité	51
3.1.2.	Régime de goutte à goutte avec potentiel électrostatique.....	52
3.1.3.	Régime de goutte à goutte avec flux d'air co-axial	54
3.1.4.	Segmentation de jet par vibration.....	54
3.1.5.	Segmentation de jet par disque rotatif.....	55
3.1.6.	Bilan des technologies de dripping.....	56
3.2.	Microfluidique.....	57
3.2.1.	Dispositifs de génération de goutte.....	57
3.2.2.	Jonction-T et jonction-Y.....	58
3.2.3.	Jonction-croix	59
3.2.4.	Géométrie à co-écoulement coaxial.....	59
3.2.5.	Géométries à focalisation d'écoulement (Flow Focusing Device)	60
3.2.6.	Géométrie utilisée pour la thèse	62
3.2.7.	Intégration de la gélification en microsystème	63
3.2.7.1.	Gélification interne	63
3.2.7.2.	Gélification externe.....	64
3.3.	Bilan et comparaison des technologies de microencapsulation.....	67
4.	Bilan et choix pour la thèse.....	68

1. Diabète de type 1 : thérapies existantes

Le diabète est une maladie très répandue, et le nombre de personnes concernées est en constante augmentation. D'après la Fédération Internationale du Diabète, 422 millions de personnes sont atteintes dans le monde (type 1 et type 2 confondus), et l'Organisation Mondiale de la Santé prévoit 640 millions de diabétiques d'ici 2040. Cette maladie est à l'origine de 5 millions de décès en 2015, ce qui représente plus que le sida, la tuberculose et la malaria.

Sur ces 422 millions de diabétiques, environ 90% sont atteint·e·s du diabète de type 2 et environ 10% du diabète de type 1. Comme présenté précédemment, le diabète de type 1 est une maladie auto-immune entraînant chez le·a patient·e atteint·e la destruction des cellules β des îlots de Langerhans, productrices d'insuline. Il existe aujourd'hui différentes thérapies permettant de limiter les effets du diabète, décrites dans la suite de cette partie, mais aucune thérapie permettant de soigner définitivement les patient·e·s.

1.1. Thérapies pour le diabète de type 1

1.1.1. Injections d'insuline : avantages et inconvénients

Actuellement, la majorité des patient·e·s atteint·e·s de diabète de type 1 sont soigné·e·s par apport d'insuline exogène. Il existe sur le marché français une trentaine d'insulines commercialisées par trois laboratoires pharmaceutiques : Lilly, Novo Nordisk et Sanofi. Ces insulines peuvent être classées en 5 catégories :

- Les **insulines à action rapide** : elles agissent dans un délai de 30 minutes et ont une durée d'action d'environ 6 heures. Elles doivent être injectées 30 minutes avant le repas.
- Les analogues rapides de l'insuline, ou **insulines ultra-rapides** : elles sont actives 15 minutes après l'injection et ont une durée d'action de 3 heures environ. Elles sont injectées juste avant le repas.
- Les **insulines semi-lentes ou intermédiaires** : elles ont un début d'action dans les 60 minutes et une durée d'action d'environ 12 heures.
- Les **insulines retard** ou prolongées : elles ont un début d'action dans l'heure ou dans les 2 heures et une durée d'action de 24 heures.
- Les **mélanges d'insuline** : ils associent dans des proportions variées des insulines rapides ou ultra-rapides à des insulines semi-lentes.

Ces insulines peuvent être injectées de deux manières différentes :

- Par injections pluriquotidiennes, à l'aide d'un **stylo à insuline** : il s'agit d'un appareil ayant la forme et la taille d'un stylo, à l'intérieur duquel se situe une cartouche d'insuline, et un dispositif permettant de régler la dose d'insuline à administrer et d'assurer son injection (voir Figure 2).

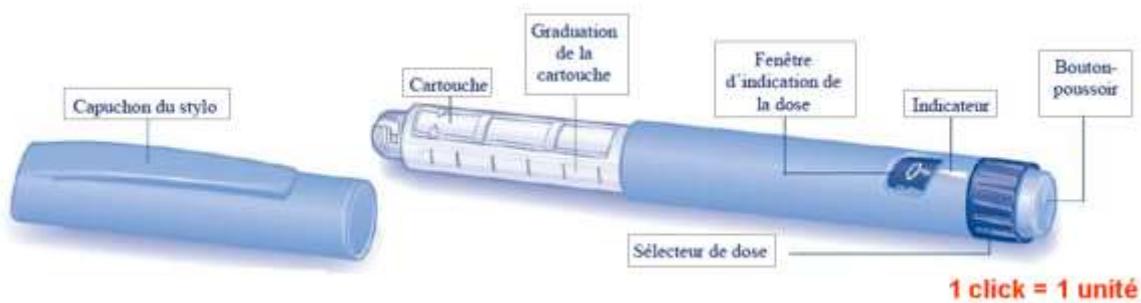


Figure 2 : Schéma de fonctionnement du stylo à insuline jetable⁹

- Par perfusion grâce à une **pompe à insuline** : il s'agit d'un réservoir contenant de l'insuline ultra-rapide, qui est transfusée au patient-e par un dispositif de cathéter et tubulure déconnectable, et grâce à un moteur électrique contenu dans un boîtier, qui suit des paramètres programmés (voir Figure 3). Cela permet de contrôler continuellement de manière précise la quantité d'insuline transfusée.

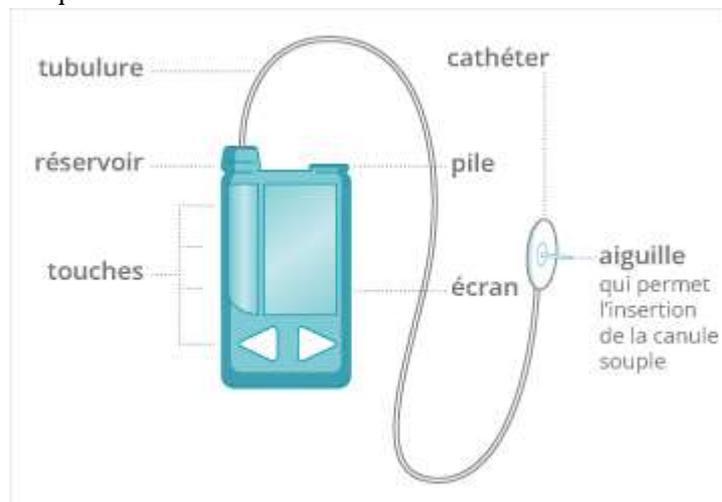


Figure 3 : Schéma de fonctionnement de la pompe à insuline¹⁰

Le choix du type d'insuline et son mode d'administration (injections ou pompe à insuline) est effectué par le médecin, en collaboration avec le patient-e. Il dépend de nombreux critères :

- Le profil glycémique du patient-e
- Son âge
- Le choix du patient-e
- L'autonomie du patient-e
- Son mode de vie

Dans le cas d'injections pluriquotidiennes d'insuline, à l'aide d'un stylo à insuline, le schéma de base est le suivant (il est adapté par le médecin et le patient-e au cas par cas) :

- 1 à 2 injection(s) d'insuline lente dans la journée, appelée **insuline basale** ou insuline pour vivre.
- **L'insuline pour manger** (ou bolus) : une injection d'insuline rapide ou ultra-rapide avant le repas, calculée en fonction du nombre de glucides ingérés.

-
- **L'insuline de correction** : une injection d'insuline rapide ou ultra-rapide, afin de corriger la glycémie si elle est trop élevée dans la journée.

Dans le cas d'une pompe à insuline, le schéma suivi est également de type basal-bolus :

- Un **débit basal** est délivré continuellement : petites doses d'insuline rapide, tout au long de la journée.
- Un **bolus** : dose supplémentaire d'insuline adaptée au moment des repas pour couvrir les glucides absorbés à cette occasion, lors d'une collation, ou pour corriger une hyperglycémie.

Concernant le contrôle de la glycémie, des systèmes de mesure de glycémie en continu (Continuous Glucose Monitoring CGM) ont été développés dans les années 1990 : ils consistent dans la plupart des cas en : 1) un capteur qui est généralement inséré dans les tissus sous-cutanés, 2) un transmetteur qui transmet les informations recueillies par le capteur, 3) un moniteur qui affiche les informations recueillies par le capteur et transmises par le transmetteur (dans certains cas, le moniteur peut être le smartphone du-de la patient-e)¹¹. Ces systèmes de CGM permettent aux patient-e-s ainsi qu'à leurs médecins d'avoir des informations plus précises sur la glycémie et ainsi d'ajuster les traitements et obtenir une meilleure régulation de la glycémie.

Par la suite, la recherche s'est concentrée sur le fait de coupler ce système de CGM en temps réel à une pompe à insuline, ainsi qu'un algorithme de contrôle, dans le but de créer des appareils d'insulinothérapie automatisés à boucle fermée. Les données de glycémie en temps réel recueillies par le dispositif de CGM sont transmises sans fil (via Bluetooth généralement) à l'algorithme de contrôle, qui est soit incorporé dans la pompe à insuline, soit hébergé sur un appareil indépendant (comme un smartphone). L'algorithme analyse alors les résultats en temps réel et donne les instructions d'injection d'insuline à la pompe. Les mesures de glycémie sont effectuées toutes les 5 minutes¹².

Ces systèmes à boucle fermée peuvent être soit hybrides (semi-automatisés) : l'utilisateur-trice doit renseigner ses repas et activités physiques, soit à boucle fermée complète : le dosage de l'insuline ne nécessite pas d'information sur les repas et présente l'avantage d'une intervention réduite du-de la patient-e¹². Le premier dispositif d'insulinothérapie à boucle fermée ayant été approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) est le Medtronic Minimed CGM, commercialisé en 1999 par la société Medtronic¹³. Ce système était constitué d'un capteur de glucose sous-cutané, d'un capteur, d'un câble connectant les deux, ainsi que d'une ComStation compatible avec Windows 95. Le système a par la suite été amélioré à plusieurs reprises, et le modèle le plus récent est le Guardian Sensor 3 en conjonction avec la pompe à insuline Medtronic 670G, utilisant un système à boucle fermée hybride. D'autres sociétés ont développé des systèmes à boucle fermée, comme Abbott avec le Freestyle Libre, Dexcom avec le G6, ou encore la société Diabeloop© en France. Dans le cadre de Diabeloop©, le système est semi-automatisé (hybride) puisque l'algorithme calcule la juste dose d'insuline à envoyer en analysant les résultats en temps réel du système de CGM, et en prenant en compte également la physiologie et l'historique du patient, ainsi que les données sur ses repas et son activité physique¹⁴. Une étude menée durant 12 semaines chez 68 adultes diabétiques de type 1 dans 12 centres français a montré la supériorité de ce dispositif par rapport à une pompe à insuline classique¹⁵. En effet, le temps dans la cible glycémique (70-180 mg/dL) a été augmenté de 2,2 heures par jour en moyenne, et le temps en hypoglycémie réduit de moitié, soit 32 minutes par jour¹⁵. Ces différents dispositifs représentent donc un réel espoir vers une thérapie moins contraignante pour les patients diabétiques de type 1.

Pour plus de détails sur les dispositifs développés par les autres sociétés, il est possible de se référer à la revue de Allen et Gupta¹³.

Ces différents traitements à base d'apport d'insuline exogène permettent donc de réguler la glycémie à long terme, et d'améliorer considérablement les conditions de vie des patient·e·s. Cependant, ils sont encore très contraignants, particulièrement pour l'administration par injection à l'aide du stylo, car les patient·e·s doivent tout d'abord subir des injections plusieurs fois par jour toute leur vie, et également contrôler en continu de manière précise leur alimentation et leur glycémie, afin d'adapter les doses d'insuline administrées. Même si la pompe à insuline et le système développé par Diabeloop© permettent de s'affranchir d'une partie des contraintes des injections au stylo, il est toujours nécessaire de contrôler son alimentation, et ils imposent de porter continuellement l'appareil sur soi, ce qui représente une contrainte supplémentaire. Par ailleurs, l'utilisation d'insuline exogène ne fournit pas un contrôle aussi précis et rapide que les îlots de Langerhans présents chez les patient·e·s sains, et n'empêche donc pas toujours les pics d'hyperglycémie et hypoglycémie^{16,17}. Or des états d'hypoglycémie sévères peuvent être à l'origine de comas et décès, et des épisodes répétés d'hyperglycémie peuvent entraîner de lourdes complications telles que des maladies cardiaques, des insuffisances rénales et une perte de vue¹⁷⁻²⁰.

1.1.2. Transplantation de pancréas complet

Il est également possible de soigner les patient·e·s atteint·e·s de diabète de type 1 à l'aide d'une greffe de pancréas provenant d'un don d'organe d'un·e patient·e décédé·e.

La greffe de pancréas complet permet au·à la patient·e de retrouver un taux de glycémie normal de manière durable et fiable^{16,21}. Actuellement, la survie du greffon est de 82 % au bout d'un an, et de 58 % au bout de 5 ans. Ces résultats montent à 89 % et 71 % respectivement, pour des greffes de pancréas et rein à la fois^{16,22}. Cependant, la procédure est très complexe, et expose les patient·e·s à un risque chirurgical, en plus de la nécessité d'un traitement immunosuppresseur à vie. Comme expliqué précédemment, ces traitements sont très lourds et présentent de nombreux risques et effets secondaires. C'est la raison pour laquelle elle est réservée à de rares cas de diabètes très sévères, pour lesquels les traitements habituels ne fonctionnent plus, ou bien dans les cas où le·a patient·e doit déjà subir une greffe de rein.

Afin d'éviter d'avoir recours à une chirurgie invasive, et de palier aux limitations de l'insuline exogène, une autre thérapie prometteuse est la thérapie cellulaire.

1.1.3. Thérapie cellulaire

La thérapie cellulaire consiste en une greffe de cellules saines, afin de remplacer ou suppléer des cellules défaillantes. Dans le cas du diabète de type 1, les cellules greffées sont donc les cellules β d'îlots de Langerhans (amas de cellules endocrines du pancréas), qui sont les cellules produisant l'insuline dans le pancréas. Ces cellules peuvent provenir du·de la patient·e (greffe autologue), d'un autre individu (greffe allogénique), ou bien d'une autre espèce (greffe xénogénique). Les greffes autologues permettent de ne pas avoir de rejet de greffe. Selon le type de greffe, les cellules provoquent une réponse plus ou moins importante du système immunitaire du·de la patient·e.

Une greffe autologue n'engendre généralement pas de réponse immunitaire, mais dans le cas du diabète de type 1, la maladie étant auto-immune, même des cellules autologues seraient détruites. De plus, une greffe de cellules β des îlots de Langerhans autologue n'est pas possible puisque le patient·e n'en possède plus. Une greffe autologue de cellules souches différenciées en cellules pancréatiques peut cependant être envisagée, mais ces cellules présentent des risques élevés de différenciations non contrôlées donnant lieu à des développements de tumeurs²³⁻²⁵. Les greffes allogéniques et xénogéniques engendrent toujours une réponse plus élevée du système immunitaire, qui détecte les cellules greffées comme un corps étranger, et les détruit, entraînant un rejet de la greffe. Le patient·e doit donc coupler ces greffes à un traitement immunosuppresseur visant à réduire cette réponse immunitaire.

Pour le diabète de type 1, la thérapie cellulaire permet donc de fournir au patient·e de nouvelles cellules pancréatiques fonctionnelles, qui une fois dans l'organisme, produisent de l'insuline naturellement lorsque celui-ci en a besoin, dans le but de ne plus recourir à l'insuline exogène. Actuellement, les greffes effectuées sont des greffes allogéniques : les îlots de Langerhans proviennent de donneur·se·s humain·e·s décédé·e·s²⁶.

1.1.3.1. Allotransplantation

En 1964, Hellerström a réussi pour la première fois à isoler des îlots de Langerhans par microdissection sur du tissu pancréatique^{27,28}. Cependant, la procédure était compliquée et la quantité d'îlots récupérés faible. En 1965, Moskalewski a décrit une méthode d'isolation des îlots de Langerhans de cochon d'Inde par digestion du tissu pancréatique exocrine grâce à de la collagénase²⁹. Cette technique a tout d'abord été améliorée par Lacy et Kostianovsky³⁰, puis de nouveau à de nombreuses reprises, jusqu'à développer dans les années 2000 le protocole Edmonton³¹, qui est celui utilisé aujourd'hui pour la greffe d'îlots. Ce protocole consiste en une première étape d'isolation des îlots de Langerhans présents dans le pancréas d'un·e donneur·se·s humain·e décédé·e. Ces îlots sont ensuite transplantés dans le foie du·de la patient·e, via la veine porte. Cette nouvelle technique a donné lieu au premier exemple de traitement viable pour des patient·e·s atteint·e·s de diabète de type 1. En effet, suite à cette greffe, sept patient·e·s ont atteint une indépendance à l'insuline pendant un an³¹. Ces dernières années, les avancées sur ce protocole ont conduit à un essai clinique en phase 3. Entre 50 % et 70 % des patient·e·s ayant reçu une greffe ne sont plus dépendant·e·s d'insuline exogène après 5 ans, d'après différents rapports de cliniques de transplantation^{32,33}.

Ce traitement présente de bien meilleurs résultats que la greffe de pancréas total. Actuellement, c'est donc le traitement privilégié pour les patient·e·s ne répondant pas ou plus au traitement d'insuline. Il est cependant confronté à la pénurie de donneur·se·s pancréatiques³².

Afin de contourner la problématique de pénurie de donneur·se·s, la recherche se concentre depuis plusieurs dizaines d'années sur l'utilisation de cellules souches. En effet, ces cellules peuvent fournir une source illimitée de cellules sécrétrices d'insuline, et permettent également d'améliorer la survie et la fonctionnalité lors de transplantation d'îlots³⁴. Il existe quatre principales catégories de cellules souches utilisées pour la thérapie cellulaire : les cellules souches embryonnaires (human Embryonal Stem Cells ESC), les cellules souches fœtales (Fetal Stem Cells FSC), les cellules souches somatiques (ou adultes) (Somatic Stem Cells SSC), et les cellules souches pluripotentes induites (induced Pluripotent Stem Cells iPSC)^{23,34}. Dans le cadre du diabète de type 1, les cellules souches les plus utilisées sont les ESC, les SSC et les iPSC (pour les SSC, plus particulièrement les cellules souches mésenchymateuses MSC).

Les ESC sont des cellules pluripotentes qui donnent lieu à tout type de cellule somatique lors du développement d'un embryon. Différentes recherches ont identifié les signaux moléculaires qui

permettent de déclencher le développement de cellules β ^{34,35}, permettant ainsi de différencier les ESC en des cellules progénitrices du pancréas, endocrines, ou des cellules β sécrétrices d'insuline. Pour plus de détails sur les facteurs de transcription entrant en jeu, il est possible de se référer à différents articles et revues^{34,35}. Un essai clinique utilisant des ESC est en cours aux Etats-Unis, avec le produit PEC-Encap (VC-01) commercialisé par la société ViaCyte³⁴.

Les SSC sont présentes dans des tissus différenciés, et ont pour fonction le maintien et la régénération de tissus âgés ou abîmés par remplacement des cellules^{23,36}. Les SSC les plus utilisées pour le diabète de type 1 sont les cellules souches mésenchymateuses (MSC), qui sont des cellules souches multipotentes pouvant se différencier en divers types cellulaires (ostéoblastes, chondrocytes, myocytes, adipocytes). Elles peuvent être trouvées dans la moelle osseuse, dans les cellules ou le sang du cordon ombilical, les tissus adipeux, les tissus dentaires (cellules souches bucco-dentaires), ou dans le liquide amniotique. Dans le cadre de la thérapie cellulaire du diabète de type 1, les MSC sont souvent utilisées en co-transplantation avec des îlots, car elles ont des effets anti-apoptotiques et pro-angiogéniques^{34,37}, ainsi que des propriétés immunomodulatrices (modulant l'activité des cellules immunitaires comme les cellules dendritiques, les lymphocytes NK, B, et les lymphocytes T cytotoxiques), réduisant ainsi la présence de cytokines pro-inflammatoires^{34,38}. Elles peuvent également être utilisées après différenciation en cellules sécrétrices d'insuline, ou en amas de cellules pancréatiques de type îlot (Islet like Cell Cluster ICC)³⁹⁻⁴¹.

Les iPSC sont des cellules souches spécialisées formées à partir de cellules somatiques. Elles présentent l'avantage de pouvoir être formées à partir des cellules des patient·e·s, et d'être donc spécifiques à ces dernier·ère·s. Différentes recherches ont en effet déterminé les facteurs de transcription permettant de former des iPSC spécifiques au diabète de type 1 à partir de cellules somatiques de patient·e·s atteint·e·s de diabète de type 1^{34,42,43}, ainsi que les voies de signalisation et les régulateurs contrôlant la différenciation cellulaire⁴⁴. Ces avancées ont permis de produire des cellules progénitrices du pancréas, qui répondent aux stimulations par le glucose et sécrètent de l'insuline, et ont été transplanté dans des souris⁴⁵.

Il existe cependant divers obstacles à l'utilisation clinique des cellules souches. Le principal risque est la formation de tumeurs par transformation maligne de ces dernières. En effet, les cellules souches ont des caractéristiques très similaires à celles des cellules cancéreuses, comme la longue durée de vie, une résistance relative à l'apoptose, et une capacité à se répliquer sur une longue période de temps^{23,46,47}. Le risque d'apparition de tumeur peut varier en fonction du type de cellule souche, du site d'administration, ou des conditions de cultures²³, mais de nombreuses études témoignent d'apparition de tumeurs après une thérapie cellulaire utilisant des cellules souches^{23,46,48-57}. De plus, pour les cellules issues d'ESC, il est difficile de maintenir les conditions de cultures homogènes afin de générer des populations de cellules stables génétiquement, et les taux de survie des cellules, ainsi que leur fonctionnalité en réaction au glucose sont variables. Concernant les cellules issues d'iPSC, leur formation est complexe, elle nécessite une expression forcée de facteurs de transcription afin d'imiter les étapes normales de développement du pancréas⁵⁸, et les analyses d'expression des gènes ont montré que les cellules β dérivées d'iPSC ne se comportent pas exactement comme des cellules β adultes matures, mais plus comme des cellules β embryonnaires⁵⁹. Ces différents obstacles limitent à l'heure actuelle l'utilisation de cellules souches pour la thérapie cellulaire du diabète de type 1.

1.1.3.2. Xenotransplantation

Il existe une alternative aux greffes de pancréas total, d'îlots de Langerhans humains, et de cellules souches, qui permettrait de répondre aux problèmes de pénurie de donneur·e·s pancréatiques sans présenter de risques de formation de tumeurs : la xénotransplantation, ou greffe d'îlots de Langerhans provenant d'une autre espèce. Les îlots les plus étudiés pour cette option sont les îlots de porc, car ils sont proches des tissus humains^{16,60-62}. L'insuline de porc présente 98 % de similitude avec l'insuline humaine (un seul acide aminé de différence), et il a été démontré que les cellules β de porc entraînent moins de risque d'attaque auto-immune que des cellules provenant d'autres espèces^{60,63,64}.

La première transplantation d'îlots provenant de pancréas de porc a été effectuée dans les années 1990 par Groth *et al*^{65,66}. Dans cette étude, qui a ouvert la voie à l'utilisation de la xénotransplantation pour le traitement du diabète de type 1, des amas de cellules fœtales de porc en forme d'îlots (Islet-like Cell Clusters ICCs) ont été transplantés sur 10 patient·e·s diabétiques insulino-dépendant·e·s ayant reçu au préalable une greffe de rein. Ces patient·e·s ont reçu en parallèle un traitement immunosuppresseur. Suite aux greffes, des traces d'insuline ont été détectées dans l'urine des patient·e·s pendant 200 à 400 jours, et une biopsie des cellules épithéliales a montré un marquage positif à l'insuline et au glucagon. Cette étude a donc permis de conclure que le tissu endocrinien pancréatique porcin peut survivre dans le corps humain.

Cependant, cette thérapie est confrontée à différentes réactions du système immunitaire, qui peuvent être conséquentes malgré l'utilisation de traitements immunosuppresseurs. Tout d'abord, lors de la greffe des îlots, une réponse immunitaire non spécifique a lieu, due au site de transplantation directement dans le flux sanguin de la veine porte : la réaction inflammatoire instantanée véhiculée par le sang, plus connue sous le nom de IBMIR (Instant Blood-Mediated Inflammatory Reaction). Cette réaction s'explique par différents mécanismes : les îlots sécrètent tout d'abord des facteurs tissulaires, ayant pour effet d'activer la coagulation. L'endothélium vasculaire des porcs exprime de plus l'oligosaccharide galactose- α 1,3-galactose (Gal), contre laquelle le corps humain a des anticorps naturels anti-Gal⁶⁷. L'accroche des anticorps anti-Gal sur les antigènes Gal entraîne une activation du système du complément (défini par la suite) quasiment immédiate²⁰. Les plaquettes et le système du complément ainsi activés, les îlots sont infiltrés par des macrophages et des neutrophiles. Enfin, suite à l'IBMIR, les îlots peuvent être rejetés par le système immunitaire adaptatif, qui est probablement enclenché par la réaction de IBMIR, et gouverné par les lymphocytes T⁶⁸.

Le système du complément est un groupe de 35 protéines connues du sérum, faisant partie de l'immunité innée. Douze de ces protéines sont directement impliquées dans les mécanismes d'élimination des pathogènes, et les autres régulent l'activité des premières afin d'éviter une réaction auto-immune. Il existe trois voies d'activation du système du complément : la voie classique qui est activée par le complexe antigène-anticorps ; la voie alterne qui est activée par les surfaces cellulaires des bactéries gram+ ou gram-, quelques cellules infectées par un virus, et quelques levures et parasites ; et la voie des lectines. Dans le cadre de la réaction de IBMIR, des études récentes ont démontré que l'activation du système du complément suit la voie d'activation classique^{20,69,70}.

A ces différentes réactions immunitaires s'ajoute un autre risque spécifique à l'utilisation d'îlots provenant d'une autre espèce : en effet, il existe chez chaque espèce animale des rétrovirus endogènes. Un rétrovirus est un virus à ARN qui, à l'aide d'une enzyme virale, rétro-transcrit son génome d'ARN en ADN pour être intégré par la suite dans le génome de la cellule hôte (comme par exemple le Virus d'Immunodéficience Humaine). Un rétrovirus endogène est une séquence stable (qui se transmet de génération en génération) du génome d'un organisme, ayant des

analogies avec certains rétrovirus. Cette étude a soulevé le risque de transmission inter-espèces (du porc à l'être humain) du rétrovirus endogène porcin (Porcine Endogenous RetroVirus PERV), ce qui a limité grandement l'utilisation d'îlots porcins par la suite⁷¹. Récemment, le laboratoire Church d'Harvard a réussi à éliminer tout PERV du génome d'une lignée de porc, grâce la technologie de modification génétique CRISPR-Cas9⁷², rendant de nouveau la xénotransplantation plus facilement envisageable.

1.1.3.3. Traitements immunosuppresseurs

Dans les deux cas de thérapie cellulaire (allotransplantation et xénotransplantation), il est indispensable de coupler ces thérapies à un traitement immunosuppresseur afin de ne pas exposer les patients à un rejet des cellules greffées. Ces traitements, en réduisant l'action du système immunitaire, permettent à la greffe de ne pas être rejetée, mais placent donc également le patient dans une vulnérabilité plus importante face à d'autres maladies et infections. Ils ont par ailleurs de lourds effets secondaires et des risques importants, comme par exemple une diminution de la guérison des plaies, un dysfonctionnement rénal². C'est la raison pour laquelle ces thérapies ne sont utilisées que dans de rares cas de diabète sévère.

Afin d'envisager d'utiliser ces différents types de transplantations sans traitement immunosuppresseur, et de contourner les réactions immunitaires spécifiques à la xénotransplantation, une piste prometteuse est l'encapsulation des îlots de Langherans au préalable à la greffe.

1.2. Encapsulation d'îlots

L'encapsulation d'îlots consiste à appliquer une membrane semi-perméable autour des îlots, afin de séparer les tissus thérapeutiques d'un contact direct avec l'hôte, tout en maintenant un transport bidirectionnel des molécules importantes : insuline, glucose, oxygène et nutriments. Cette technique permet donc de greffer les patient·e·s sans avoir recours à un traitement immunosuppresseur. Le matériau utilisé doit avoir une perméabilité adaptée, des propriétés mécaniques lui permettant de rester intacte après une greffe, et être biocompatible. Les matériaux généralement utilisés sont des polymères hydrophiles, qui fournissent un environnement extracellulaire aqueux, biocompatible, pour les îlots encapsulés, et agissent comme une barrière pour les agents du système immunitaire. Les différents polymères utilisés sont détaillés dans la partie 2. Matériau d'encapsulation.

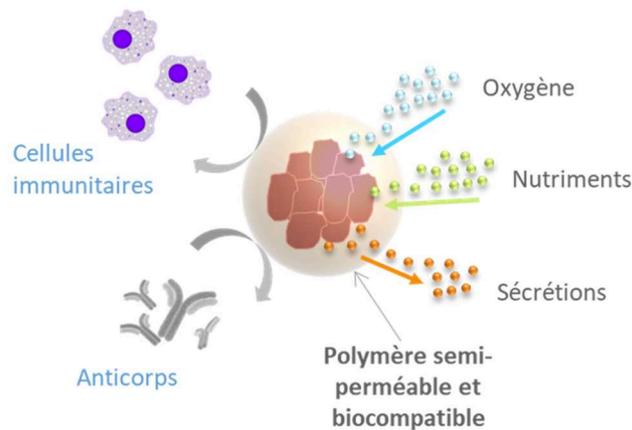


Figure 4 : Schéma de fonctionnement de l'encapsulation d'îlots

La taille des îlots varie de 50 μm à 900 μm , et leur taille moyenne est de 140 μm chez l'être humain⁷³. La membrane appliquée autour des îlots peut être sous différentes formes et tailles, donnant lieu à trois catégories d'encapsulation : la macroencapsulation (ordre de grandeur : centimètre), la microencapsulation (250-1000 μm) et la nanoencapsulation (quelques nanomètres d'épaisseur).

1.2.1. Macroencapsulation

La macroencapsulation consiste à encapsuler tous les îlots de Langerhans dans un seul contenant, qui peut être facilement transplanté et récupéré si nécessaire. Le principal challenge de cette technologie réside dans le design et la composition de la poche afin de limiter la fibrose et donner accès aux îlots à l'oxygène et aux nutriments, et permettre le passage des autres molécules comme l'insuline⁷⁴. Il existe deux types de dispositifs de macroencapsulation, classés en fonction du site d'implantation : des dispositifs extravasculaires et intravasculaires.

1.2.1.1. Macroencapsulation extravasculaire

Les dispositifs de macroencapsulation extravasculaires, par définition, sont implantés dans un site faiblement vascularisé : généralement dans la cavité péritonéale, ou en sous-cutané⁷⁵. Les avantages des dispositifs de macroencapsulation extravasculaires sont la facilité d'implantation par chirurgie très peu invasive, et de récupération en cas de problème. Par ailleurs, le rassemblement des îlots au même endroit donne lieu à de meilleures communications entre ceux-ci, se rapprochant ainsi de la physiologie de l'organe⁷⁶. Il existe différentes sociétés et groupes ayant développé des dispositifs de macroencapsulation extravasculaire, comme la société Defymed, avec le pancréas bioartificiel Mailpan® : il s'agit d'un disque de 8 centimètres de diamètre constitué d'une membrane artificielle semi-perméable, contenant des îlots de Langerhans (voir Figure 5). Ce dispositif, implanté dans la cavité péritonéale, présente les propriétés de diffusion requises afin de fournir l'insuline au patient·e, et un essai clinique est actuellement en cours. Les principaux inconvénients des macrocapsules extravasculaires sont tout d'abord le choix du lieu d'implantation. Ensuite, du fait de la faible vascularisation, les délais de diffusion d'oxygène, nutriments et glucose, et de sécrétion d'insuline, sont plus importants. Par conséquent, les îlots situés le plus loin de la membrane présentent de forts risques de nécrose.

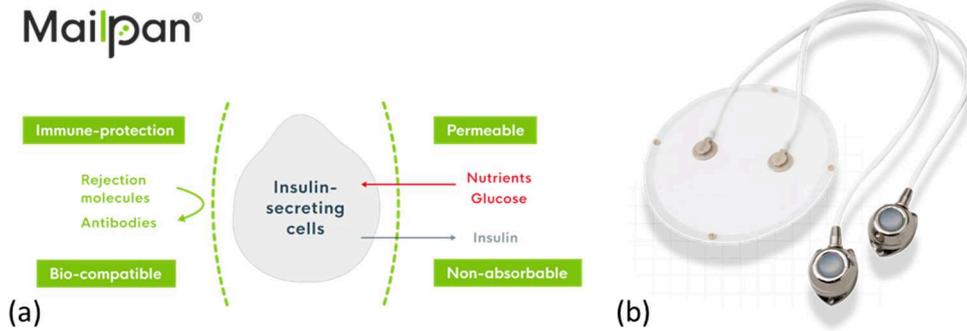


Figure 5 : Le dispositif Mailpan® développé par la société Defymed⁷⁷ : (a) schéma de fonctionnement ; (b) dispositif

Afin de limiter le manque d'apport en oxygène présent dans les deux systèmes de macroencapsulation altérant la viabilité et fonctionnalité des îlots⁷⁸⁻⁸⁰, différentes pistes sont envisagées comme l'ajout de molécules porteuses d'oxygène^{81,82}, ou d'une chambre contenant de l'oxygène. La technologie la plus aboutie est développée par la société beta-O₂ Technologies Ltd. et consiste en un pancréas artificiel implantable β-Air®, avec apport interne d'oxygène^{83,84}. Ce système de macroencapsulation contient deux chambres encapsulant des îlots, autour d'une chambre centrale contenant de l'oxygène (voir Figure 6). Les îlots sont encapsulés dans un hydrogel, et séparés de l'hôte et de la chambre d'oxygène par une membrane de polytétrafluoroéthylène hydrophilisée. L'oxygène est infusé tous les jours via 2 ports implantés le long de l'appareil, et diffusent à travers la membrane jusqu'aux îlots. Ce dispositif a permis de supprimer le diabète chez des rats, et des tests ont été fait avec des îlots isogéniques et allogéniques et n'ont présenté aucun signe inflammatoire et fibrotique après retrait de l'implant⁸³⁻⁸⁶. L'entreprise travaille actuellement sur le transfert de cette technologie sur des modèles d'animaux plus grands⁸⁶, et a réussi pour l'instant à rétablir une normoglycémie pendant 30 jours à des mini porcs diabétiques⁸⁵. Un test de biotolérabilité sur patient humain a également été effectué et n'a montré aucun signe de fibrose ou inflammation⁸⁷. La limitation de ce dispositif est sa taille, car il a une capacité maximale de 150 000 IEQ, or il est prévu qu'un patient nécessite 300 000 à 500 000 IEQ pour supprimer le diabète. Suite à ces résultats, beta-O₂ Technologies Ltd. a donc travaillé sur l'amélioration de la capacité de stockage et de densité des îlots dans leur dispositif, et un essai clinique en phase 1 a été lancé sur 4 patient·e·s en 2014, avec des chambres pouvant contenir 400 000 IEQ⁸⁸. Cette technologie est donc très prometteuse, mais elle nécessite des injections journalières d'oxygène.

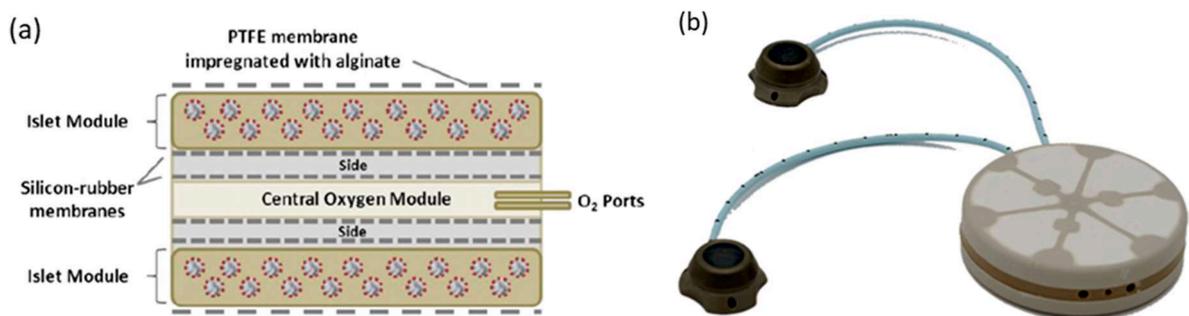


Figure 6 : le dispositif β-Air® développé par beta-O₂ Technologies Ltd.⁸⁹ : (a) schéma du fonctionnement : chambre centrale contenant l'oxygène, 2 chambres latérales contenant les îlots⁸⁷ ; (b) dispositif

Il existe d'autres sociétés ayant développé des dispositifs utilisant la macroencapsulation extravasculaire, comme Sernova™ avec le produit Cell Pouch™, ou bien TheraCyte™ et ViaCyte™. Pour plus de détails sur ces dispositifs, il est possible de se référer à différentes revues^{17,90,91}.

1.2.1.2. Macroencapsulation intravasculaire

Les dispositifs de macroencapsulation intravasculaires consistent généralement en des tubes ou fibres creux, dont la membrane est un biopolymère (souvent synthétique) contenant les îlots de Langherans⁷⁴. Ces tubes sont connectés directement au système vasculaire du patient, permettant ainsi au sang de passer directement à l'intérieur (vide). Cette technologie permet d'obtenir de meilleurs résultats en termes de transfert d'oxygène, nutriments et insuline que la macroencapsulation extravasculaire. Cependant, le principal inconvénient est le risque de coagulation sanguine et dépôt de plaquettes, entraînant des thromboses au niveau des fibres, et des saignements et complications. La coagulation sanguine est particulièrement problématique pour les diabétiques de type 1 car ils ne peuvent pas être traités par des anticoagulants systémiques. De plus, leur implantation en shunts dans les vaisseaux sanguins est une procédure complexe.

La technologie de macroencapsulation intravasculaire la plus connue a été développée par WR Grace Company dans le cadre d'un partenariat avec Biohybrid© dans les années 1990. L'appareil développé a permis un retour à une glycémie normale pendant plusieurs mois chez des gros animaux ayant reçu une xéno greffe. Cependant, ces animaux ont souffert de lourdes complications hémorragiques⁹².

Ces différentes limitations ont considérablement réduit le développement de cette technologie, même si les avancées récentes en termes de science des matériaux et technologies ont sensiblement relancé la recherche sur ce domaine⁹³. De plus, tout comme les macrocapsules extravasculaires, la taille du système engendre des risques de nécrose pour les cellules situées le plus loin du bord de la membrane.

Malgré des résultats prometteurs (comme β eta-02), les systèmes de macroencapsulation (extravasculaires et intravasculaires) présentent donc des limitations de taille, citées précédemment :

- Une diffusion des nutriments et de l'oxygène limitée, entraînant un risque d'hypoxie et de nécrose des îlots (ce phénomène est exacerbé pour les dispositifs extravasculaires de par la faible vascularisation).
- La limitation du choix du lieu d'implantation
- Un risque de thrombose et hémorragie pour les dispositifs de macroencapsulation intravasculaire

Ces limitations sont problématiques pour l'application de thérapie cellulaire pour le diabète de type 1, puisqu'elles empêchent une bonne viabilité et fonctionnalité des îlots. Elles incitent donc à se pencher vers des dispositifs de taille plus petite.

1.2.2. Microencapsulation

La microencapsulation permet de pallier certaines limitations de la macroencapsulation, comme l'oxygénation. Il s'agit de microcapsules d'hydrogel biocompatible, de forme sphérique, allant de 250 μm à 1000 μm de diamètre, contenant un nombre limité d'îlots de Langherans : généralement de 1 à 3^{74,75}. L'hydrogel, à l'état liquide, est tout d'abord mélangé avec les cellules à encapsuler. Puis des gouttes sont formées à partir de ce mélange hydrogel – cellules, grâce à différentes technologies qui sont présentées par la suite (3. Technologies de microencapsulation). Enfin, ces gouttes sont gélifiées, grâce à différents procédés, qui dépendent du biopolymère utilisé, qui sont également détaillés par la suite (2. Matériau d'encapsulation).

Le premier article présentant la microencapsulation a été publié par Chang *et al.* en 1964⁹⁴, et la première utilisation de microcapsules pour la thérapie cellulaire du diabète de type 1 a été publiée en 1980 par Lim et Sun³. Dans cette étude, les îlots encapsulés ont survécu jusqu'à 3 semaines, contre 8 jours pour des îlots non encapsulés, sans traitement immunosuppresseur. En 1984, O'Shea *et al.* ont ensuite amélioré la technologie en changeant le matériau d'encapsulation, permettant aux îlots encapsulés greffés dans un des cinq animaux de l'étude de survivre les 365 jours de l'expérience^{95,17}. Différentes études ont montré par la suite l'efficacité de la microencapsulation pour protéger les îlots encapsulés du système immunitaire du receveur^{3,17,95-100}.

La forme sphérique et la taille plus réduite des capsules présentent différents avantages^{74,75,101} :

- La réduction de la distance de diffusion, autrement dit de la distance que l'oxygène et les nutriments doivent parcourir avant d'accéder aux îlots. Cela permet donc d'éviter les risques de nécrose présents dans les macrocapsules.
- Leur forme sphérique permet d'avoir un rapport surface/volume élevé, et ainsi de maximiser la surface d'échange et donc le transfert d'oxygène et de nutriments.
- Les microcapsules présentent une forte résistance aux sollicitations mécaniques
- Leur petite taille permet d'accéder à de nombreux sites d'implantations par injection, comme en sous cutané, sous la capsule rénale, ou bien dans la cavité péritonéale^{75,102}.

Le choix du site d'implantation dépend de la technologie¹⁰³. Cependant, le site privilégié est généralement la cavité péritonéale^{74,102}, car le volume de capsules à injecter peut être assez élevé. En effet, les différentes technologies de microencapsulation utilisées à l'heure actuelle ne permettent pour l'instant pas de contrôler de manière précise le pourcentage de remplissage des capsules. Il peut donc y avoir de nombreuses capsules vides, augmentant considérablement le volume total de capsules à transplanter afin d'espérer obtenir un nombre d'îlots greffés suffisant pour un retour à une glycémie normale¹⁰⁴⁻¹⁰⁶. En effet, un patient nécessite en moyenne 10 000 IEQ par kg¹⁰⁷ (un patient de 70 kg par exemple, nécessite donc 700 000 IEQ).

Les études utilisant la microencapsulation pour la thérapie cellulaire du diabète de type 1 montrent de très bons résultats chez les rongeurs¹⁰⁸⁻¹¹⁰, ainsi que chez de plus larges animaux^{97,111,112}, avec une nette amélioration du contrôle de la glycémie, et une réduction voire suppression de l'insulinothérapie. Cependant, elles présentent encore des difficultés à obtenir chez des patients des résultats aussi prometteurs et retrouver une glycémie normale¹¹³⁻¹¹⁶. Les raisons peuvent être une quantité insuffisante d'îlots greffés initialement, ou une survie compromise des greffes dans la cavité péritonéale¹¹⁶.

Récemment, Living Cell Technologies© a lancé des essais cliniques de xénotransplantation d'îlots de porc encapsulés, dans différents pays. Les premiers résultats montrent une possibilité sans risque de la xénotransplantation d'îlots encapsulés, mais sans parvenir à obtenir l'efficacité

souhaitée en termes de contrôle de la glycémie¹¹⁷. Il est donc essentiel d'avoir un pourcentage de capsules remplies le plus élevé possible, afin de réussir à greffer suffisamment d'îlots encapsulés pour retrouver une glycémie normale, sans nécessiter un volume de capsules trop important.

Par ailleurs, la perméabilité des capsules n'est pas toujours précisément adaptée, et même si elle stoppe une réaction globale du système immunitaire, une détection des îlots par certaines molécules du système immunitaire peut entraîner une fibrose autour des capsules.

Enfin, les microcapsules étant petites, et réparties dans toute la cavité péritonéale (site d'implantation privilégié), il est beaucoup plus difficile de les récupérer en cas de problème que pour les systèmes de macroencapsulation.

1.2.3. Nanoencapsulation

Afin de pouvoir envisager des sites d'implantation plus petits que pour la macroencapsulation et la microencapsulation, et résoudre les problèmes de diffusion de nutriments et oxygène, des techniques de nanoencapsulation ont été développées. Il s'agit toujours d'une membrane semi-perméable, mais qui ici enveloppe individuellement chaque îlot de Langerhans. Son épaisseur peut varier de quelques nanomètres à quelques micromètres⁷⁵.

Différents polyélectrolytes ont été étudiés pour cette application⁷⁵, comme le poly(éthylène glycol) (PEG), le poly(alcool de vinyle) (PVA)¹¹⁸, le chitosan ou l'alginate¹¹⁹ (ces différents matériaux sont présentés plus en détails dans le paragraphe 2. Matériau d'encapsulation). Le plus utilisé est le PEG car il présente des propriétés intéressantes : il est biologiquement inerte, hydrophile, et inhibe la cytotoxicité engendrée par les anticorps, qui peuvent entraîner un rejet de la greffe^{2,120}.

Les techniques de nanoencapsulation peuvent aller de l'émulsification au dépôt couche-par-couche (layer-by-layer LBL)¹²¹. La technique du couche-par-couche se base sur l'adsorption de composés de charges opposées : la surface des cellules chargée négativement est recouverte d'un polymère cationique, puis cette couche est recouverte d'un polymère anionique^{104,122} (ce procédé peut être répété pour obtenir une couche plus épaisse). Elle permet de générer une couche d'épaisseur inférieure à 50 nanomètres^{2,123}. C'est une technique largement utilisée, qui permet de produire une pellicule d'épaisseur, perméabilité, propriétés mécaniques et chimie de surface contrôlé·e·s¹²⁴. Cette technologie permet également d'ajouter des molécules non toxiques protectrices des îlots relativement facilement dans la membrane².

La nanoencapsulation permet ainsi de fournir une immunoprotection aux îlots tout en n'étant pas confrontés aux limitations de diffusion des nutriments, oxygène et sécrétions cellulaires, et en ayant accès à un choix plus large de sites d'implantation. Cependant, cette technologie est confrontée à des risques en termes de biotolérance car les dépôts de couches de polyélectrolytes étant fines, elles ont tendance à se détériorer après implantation¹⁰⁴. De plus, la plupart des polymères cationiques sont extrêmement cytotoxiques, par conséquent, leur contact direct avec la surface des cellules entraîne une dégradation progressive de la membrane¹⁰⁴, ce qui limite la quantité de polymères pouvant être utilisés. Enfin, le problème de récupération de l'implant rencontré avec la microencapsulation est ici accentué.

1.2.4. Résumé des essais cliniques en cours

Il existe différents essais cliniques en cours utilisant la macroencapsulation et la microencapsulation. La nanoencapsulation en est encore à un stade de développement et il n'existe pas à l'heure actuelle d'essais cliniques utilisant cette technologie. Le Tableau 1 présente une partie des technologies ayant déjà démarré un essai clinique : les techniques de microencapsulation sont en bleu, et celles de macroencapsulation en vert. Il existe également un dispositif utilisant le même type de chambre qu'en macroencapsulation, mais uniquement pour créer des chambres de tissu, et implanter des îlots nus par la suite, il est indiqué en rouge. Pour un descriptif plus détaillé, il est possible de se référer aux revues de Orive *et al.*¹²¹, Ludwig *et al.*⁷⁴, Iacovacci *et al.*⁷⁵ ou encore de Desai *et al.*¹⁷

Nom du dispositif et polymère utilisé	Cellules encapsulées	Propriétés	Résultats	Dates, Références
Microencapsulation				
Alginate-Poly-L-Ornithine-Alginate (PLO)	Îlots humains	2 essais cliniques pilotes : Calafiore <i>et al.</i> ¹¹⁴ : Implanté chez 2 patient·e·s atteint·e·s de diabète de type 1 (400 000 IEQ chez le·la premier·ère patient·e, 600 000 IEQ chez le·la deuxième), laissé pendant 1 an et 6 mois respectivement.	Les patient·e·s nécessitent toujours une prise d'insuline exogène. Peptide C présente dans l'urine. Réduction des épisodes hypoglycémiques et de la consommation d'insuline exogène.	Sept 2003 75,114
		Basta <i>et al.</i> ¹¹³ : Implanté dans la cavité intrapéritonéale de 4 patient·e·s atteint·e·s de diabète de type 1 (respectivement 7 940, 8 300, 11 100, 23 500 IEQ par kg pour chaque patient·e), laissé pendant 7 ans, avec contrôles jusqu'à 3 ans post-transplantation.	Aucun effet secondaire post-opératoire. Les patient·e·s nécessitent toujours une prise d'insuline exogène mais qui a nettement baissé. Peptide C présente dans l'urine.	Nov 2011 75,113
Barium alginate Diamètre des capsules : 255-750 µm	Îlots humains	Implanté chez 4 patient·e·s, IEQ implantés par patient : 98 200 – 227 900 Léssé pendant 19 mois, sans traitement immunosuppresseur, mais avec prise d'un traitement anti-inflammatoire et anti-oxydant juste après l'implantation.	Détection de peptide C (marqueur de sécrétion d'insuline) 1 jour après implantation, mais son niveau baisse jusqu'à disparaître 1 à 4 semaine·s après implantation. Baisse des niveaux de glucose et du besoin en insuline 1 jour après implantation, mais réaugmente par la suite. Biopsie des capsules après 16 mois : fibrose autour, avec présence de capillaires fins et légère réponse histiocytaire. Détection d'anticorps cytotoxiques au bout de 4 et 8 semaines	Oct 2009 75,115
Alginate	Îlots humains	Implanté dans la cavité péritonéale d'une patiente : 2.10 ⁶ cellules β par kg soit 300 000 IEQ.	Capsules récupérées après 3 mois, mais la majorité sont en amas et contiennent des débris, d'où une faible augmentation de peptide C.	Avr 2013 75,116
DIABECCELL® Matrice à base d'alginate, couche externe de PLO	Îlots de porc néo-natal	Implanté dans la cavité péritonéale : 10 000 ou 20 000 IEQ par kg pour chaque patient·e, administrés en 2 doses à 3 mois d'écart, sur 46 patient·e·s au total.	Réduction de 70% des épisodes d'hypoglycémie, et de 20% des doses d'insuline à administrer Nécessite toujours un apport d'insuline exogène	Juin 2014 75,125–127

Macroencapsulation

<p>β-Air® 2 chambres en alginate contenant les îlots, 1 chambre centrale contenant de l'oxygène (Voir partie 1.2.1) (βeta-O₂)</p>	<p>Îlots humains</p>	<p>Dispositif placé en sous-cutané sous anesthésie générale. Premier essai sur un patient pendant 10 mois : 2 100 IEQ par kg (155 400 IEQ au total), puis essai clinique sur 4 patient·e-s : 400 000 IEQ chacun·e, pendant 4 à 6 mois. La chambre centrale contenant de l'oxygène doit être infusée tous les jours</p>	<p>Premier résultat : la greffe fonctionne et il y a régulation de la glycémie, mais il y a toujours besoin d'un apport d'insuline exogène. Récupération du dispositif après 10 mois : fine fibrose autour de la capsule, vascularisée, et sans aucun signe d'inflammation, îlots intacts et répondent à une stimulation au glucose. Essai clinique en cours : résultats non publiés. Buts actuels : réguler la glycémie totalement sans avoir besoin d'insuline exogène, lancer un essai clinique avec des cellules souches différenciées en cellules pancréatiques.</p>	<p>Nov 2013, Mai 2019, 75,83,85,87,128,129</p>
<p>Cell pouch System™ (Sernova™)</p>	<p>Îlots humains</p>	<p>Ne fournit pas d'immunoisolation Implantation en sous-cutané, 3 semaines minimum de pré-vascularisation sous immunosuppresseurs, puis des tiges amovibles sont retirées, laissant des chambres de tissu avec un espace central libre pour l'implantation d'au moins 3 000 IEQ par kg, sur 7 patient·e-s.</p>	<p>Essai clinique en cours. La survie et fonctionnalité de la greffe sera vérifiée au bout d'un an, et l'évolution de la glycémie sera surveillée. Prise de traitement immunosuppresseur.</p>	<p>Juillet 2019 75,130-132</p>
<p>PEC-Encap™ et PEC-Direct™, utilisant le dispositif Encaptra® Composition non divulguée (ViaCyte™)</p>	<p>Précurseurs de cellules β allogéniques, dérivés de ESC</p>	<p>Implantation en sous-cutané PEC-Encap™ : membrane simple immunoprotectrice, laissant passer l'oxygène et les nutriments, faible densité de cellules (24 000 IEQ) PEC-Direct™ : membrane ouverte permettant la vascularisation, nécessite immunosuppresseurs</p>	<p>Essais précliniques : les cellules finissent leur différenciation quelques mois après implantation, et produisent de l'insuline, maintenant une glycémie normale. Essai clinique en cours (200 patient·e-s pour PEC-Encap™, 55 patient·e-s pour PEC-Direct™). La greffe est tolérée et n'induit pas de réaction immunitaire, mais les cellules dans PEC-Encap™ ne maintiennent pas leur viabilité et fonctionnalité</p>	<p>Juin 2019 17,75,128,133-135</p>
<p>Islet sheet devices : Fine feuille d'alginate (250 μm d'épaisseur) contenant les cellules</p>	<p>ICCs, îlots allogéniques</p>	<p>75 000 IEQ d'îlots allogéniques transplantés à un chien de 7 kg pendant une pancréatectomie</p>	<p>Essais précliniques sur rongeurs et larges animaux : Utilisation d'insuline le 9^{ème} jour, et d'anticorps pendant les 2 premières semaines, puis aucun traitement. Euglycémie à jeun pendant 84 jours, puis les îlots ont été récupérés intacts</p>	<p>2001 17,75,136,137</p>

Tableau 1 : Bilan des différentes technologies d'encapsulation en essai clinique

Ce tableau récapitulatif des essais cliniques en cours montre que certains résultats sont prometteurs, mais aucun essai clinique n'est totalement concluant pour le moment. La recherche semble s'être plus concentrée sur les systèmes de macroencapsulation ces dernières années, mais ces systèmes sont confrontés au manque d'oxygène, ou à la limitation en nombre d'îlots greffés de par la taille des chambres.

1.3. Bilan et paramètres critiques

Afin de soigner le diabète de type 1, il existe donc plusieurs thérapies possibles. Comme présenté précédemment, l'apport d'insuline exogène est très couramment utilisé, mais cette méthode est contraignante et ne permet pas de réguler la glycémie de manière précise et d'éviter les pics de glycémie. Une alternative est la thérapie cellulaire : greffe de cellules pancréatiques, soit avec une prise de traitement immunosuppresseur en parallèle, qui comme nous l'avons vu a de nombreux effets secondaires, soit avec une encapsulation des cellules au préalable. L'encapsulation des cellules peut suivre les trois techniques détaillées précédemment, présentant chacune ses avantages et inconvénients, résumés dans le Tableau 2 :

	MACROENCAPSULATION	MICROENCAPSULATION	NANOENCAPSULATION
DIFFUSION DE L'OXYGENE ET DES NUTRIMENTS	Limitée à cause de la non vascularisation et de la distance à parcourir par les nutriments et l'oxygène jusqu'aux îlots	Meilleure qu'en macroencapsulation, mais dépend de la taille des capsules	Très bonne
VOLUME DE L'IMPLANT	Trop important	Réduit	Faible
CHOIX DU SITE D'IMPLANTATION	Très limité	Plus de choix que pour la macroencapsulation mais dépend de la taille des capsules et du nombre de capsules vides	Nombreux
PROPRIETES MECANIQUES	Bonnes	Dépendent du matériau d'encapsulation	Limitée : la couche a tendance à se détériorer après implantation
RECUPERATION DE L'IMPLANT	Facile	Difficile	Très compliquée
REPOSE IMMUNITAIRE	Dépend du dispositif	Dépend du matériau d'encapsulation et de la perméabilité	Moyenne : si la couche de polymère se détériore, les îlots sont confrontés à une attaque du système immunitaire

Tableau 2 : Avantages et inconvénients des différentes méthodes d'encapsulation

La microencapsulation, grâce à ses différents avantages cités précédemment, semble donc être le meilleur compromis dans le cas d'une application pour la thérapie cellulaire du diabète de type 1. Cependant, les microcapsules formées doivent remplir différents critères afin de pouvoir être utilisées pour une application de thérapie cellulaire, qui dépendent à la fois du matériau et de la technologie utilisés pour l'encapsulation. Ils sont détaillés dans les deux paragraphes suivants.

1.3.1. Paramètres dépendant du matériau d'encapsulation

1.3.1.1. Biocompatibilité-Biotolérabilité

La biocompatibilité est définie comme « la capacité d'un biomatériau à engendrer une réponse de l'hôte adaptée à l'application voulue ». Cette définition a été donnée à l'origine dans le cadre d'organes entièrement artificiels comme des hanches et genoux^{138,139}. Pour ces organes artificiels, la biocompatibilité correspond à une réaction du système immunitaire du greffé formant une fibrose autour des organes, qui est bénéfique afin d'intégrer le matériau artificiel dans les tissus environnants.

Dans le cas de la thérapie cellulaire pour le diabète de type 1, une fibrose autour des capsules ne serait pas bénéfique puisqu'elle empêcherait les nutriments et l'oxygène d'être transmis aux cellules encapsulées, et entraînerait donc leur nécrose. Ici, une biocompatibilité adaptée doit donc correspondre à une réaction de l'hôte au matériau la plus faible possible, afin d'avoir très peu ou pas de croissance cellulaire autour des capsules greffées, et ainsi permettre la diffusion des molécules nécessaires^{138,140,141}. Rokstad *et al.* ont défini cette réaction comme une biotolérabilité : « la capacité d'un matériau à rester dans l'organisme pendant une longue durée avec seulement de faibles degrés de réactions inflammatoires »^{141,142}.

Pour plus de détails concernant les mécanismes de réponse immunitaire, il est possible de se référer à différentes revues comme celle de Hilborn *et al.*¹⁴² ou de Rokstad *et al.*¹⁴¹

Outre la biotolérabilité du matériau avec l'organisme dans lequel il est greffé, le matériau doit être également non toxique pour les cellules qu'il encapsule. La viabilité des îlots de Langerhans ne doit pas être affectée par leur contact avec le matériau, afin qu'ils continuent à produire de l'insuline une fois encapsulés^{138,143,144}.

1.3.1.2. Caractère hydrophile et charge

La biotolérabilité du matériau dépend entre autres de son caractère hydrophile et de sa charge. Il a été démontré que les cellules s'attachent et se développent mieux sur des surfaces ou matériaux hydrophiles¹⁴⁵, et plus précisément, l'attachement des cellules est maximal pour des surfaces ayant un angle de contact compris entre 20 et 60 degrés d'après van Wachem *et al.*¹⁴⁵⁻¹⁴⁷ De plus, les matériaux hydrophobes présentent une plus grande adsorption des protéines, et une dégradation des protéines à leur surface, ce qui entraîne une exposition de nouveaux épitopes (molécules reconnues par le système immunitaire), entraînant donc une réaction immunitaire^{141,148}. Un matériau hydrophile présentera donc de meilleurs résultats en termes de biotolérabilité. La charge du matériau est également un paramètre critique pour la biotolérabilité : un matériau chargé positivement peut être cytotoxique, immunogène et attirer les cellules inflammatoires de l'hôte¹⁴⁹⁻¹⁵¹. Il est donc nécessaire d'avoir un matériau hydrophile et chargé négativement.

1.3.1.3. Perméabilité

Afin de maintenir leur viabilité, les îlots doivent également avoir accès à de l'oxygène et des nutriments. Comme expliqué précédemment, il faut pour cela que le matériau utilisé pour l'encapsulation ait une perméabilité permettant de laisser passer l'oxygène ($M_w = 32$ Da), les nutriments comme le glucose ($M_w = 180$ Da ; $0,4$ nm)⁷⁵, et l'insuline ($M_w = 6$ kDa ; $1,35-2,75$ nm)^{75,152}, tout en stoppant les cellules du système immunitaire (7 μ m), les anticorps ($M_w = 150-900$ kDa ; IgG : $5,9$ nm), et les médiateurs inflammatoires (cytokines, interleukines ; $M_w = 17-70$ kDa).

La taille d'exclusion appropriée est généralement comprise entre 50 et 150 kDa. Calafiore *et al.* recommandent une taille critique d'exclusion de 50 à 70 kDa de façon à empêcher le passage d'une partie des cytokines, tout en laissant passer l'oxygène, les nutriments et l'insuline¹⁵³.

1.3.1.4. Propriétés mécaniques et biodégradabilité

Les capsules utilisées pour la thérapie cellulaire doivent fournir une immunoprotection aux cellules *in vivo* sur le long terme, et doivent donc pour cela être non biodégradables, et mécaniquement stables et durables aussi longtemps que les cellules sont fonctionnelles^{75,141}. En effet, si les capsules viennent à se désintégrer mécaniquement, cela entraîne une perte de l'immunoprotection et un rejet de la greffe.

1.3.2. Paramètres dépendant du type d'encapsulation (macro, micro, nano)

1.3.2.1. Taille des capsules

Les capsules doivent avoir une taille proche de la taille moyenne des îlots, afin d'optimiser la diffusion des différentes molécules d'intérêt :

- Le glucose présent dans l'organisme de l'hôte doit pouvoir atteindre les îlots le plus rapidement possible, afin que ces derniers puissent procéder à la libération biphasique normale de l'insuline, qui doit elle-même être diffusée dans le sang le plus rapidement possible.
- L'oxygène et les nutriments doivent pouvoir accéder aux îlots très rapidement également, afin d'éviter une nécrose des tissus.

Des études *in vitro* ont montré que la diffusion du glucose et de l'insuline n'était pas altérée pour des capsules allant jusqu'à 1 mm de diamètre^{138,154}. Cependant, lorsque les capsules sont greffées, le site d'implantation étant souvent la cavité péritonéale, elles sont éparpillées sans vascularisation directe. La diffusion des différentes molécules d'intérêt est donc plus compliquée. C'est la raison pour laquelle les capsules ne doivent idéalement pas dépasser 500 μm de diamètre (la taille des îlots variant de 50 à 350 μm environ).

1.3.2.2. Forme des capsules et état de surface

La forme est également un paramètre critique, et les capsules doivent être le plus homogènes possible car si les capsules présentent des aspérités, cela peut provoquer une reconnaissance du système immunitaire. En effet, il a été démontré que la morphologie de surface des capsules est directement liée à la biotolérabilité, et qu'une surface lisse et sans défauts entraîne une meilleure biotolérabilité^{155,156}. Les capsules doivent donc avoir une surface la plus lisse possible, et une forme la plus ronde possible.

1.3.2.3. Possibilité d'utiliser des viscosités variées

Comme expliqué précédemment, les propriétés mécaniques des capsules sont également importantes. Or la viscosité du polymère utilisé peut jouer grandement sur ces propriétés. Il est donc important d'avoir un système d'encapsulation qui peut permettre d'utiliser des polymères de viscosités variées.

1.3.2.4. Cisaillement

Enfin, les îlots ne doivent pas être endommagés lors de l'encapsulation. Il est donc très important d'utiliser une technologie d'encapsulation qui n'impose pas un cisaillement trop élevé sur les

cellules, et donc de connaître et maîtriser le taux de cisaillement imposé par le système lors de l'encapsulation.

Au vu des paramètres critiques pour une optimisation de l'encapsulation d'îlots de Langerhans, le type d'encapsulation présentant les résultats les plus adaptés semble être la microencapsulation, car la taille des capsules obtenues permet d'optimiser la diffusion des nutriments, de l'oxygène et de l'insuline, ainsi que le volume de l'implant, et donne accès à un large choix de sites d'implantation. Par ailleurs, en fonction du type de matériau utilisé, il est également possible d'avoir de bons résultats en termes de biotolérance et propriétés mécaniques, contrairement aux nanocapsules qui ont tendance à se désintégrer rapidement.

C'est donc le type d'encapsulation qui a été choisi pour cette thèse. Quant au choix du matériau, il doit également répondre aux différents paramètres critiques cités précédemment, et être utilisable dans le cadre de la microencapsulation. Les différentes possibilités de matériau ainsi que les différentes technologies de microencapsulation sont décrites par la suite.

2. Matériau d'encapsulation

Il existe de nombreux biopolymères pouvant être utilisés pour l'encapsulation de cellules, et ayant été étudiés dans différentes revues^{138,143,144,149,157-163}. Ils sont classés en deux catégories : les polymères naturels les polymères synthétiques. Ce paragraphe va présenter rapidement les propriétés des différents polymères les plus utilisés pour l'encapsulation de cellules. Pour une description plus détaillée, il est possible de se référer à la revue de De Vos *et al.*¹³⁸ présentant les deux catégories, ou bien de Gasperini *et al.*¹⁴⁹ pour une revue sur les polymères naturels, et enfin de Olabisi *et al.*¹⁶² concernant les polymères synthétiques.

2.1. Polymères utilisés pour l'encapsulation de cellules

2.1.1. Polymères synthétiques

Les polymères synthétiques sont produits facilement, et avec des procédés relativement standardisés. Ils sont également faciles à purifier, ce qui leur confère une bonne efficacité en termes d'immunoisolation et de diffusion de nutriments et oxygène^{75,162}.

Cependant, les polymères synthétiques peuvent présenter des problèmes de biotolérance car leur procédé de synthèse implique souvent l'utilisation de solvants toxiques qui peuvent altérer la viabilité des cellules⁷⁵. C'est la raison pour laquelle ils sont généralement utilisés pour la macroencapsulation¹³⁸, car ils ne sont ainsi pas en contact direct avec les cellules. Le PEG est un des seuls polymères synthétiques dont la synthèse ne nécessite pas de solvant toxique, et qui est donc également utilisé pour la microencapsulation. Les polymères synthétiques les plus utilisés sont présentés plus en détails dans le Tableau 3 (pour une description plus exhaustive, il est possible de se référer à la revue de De Vos *et al.*¹³⁸ ou de Olabisi *et al.*¹⁶²) :

POLYMERE	SYNTHESE	DESCRIPTION	PROCESS, GELIFICATION	RESISTANCE MECANIQUE	PERMEABILITE	BIOTOLERABILITE	REFERENCES
POLY (ETHYLENE GLYCOL) (PEG)	N'utilise pas de solvants toxiques	Composé à majorité d'eau, temps de diffusion courts. Peut facilement être couplé à des peptides pour se rapprocher de la structure de la MEC	Polymérisation sous UV ou lumière visible en présence des bons photoinitiateurs	Bonne	Faible perméabilité aux nutriments. Observations de réponses immunitaires qui suggèrent le passage de molécules cytotoxiques	A vérifier : impact des radicaux libres sur la viabilité et fonctionnalité des cellules	75,138,162,164-167
POLY ALCOOL DE VINYLE (PVA)	Hydrolyse du Polyacétate de Vinyle	Thermoplastique soluble dans l'eau	Gélification par cycles de congélation / décongélation			Faiblement hydrophile, ce qui provoque une réaction inflammatoire in vivo. Les flots encapsulés n'adhèrent pas bien au matériau, il est donc généralement utilisé avec un polymère naturel à l'intérieur.	138,162,168-171
POLYURETHANE (PU)	Réaction covalente entre polyol et diisocyanate en présence de catalyseurs	Elastomère. Biodégradable. Hydrophobe.				Sujet à débat. Hydrophobicité : provoque une réponse de l'hôte. De par sa biodégradabilité, dégradation complète de la membrane et rejet de la greffe	138,157,172-175
POLYACRYLATE (HEMA, HEMA-MMA)	PHEMA synthétisé par réticulation de HEMA par radiation UV. HEMA-MMA préparé par copolymérisation, avec un initiateur, solvant : PEG.	Thermoplastique			Dépend des monomères d'acrylate utilisés, mais de manière générale, faible perméabilité aux nutriments solubles dans l'eau.	HEMA-MMA : biocompatibilité optimale	138,162,176-178

Tableau 3 : Comparaison des propriétés des polymères synthétiques

Comme on peut le voir sur le tableau, la majorité des polymères synthétiques présentent des problèmes de biotolérance ou perméabilité. Comme expliqué précédemment, le PEG est un des seuls polymères dont la synthèse ne nécessite pas de solvant toxiques, cependant, chez les animaux, les membranes de PEG ne permettent pas de stopper les molécules cytotoxiques activant une réponse immunitaire¹⁶⁴. Certains groupes observent également des réactions immunitaires qui suggèrent que des molécules cytotoxiques passent à travers le PEG¹⁶⁴. Par ailleurs, le PEG présente une faible perméabilité aux nutriments¹⁶⁷. Enfin, la photopolymérisation utilise des photoinitiateurs qui produisent des radicaux libres, qui abîment les cellules et réduisent leur fonctionnalité¹⁷⁹. Peu d'études se sont penchées sur l'impact de ces radicaux libres dans le cas d'utilisation du PEG, alors que ce phénomène est plus largement étudié pour d'autres polymères¹⁸⁰. Il faut déterminer leur impact sur la longévité des cellules encapsulées et leur fonctionnalité. Cependant, afin d'améliorer sa biotolérance, il est possible d'associer le PEG à des peptides fonctionnels pour se rapprocher de la structure de la matrice extra cellulaire^{165,166}.

Concernant le PVA, il est faiblement hydrophile, ce qui le rend susceptible à des adhésions cellulaires *in vivo*. Or l'adhésion cellulaire interfère avec une bonne nutrition des îlots encapsulés¹³⁸. La surface des capsules de PVA peut également provoquer des réactions inflammatoires chroniques¹⁷⁰. Afin de contrer cette réaction inflammatoire, de nombreuses équipes utilisent un autre polymère en couche externe (comme le PEG). Par ailleurs, les cellules encapsulées à l'intérieur du PVA n'y adhèrent pas facilement¹⁷¹, et le PVA est donc souvent utilisé avec un polymère naturel à l'intérieur (en contact direct avec les cellules). Ce polymère n'est donc pas idéal pour l'encapsulation cellulaire.

La biotolérance du PU et son rôle en tant que barrière immunoprotectrice est sujet à débat^{173,174}. En effet, de par son hydrophobicité, il peut entraîner une réponse immunitaire de l'hôte¹⁷⁵. Afin d'éviter cette réaction immunitaire, il est possible de traiter la surface du PU avec un réactif hydrophile comme du Tween 80¹⁷⁴.

Concernant les polyacrylates, les plus utilisés pour l'encapsulation de cellules sont le poly(hydroxyethyl méthacrylate) (PHEMA) et l'hydroxyethyl méthacrylate - méthyl méthacrylate (HEMA-MMA)^{176,177}. Le copolymère HEMA-MMA a à la fois une biocompatibilité optimale et une perméabilité convenable¹⁷⁸. La géométrie et les propriétés physico-chimiques de ces capsules peuvent être adaptées à volonté en utilisant des monomères acrylate différents¹³⁸. Cependant, malgré cet avantage, la plupart des capsules à base de polyacrylate présentent une faible perméabilité aux nutriments solubles dans l'eau¹⁷⁷.

On peut donc voir que les polymères synthétiques ne semblent pas tout à fait adaptés à une application d'encapsulation de cellules. En effet, ils présentent tous des limitations en termes de biotolérance et de perméabilité. Le PEG semble plus envisageable car c'est celui qui présente la meilleure biotolérance, mais il est malgré tout limité au niveau de la perméabilité, et de plus, sa gélification par photopolymérisation soulève le questionnement de l'effet des radicaux libres. C'est la raison pour laquelle la plupart des groupes travaillant sur l'encapsulation de cellules utilisent plutôt des polymères naturels, qui donnent de meilleurs résultats. Leurs propriétés sont présentées dans le paragraphe suivant.

2.1.2. Polymères naturels

Les polymères de source naturelle sont séparés en trois catégories : les polysaccharides, les polypeptides et les polynucléotides. Dans le cadre de l'encapsulation de cellules, les polysaccharides sont beaucoup plus utilisés, car ils forment dans la majorité des cas des hydrogels^{138,149,161}, qui sont de très bon candidats pour l'encapsulation de cellules. En effet, les hydrogels sont des polymères hydrophiles constitués à majorité d'eau (>90%), qui s'utilisent généralement dans des conditions douces, qui n'altèrent pas la viabilité des cellules^{3,163,181}. De plus, ils peuvent réticuler pour former des réseaux tridimensionnels dont la structure et la résistance mécanique sont très similaires à celles de la matrice extracellulaire de nombreux tissus humains^{75,149,182}. Enfin, les gels obtenus peuvent être mécaniquement stables, souples¹⁵⁷, et induire très peu de réponse immunitaire^{182,183}.

Les principaux polymères naturels utilisés dans le cadre de l'encapsulation de cellules sont l'alginate, l'agarose, le chitosan, la cellulose et le collagène. Ils peuvent gélifier de différentes manières, les trois principales étant la gélification thermique, ionique, ou la photoréticulation. Leurs propriétés sont résumées dans le Tableau 4 :

POLYMERE	ORIGINE	TYPE	PROCESS, GELIFICATION	RESISTANCE MECANIQUE	PERMEABILITE	BIOTOLERABILITE	REFERENCES
ALGINATE	Algue marine	Polysaccharide Chargé négativement Non biodégradable	Gélfication ionique, en présence d'ions divalents, et en conditions physiologiques	Dépend du type d'alginate et de la concentration et solubilité des ions de la solution gélifiante. Bonne stabilité sur longue durée in vivo	Variable, dépend du type d'alginate et de la concentration et solubilité des ions de la solution gélifiante, globalement un peu trop poreux pour fournir une bonne immunoisolation	Bonne biotolérabilité si le polymère est bien purifié	75,138,149,184-187
AGAROSE	Algue marine	Polysaccharide Non chargé Non biodégradable	Gélfication thermique, en dessous d'une température qui dépend du type d'agarose et de sa concentration	Dépend du type d'agarose et de sa concentration	Passage d'anticorps (IgG) et de facteurs du complément, dépend de la concentration	Mitigé : Miyoshi <i>et al.</i> ¹⁸⁸ témoignent de 5 semaines de fonctionnement post greffe sans réaction immunitaire, d'autres groupes témoignent de réactions de l'hôte. Dépend aussi de la concentration	75,138,149,188-195
CHITOSAN	Chitine produite par les crustacés	Polysaccharide Chargé positivement Biodégradable	Gélfication ionique Soluble uniquement à pH acide (<6)	Mécaniquement peu stable. Propriétés polyvalentes, dépendant de la désacétylation de la chitine		Dépend de la désacétylation de la chitine. Charge positive : immunogène, cytotoxique et mucoadhésif	138,149-151,196,197
CELLULOSE	Plantes vertes, algues	Polysaccharide ne formant pas d'hydrogel Non chargé Faiblement biodégradable	Non soluble dans l'eau et la plupart des solvants, mais possède des dérivés solubles dans l'eau	Possibilité d'obtention de microcapsules mécaniquement stables avec les dérivés de cellulose	Sujet à débat, certaines études témoignent d'infiltration de cellules immunitaires et fibrose autour des capsules, d'autres témoignent d'aucune réponse inflammatoire à des cellules encapsulées greffées	Avis partagés sur la provocation de réaction inflammatoire, légère inhibition de la prolifération des cellules Possibilité d'obtention de microcapsules biocompatibles à partir des dérivés de cellulose	138,198-204
COLLAGENE	Matrice extra cellulaire	Protéine Biodégradable (dégradation enzymatique très rapide)	Gélfication thermique et par variation de pH, en conditions physiologiques	Faibles propriétés mécaniques et faible stabilité	Difficilement contrôlable	Légère réponse humorale. Pas de fibrose après 3 mois sur îlots allogéniques encapsulés. Pour des applications biomédicales à long terme : nécessité de le coupler à un agent de réticulation ou à d'autres polymères pour compenser les faibles propriétés mécaniques.	75,138,149,205-208

Tableau 4 : Comparaison des propriétés des polymères naturels

Comme le montre le Tableau 3, tous les polymères présentent des propriétés et résultats intéressants, mais également des limitations. Concernant l'agarose tout d'abord, ses propriétés en termes de perméabilité sont très peu polyvalentes. Il a été démontré que de nombreux facteurs complémentaires et cytokines passent à travers les capsules d'agarose^{209,210}. Certaines équipes utilisent une couche externe d'un autre polymère pour contrer ce problème, mais cela réduit généralement la biotolérabilité. Par ailleurs, il est difficile de trouver des sources d'agarose pur et reproductible pour envisager une application généralisée^{211,212}.

Concernant le chitosan, il n'est pas très stable mécaniquement, et interfère avec la viabilité et le fonctionnement des cellules de par sa solubilité uniquement à $\text{pH} < 6$ et sa charge positive¹³⁸. Certaines équipes utilisent une combinaison de gélatine + chitosan afin de contourner les problèmes de propriétés mécaniques et biologiques. Mais globalement, de par sa faible compatibilité avec les cellules, le chitosan est peu utilisé pour former des capsules immunoprotectrices.

La cellulose n'est pas soluble dans l'eau et la plupart des solvants, ce qui rend son utilisation plus compliquée. Il est possible de se tourner vers certains de ses dérivés qui sont solubles dans l'eau : le sulfate de cellulose de sodium (NaCS) et le carboxyméthylcellulose (CMC)^{200,201}. A partir du NaCS, on peut suspendre les cellules dans une solution de sulfate de cellulose en conditions physiologiques, et ainsi obtenir des microcapsules mécaniquement stables, qui n'altèrent pas la viabilité et la fonctionnalité des cellules encapsulées^{200,213}. Le NaCS s'utilise sous forme liquide avec une membrane autour par coacervation avec un polycation, et le CMC s'utilise soit sous forme de matrice avec une couche d'un autre polymère autour, soit sous forme de gel en le mélangeant avec du chitosan par exemple. Il est donc possible de contourner les limitations de la cellulose mais en utilisant des dérivés, et avec des procédés qui sont plus complexes et donnent des résultats mitigés en termes de propriétés mécaniques.

Enfin, le collagène présente de très faibles propriétés mécaniques. C'est la raison pour laquelle dans le cadre d'applications à long terme, il est nécessaire de le coupler avec un agent de réticulation afin d'augmenter ses propriétés mécaniques. Cependant, l'agent de réticulation le plus utilisé dans ce contexte est le Glutaraldéhyde, mais il provoque des réactions inflammatoires, rendant le polymère non biotoléré et non utilisable pour des applications biologiques²¹⁴. Il peut aussi être utilisé en le mélangeant à d'autres polymères comme l'alginate, afin d'augmenter la résistance mécanique également⁷⁵.

De par ses propriétés, l'alginate présente des performances très intéressantes pour une application d'encapsulation de cellules :

- Il est constitué à majorité d'eau (>98%) et est hydrophile, ce qui rend son utilisation avec des cellules favorable
- Il est chargé négativement, ce qui limite l'adhésion cellulaire
- Il gélifie en conditions physiologiques de manière simple et rapide (le procédé de gélification sera présenté plus en détails dans un paragraphe suivant)
- Il est disponible en grande quantité et à un coût modéré, sous forme purifiée
- Il présente une bonne biotolérabilité et stabilité in vivo

Il présente peu d'inconvénients, les principaux étant tout d'abord la variabilité de ses propriétés physico-chimiques du fait de sa provenance, et sa perméabilité qui est variable mais généralement légèrement élevée^{138,184} (la distribution en taille des pores varie de 5 à $200\mu\text{m}^{149}$), cependant elle dépend également du type d'alginate et de sa concentration. Afin de compenser cette perméabilité qui est un peu trop importante pour fournir une bonne immunoprotection, il est souvent utilisé une seconde couche d'un polymère différent, majoritairement la Poly-L-Lysine. Cependant, cette

dernière est chargée positivement, ce qui est néfaste pour les cellules¹⁴⁹⁻¹⁵¹. Il est donc possible d'ajouter une troisième couche d'alginate (pour avoir à la fin alginate-PLL-alginate)^{138,149}.

En conclusion, parmi les polymères naturels utilisé dans l'encapsulation de cellules, l'alginate semble être le choix le plus pertinent, et c'est la raison pour laquelle il fait l'objet de nombreuses études et publications. Ses propriétés sont présentées plus en détails dans le paragraphe suivant.

2.2. Alginate

Comme présenté précédemment, l'alginate est le polymère naturel le plus utilisé dans les applications d'encapsulation de cellules. Il provient des algues brunes, dans lesquelles il sert comme élément de structure. Il confère à la plante sa force et sa flexibilité. Industriellement, l'alginate a été utilisé pendant des années pour ses propriétés gélifiantes, épaississantes et stabilisantes, et pour sa capacité à garder de l'eau²¹⁵. Il est maintenant également utilisé pour des applications pharmaceutiques, biomédicales, et en biotechnologie. Il a été utilisé pour la première fois dans le cadre de l'encapsulation d'îlots pour le diabète de type 1 par Lim et Sun en 1980³. Par la suite, il a beaucoup été utilisé pour cette application ainsi que dans de nombreux autres domaines (encapsulation d'autres types de cellules endocrines, ou de cellules recombinantes pour la délivrance de gènes thérapeutiques comme des hormones de croissance), et il est encore aujourd'hui beaucoup utilisé¹³⁸.

2.2.1. Composition

L'alginate est un copolymère linéaire anionique, de la famille des polysaccharides. Il est composé de 2 types de monomères : l'acide β -D-mannuronique (M), et l'acide α -L-guluronique (G). Ces deux monomères se lient entre eux par liaison 1-4, en suivant différentes séquences : blocs homopolymériques de monomères G (blocs G), blocs homopolymériques de monomère M (blocs M), ou bloc de séquences de monomères M et G alternant (blocs MG) (voir Figure 7)²¹⁵.

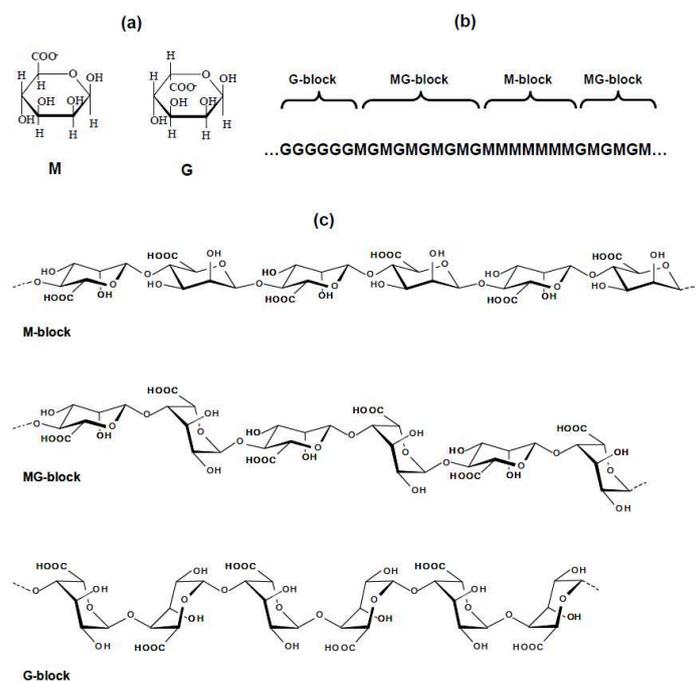


Figure 7 : Composition de l'alginate²¹⁵ : (a) Illustration des deux monomères. M = acide β -D-mannuronique, G = acide α -L-gulonique. (b) Différentes séquences d'enchaînement des monomères dans l'alginate. (c) Chaînes de monomères en conformation chaise.

Les chaînes de poly-mannuronate se lient au niveau d'un carbone équatorial et forment ainsi des structures étendues, alors que les chaînes de poly-gulonate se lient au niveau d'un carbone axial et forment des structures en « zig-zag » (voir Figure 7). Cette forme de « zig-zag » permet d'avoir une cavité entre chaque motif de guluronate, créant un site favorable de liaison ionique avec des cations divalents, déterminant pour la gélification de l'alginate qui sera présentée par la suite.

Les différents alginates sont caractérisés par la proportion de chaque monomère (rapport M/G), l'arrangement de leurs blocs, leur masse molaire moyenne en nombre M_n (moyenne des masses molaires pondérée par le nombre de chaînes de chaque longueur. Cela correspond à la masse molaire d'une chaîne de longueur moyenne), leur masse molaire moyenne en masse M_w (moyenne des masses molaires pondérée par la masse de chaînes de chaque longueur), et leur polydispersité (M_w/M_n)¹⁴⁴. Les alginates sont classés en trois catégories en fonction de leur proportion de monomères G : forte proportion (>60%, noté HG), proportion intermédiaire (40-60%, noté IG), et faible proportion (<40%, noté LG)²¹⁶. L'influence de ces paramètres sur les propriétés des gels obtenus est décrite par la suite.

2.2.2. Gélification

La majorité des utilisations de l'alginate s'intéressent à sa capacité à former un gel ionotrope en présence de cations divalents, tels que les ions Ca^{2+} , Ba^{2+} ou Sr^{2+} , qui s'incorporent dans la matrice polymère²¹⁵. Les liaisons créées avec ces ions sont très sélectives et vont dépendre de la composition de l'alginate. En effet, comme expliqué brièvement précédemment, ces liaisons vont avoir lieu au niveau de la cavité entre les motifs guluronates des bloc G, avec les groupements COO^- , OH et les atomes d'Oxygène, formant ainsi des points de réticulation entre les chaînes de polymère. Ces liaisons peuvent se former avec de nombreux cations différents, les plus utilisés étant Ca^{2+} , Ba^{2+} ou Sr^{2+} , mais également avec des cations qui sont toxiques pour les cellules et ne sont donc pas utilisés pour des applications d'encapsulation cellulaire, comme Pb^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} ,

Co^{2+} , Ni^{2+} , et Zn^{2+} . L'affinité de l'ion pour le polymère dépend de l'ion utilisé, et suit l'ordre suivant (pour les ions non toxiques pour les cellules) : $\text{Ba}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Ca}^{2+}$ ^{215,217}.

Les grandes différences d'affinité entre les ions indiquent que les interactions entre l'alginate et ces ions ne sont pas uniquement électrostatiques²¹⁵. La gélification de l'alginate suit en effet un modèle qui a été défini comme celui de la boîte à oeufs²¹⁸ : les ions se lient au niveau des cavités entre les motifs guluronate selon le schéma présenté en Figure 8, et ces cavités stabilisent les liaisons formées avec les ions :

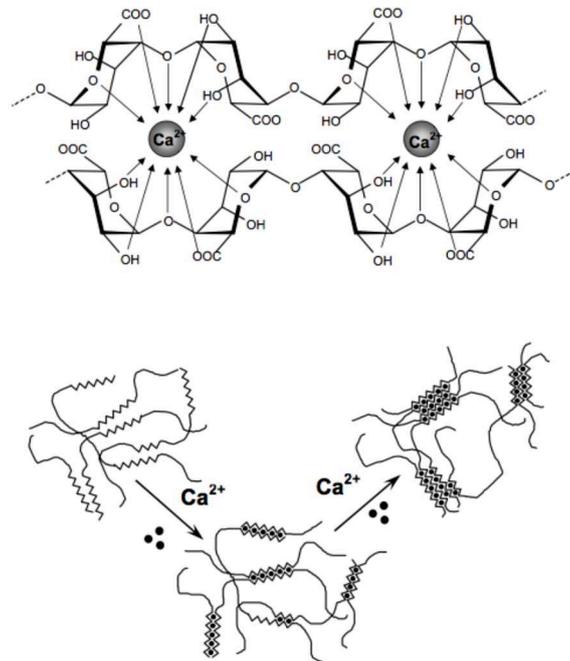


Figure 8 : Gélification de l'alginate²¹⁵

On peut donc voir que la gélification a lieu grâce à la mise en place des liaisons ioniques au sein des cavités sur les séquences de bloc G, puis aux liens qui se forment entre les différentes séquences de blocs G au sein de la même chaîne de polymère ou entre deux chaînes différentes, créant ainsi un réseau. Le gel ainsi formé est irréversible tant que les ions sont toujours dans le milieu, et autocoopératif²¹⁵. Il a été déterminé que le nombre minimum de motifs G adjacents permettant d'obtenir une jonction stable est de 8 à 20 motifs pour le cation Ca^{2+} ^{219,220}. Il a aussi été démontré que le nombre minimum de motifs G nécessaires pour former une jonction stable diminue avec l'augmentation d'affinité de l'ion avec l'alginate²²⁰.

Dans le cadre de l'encapsulation de cellules avec de l'alginate, le cation le plus utilisé est le calcium Ca^{2+} , car c'est le cation divalent ayant le moins d'effet sur les cellules. La gélification de l'alginate à l'aide de calcium peut avoir lieu selon deux mécanismes différents : par gélification interne ou gélification externe.

La gélification interne a été introduite par Poncelet et al.^{221,222} en 1992, elle consiste en un apport de calcium sous forme de sel inactif non soluble dans l'eau, comme des nanocristaux de carbonate de calcium (CaCO_3). Ils sont intégrés dans la matrice d'alginate avant de former les gouttes par émulsification ou extrusion dans de l'huile. Une fois les gouttes formées, un acide soluble dans le milieu environnant est ajouté (comme de l'acide acétique) afin de réduire le pH ($\text{pH} < 6,5$) et convertir le sel de calcium insoluble en cation libre Ca^{2+} ²²¹⁻²²⁴, selon le mécanisme décrit dans l'équation (1) :



Les cations Ca^{2+} ainsi disponibles diffusent vers les sites de boîte à œufs formés par les acides guluroniques de l'alginate afin de le gélifier.

Le processus de gélification est lent et contrôlé, et les gels d'alginate obtenus sont donc homogènes²¹⁵. Cependant, dans le cadre de l'encapsulation de cellules, les conditions acides nécessaires pour la conversion du sel de calcium sont néfastes pour les cellules. De plus, les capsules obtenues ne sont pas très lisses, de par la présence des sels de calcium, ce qui peut réduire la biotolérabilité^{155,156}.

La gélification externe consiste en un apport de calcium sous forme de sel soluble dans l'eau, comme du chlorure de calcium (CaCl_2). Les gouttes sont tout d'abord formées avec l'alginate, puis transférées dans une solution aqueuse de sel de calcium, au sein duquel les cations Ca^{2+} sont directement disponibles, diffusent et gélifient l'alginate^{223,224}. Cette méthode permet de gélifier l'alginate très rapidement, et d'obtenir un gel lisse, mais moins homogène, de par la diffusion du calcium qui a lieu à l'extérieur des capsules en premier. C'est malgré tout le mécanisme qui est choisi préférentiellement pour les applications d'encapsulation de cellules, car contrairement à la gélification interne, il permet de gélifier l'alginate en conditions physiologiques (pH neutre), et d'obtenir des capsules plus lisses et donc présentant de meilleurs résultats en termes de biotolérabilité.

2.2.3. Propriétés physico-chimiques des gels d'alginate

Les gels d'alginate sont des réseaux continus de biopolymères, liés par des liaisons non-covalentes selon le mécanisme décrit précédemment. Leur formation en présence de cations divalents s'effectue très rapidement, et les gels obtenus sont stables thermiquement. Comme expliqué précédemment, les propriétés de ces gels qui sont importantes pour une implantation d'îlots encapsulés *in vivo* sont :

- Les propriétés mécaniques : les gels d'alginate doivent présenter de bonnes résistance mécanique et élasticité, afin de résister aux contraintes subies lors de l'implantation *in vivo*, et ne pas se dégrader.
- La biodégradabilité : les réseaux formés par les gels d'alginate ne doivent pas se déformer dans l'organisme, afin de permettre aux capsules de rester stables et ne pas se dégrader également.
- La biotolérabilité : les gels d'alginate obtenus ne doivent pas provoquer d'inflammation et de réaction immunitaire une fois implantés.
- La perméabilité : comme expliqué précédemment, la taille des pores obtenus dans les réseaux de gel d'alginate doit permettre à l'oxygène, aux nutriments et à l'insuline de passer, tout en stoppant les molécules du système immunitaire.

2.2.3.1. Propriétés mécaniques

Le module élastique, ou module d'Young est souvent utilisé pour mesurer la force des gels d'alginate. Il dépend de la composition (proportions de monomères M et G), la masse moléculaire, la concentration de l'alginate, et le type d'ion utilisé pour la gélification²¹⁵.

Les proportions de monomères G et M varient en fonction de la source d'algue^{138,215}. Les blocs G étant nécessaires à la gélification, ils fournissent une plus grande rigidité au gel obtenu, qui sera

plus résistant aux tests de compression et de tension, et plus stable mécaniquement^{4,138,149,215,225-229}. A l'inverse, un alginate contenant plus de blocs M sera plus flexible, souple et élastique^{138,215,227}. Par ailleurs, la conformation des blocs de monomères influence également leur rigidité. Dans les blocs M, les liaisons entre les 2 monomères sont diéquatoriales et forment une structure plane alors que dans les blocs G, les liaisons sont diaxiales et donc plus courtes, rendant la structure plus compacte et moins flexible. Les blocs MG contiennent des liaisons axiales et équatoriales, et les différents degrés de liberté des deux monomères le composant leur donnent une plus grande flexibilité globale. La rigidité des blocs de monomères augmente donc dans cet ordre : MG < MM < GG²¹⁵. Les blocs M-G dans les gels d'alginate augmentent donc sa flexibilité²³⁰.

Outre la composition de l'alginate et le rapport M/G, les propriétés mécaniques des gels d'alginate dépendent également de la vitesse de gélification. En effet, une gélification lente produira un gel ayant une structure plus uniforme et une plus grande intégrité mécanique qu'un gel produit par gélification rapide^{4,187}. La vitesse de gélification quant à elle, dépend de la concentration et solubilité des ions de la solution gélifiante. Comme expliqué précédemment, dans le cadre de la gélification interne par exemple, les ions utilisés sont sous forme non soluble (comme le carbonate de calcium CaCO₃), et le processus de gélification est donc lent et contrôlé, les gels d'alginate obtenus sont donc mécaniquement homogènes²¹⁵. A l'inverse, dans le cadre de la gélification externe, les ions utilisés sont sous forme très soluble dans l'eau (comme le chlorure de calcium CaCl₂), et les cations Ca²⁺ diffusent et gélifient l'alginate très rapidement, de manière peu contrôlée, et le gel obtenu est donc moins homogène mécaniquement^{4,223,224}. La vitesse de gélification dépend également de la température : à basse température, la réactivité des cations divalents est réduite, donc la vitesse de gélification aussi, et la structure du gel d'alginate obtenu est donc plus ordonnée, donnant lieu à de meilleures propriétés mécaniques^{4,231}.

Le choix de l'ion réticulant agit aussi sur le module d'Young et sur la résistance du gel obtenu : l'utilisation d'un ion présentant une meilleure affinité avec l'alginate produira un gel possédant un module d'Young et une résistance plus importants²¹⁵.

Enfin, l'augmentation de la concentration de la solution d'alginate entraîne une augmentation de la rigidité du gel obtenu²³¹.

2.2.3.2. Biodégradabilité - stabilité

L'alginate n'est intrinsèquement pas biodégradable chez les mammifères, car ces derniers ne possèdent pas l'enzyme permettant de sectionner les chaînes du polymère (l'alginate). Cependant, les gels d'alginate réticulés par liaisons ioniques peuvent être dissouts par libération des cations divalents formant ces liaisons dans le milieu environnant, à cause de réactions d'échange avec des cations monovalents (comme les ions sodium)⁴. Cela peut donc réduire la stabilité à long terme des capsules d'alginate in vivo. Cependant, la masse moléculaire moyenne des alginates commerciaux est supérieure au seuil de clairance rénale, donc même si une partie de l'alginate peut être dissout, les capsules ne disparaissent pas complètement de l'organisme²³². Malgré tout, ces limitations de l'alginate conduisent à s'intéresser à des hydrogels d'alginate réticulés par liaisons covalentes.

2.2.3.3. Biotolérabilité

La biotolérabilité de l'alginate a été évaluée à de nombreuses reprises in vitro et in vivo, et l'impact de la composition de l'alginate sur les cellules porte toujours à débat⁴. En effet, certaines équipes témoignent du fait que l'alginate à teneur importante en M est immunogène, et présente 10 fois

plus de risque d'induire une production de cytokines que l'alginate à forte teneur en G²³³ ; alors que d'autres équipes témoignent d'aucune réponse immunitaire autour d'implants d'alginate, peu importe la teneur en M ou G²³⁴. Cependant, ces questionnements sont très certainement liés au degré de pureté de l'alginate : comme il provient de sources naturelles, les réponses immunogènes suite à une implantation d'alginate peuvent être associées à des impuretés restantes, comme des métaux lourds, des endotoxines, des protéines et des composés polyphénoliques. En effet, il a été démontré que l'alginate purifié par des procédés d'extraction multi-étapes pour obtenir une pureté très élevée n'induit pas de réaction immunitaire significative lorsqu'il est implanté dans des animaux²³⁵. Les mêmes résultats ont été observés pour des implantations sous-cutané de gels d'alginate commercial ultra-pur dans des souris²³⁶.

Concernant l'impact des propriétés chimiques, l'alginate est hydrophile et chargé négativement, ce qui est bénéfique pour les cellules encapsulées, ainsi que pour la réponse immunitaire (voir partie 1.3.1)

2.2.3.4. Perméabilité

Les pores des gels d'alginate présentent une large distribution en taille, allant de 5 à 200 nm, et leur perméabilité dépend de la composition et du rapport M/G de l'alginate, ainsi que de la concentration et solubilité des ions de la solution gélifiante, comme expliqué par la suite.

Concernant la composition, les gels d'alginate les plus poreux sont ceux à forte teneur en bloc G^{149,237,238}. Concernant l'influence des ions, une solution gélifiante contenant des ions très solubles (comme dans le cadre de la gélification externe) et à une concentration élevée va donner une structure de gel plus serrée, et par conséquent une diffusion plus faible des grosses molécules^{185,186}. A l'inverse, si la solution gélifiante contient des sels peu solubles (comme dans le cadre de la gélification interne), la structure formée sera plus perméable aux grosses molécules mais également plus uniforme¹⁸⁷. Par ailleurs, les protéines étant pour la majorité chargées négativement à pH 7, elles ne diffusent pas facilement à l'intérieur de l'alginate, mais elles diffusent de l'intérieur vers l'extérieur de l'alginate rapidement²³⁷.

Les gels d'alginate présentent de bonnes propriétés pour une application d'implantation in vivo de cellules encapsulées, mais également quelques limitations : les propriétés mécaniques ne sont pas très homogènes dans le cadre de gélification externe, or c'est le mécanisme de gélification utilisé dans la plupart des applications en thérapie cellulaire. Par ailleurs, les liaisons ioniques formées lors de la gélification peuvent être en partie détruites par dissolution des cations divalents dans le milieu environnant. Ces limitations de l'alginate conduisent à s'intéresser à des hydrogels d'alginate réticulés par liaisons covalentes, qui peuvent être obtenus par modifications chimiques.

2.2.4. Modifications chimiques de l'alginate

Contrairement aux liaisons ioniques, les liaisons covalentes ne peuvent pas se détruire sous l'effet d'une contrainte, ou par dissolution des cations divalents dans le milieu environnant. L'ajout de ces dernières dans les gels d'alginate leur confère donc une plus grande déformation élastique^{4,5}.

Il existe différentes méthodes utilisées pour modifier chimiquement l'alginate afin d'ajouter des liaisons covalentes et ainsi améliorer ses propriétés physico-chimiques, qui sont détaillées dans

les revues de Yang *et al.*²³⁹, Rokstad *et al.*¹⁴¹ ou de Lee et Mooney⁴. Une première technique est l'ajout de liaisons covalentes grâce à la réaction de Staudinger entre du PEG-phosphine et de l'azine fonctionnalisé sur l'alginate^{240,241}. Ces liaisons covalentes entraînent une résistance complète des capsules au gonflement osmotique. Ces réseaux interpénétrés d'alginate et de PEG-vinyl-sulfone multibranche lié par covalence montrent également des effets bénéfiques sur la stabilité mécanique et l'élasticité⁶. Cette technique est développée entre autres par l'Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, et sera présentée plus en détails dans le chapitre Pré-encapsulation.

Récemment, le renforcement de complexes polyélectrolytes par covalence a été proposé pour des capsules d'alginate-PLL également. Une liaison a lieu entre le copolymère réactif poly(méthacrylic acid, sodium salt-co-2-[methacryloyloxy]-ethyl acetoacetate) avec du PLL. C'est un système polyvalent puisque la résistance et perméabilité des microcapsules obtenues peuvent être ajustées en faisant varier le degré de pénétration du copolymère et de la PLL^{242,243}.

Il existe également une technique de réticulation covalente du PLO avec du genipin, qui a été utilisée dans le but d'améliorer la biotolérabilité des microcapsules d'alginate-PLO¹²⁷. La revue de Yang *et al.*²³⁹ offre un descriptif plus exhaustif et détaillé sur les possibles modifications chimiques de l'alginate.

3. Technologies de microencapsulation

La microencapsulation d'îlots de Langerhans peut se séparer en trois phases :

- Le mélange des îlots avec le biopolymère utilisé (qui est généralement une solution aqueuse)
- La formation de gouttes à partir de la suspension de cellules dans le biopolymères
- La transformation de ces gouttes en microcapsules. Le passage de la solution aqueuse à un « gel » se fait par gélification ionique, thermique ou photoréticulation, et dépend du biopolymère utilisé, comme présenté précédemment (partie 2. Matériau d'encapsulation).

L'étape de formation de gouttes peut se faire à l'aide de différentes technologies, qui peuvent se classer sous deux catégories :

- Les technologies dites de « dripping » : les gouttes sont formées par extrusion à travers une seringue contenant le mélange biopolymère – cellules. Comme présenté par la suite, ces technologies peuvent être déclinées de différentes manières.
- Les technologies de microfluidique : le mélange biopolymère – cellules s'écoule dans un canal de taille micrométrique, et son flux est cisailé par un fluide non miscible, afin de former des gouttes. Ce type de technologie sera plus détaillé par la suite (partie 3.2).

Les technologies de dripping sont à l'heure actuelle les plus utilisées^{101,244}, car elles permettent de former des capsules rapidement, et avec des montages relativement simples. La matrice utilisée pour l'encapsulation peut être composée de nombreux matériaux différents. Selon le biopolymère utilisé, l'étape de transformation des gouttes en capsules varie : gélification thermique, par liaison covalente, ou ionique²⁴⁵ (voir partie 2. Matériau d'encapsulation). Dans ce paragraphe, afin de simplifier la présentation des technologies de microencapsulation, le biopolymère choisi pour les exemples est l'alginate, qui gélifie à l'aide de liaisons ioniques avec des cations bivalents (procédé présenté plus en détails dans la partie précédente 2.2.2 Gélification).

3.1. Technologies de dripping

Comme présenté précédemment, les technologies de dripping correspondent à une extrusion du biopolymère liquide contenant les cellules, à travers une aiguille. La manière dont les gouttes vont se former dans cette configuration dépend de la vitesse appliquée sur le biopolymère. On peut ainsi distinguer 3 régimes²⁴⁴ :

- **Vitesse faible** : les gouttes sont formées directement à la sortie de la seringue, c'est le régime de **goutte à goutte**.
- **Vitesse intermédiaire** : le polymère sort de la seringue sous forme d'un jet, qui se sépare en gouttes par la suite, soit naturellement, soit par apport de forces extérieures (vibration par exemple) : c'est le régime de **jet**.
- **Vitesse élevée** : le jet devient instable et se sépare en plusieurs petites gouttes, c'est le régime de **spray**.

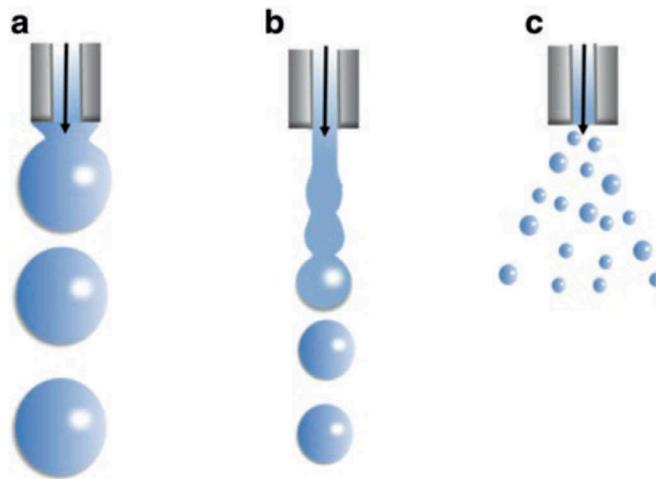


Figure 9 : Régimes de formation de goutte en dripping : (a) goutte à goutte; (b) segmentation de jet; (c) spray²⁴⁴

Le régime de spray implique une application d'énergies et de pressions très élevées, et donc de forces de cisaillement également très élevées, ce qui est néfaste pour les cellules. Par conséquent, ce régime n'est pas utilisé pour l'encapsulation de cellules. Les dispositifs actuels utilisent le régime de goutte à goutte ou de segmentation de jet. Pour chaque régime, plusieurs technologies existent, qui sont détaillées par la suite.

3.1.1. Régime de goutte à goutte par gravité

Le dripping par gravité consiste à former des gouttes de biopolymères en utilisant simplement les forces de gravité. La formation de goutte a donc lieu lorsque la force de gravité est plus forte que la tension superficielle maintenant la goutte à l'extrémité de l'aiguille.

Le dispositif commercialisé le plus connu utilisant cette technique et développé par Nisco Engineering©, une entreprise Suisse (voir Figure 10).



Figure 10 : Dripping en goutte à goutte par gravité (Nisco©) - (a) Système à aiguille simple; (b) Système à plusieurs aiguilles; (c) Tête de 30 aiguilles

Le diamètre des capsules formées avec ce système est d'environ 1.8mm^{245} , ce qui est trop grand pour une application de greffe d'îlots encapsulés. En effet, comme expliqué précédemment, une taille de capsule réduite permet tout d'abord d'optimiser les diffusions de nutriments, oxygène et insuline, et permet également de réduire le volume total de capsules à implanter.

De plus, la production de gouttes est lente et cette technologie présente donc une faible productivité²⁴⁶. Enfin, elle est utilisable uniquement avec des polymères de faible viscosité (inférieure à $200\text{mPa}\cdot\text{s}^{246}$, or l'utilisation de polymère plus visqueux peut être utile pour obtenir des gels de meilleures propriétés mécaniques (voir partie 2.2.3).

Afin de réduire la taille des gouttes formées en dripping goutte à goutte par gravité, il est possible d'ajouter un potentiel électrostatique, ou un flux d'air coaxial.

3.1.2. Régime de goutte à goutte avec potentiel électrostatique

Ici, un potentiel électrostatique est appliqué à l'aiguille contenant le mélange biopolymère – cellules. L'application de ce potentiel électrostatique engendre un déplacement d'ions à la surface de la goutte²⁴⁷, provoquant des répulsions et une réduction de la tension superficielle. La réduction de la tension superficielle dépend de la valeur du potentiel électrostatique appliqué, qui définit donc également la réduction du diamètre des gouttes formées. Bidoret *et al.* ont ainsi établi le graphique de l'évolution du diamètre de goutte en fonction du potentiel électrostatique appliqué (Figure 11).

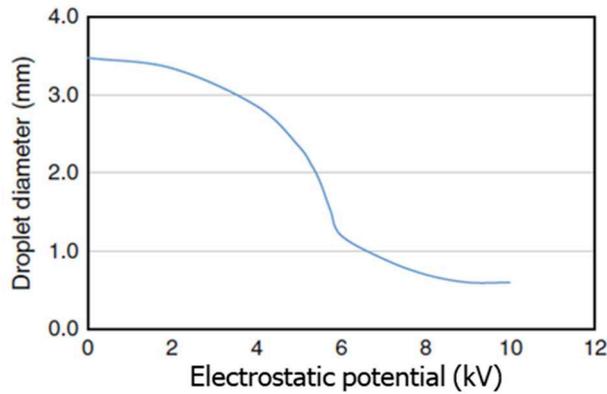


Figure 11 : Diamètre de goutte en fonction du potentiel électrostatique²⁴⁴

Ce graphique montre que l'ajout d'un potentiel électrostatique permet effectivement de diminuer de manière efficace le diamètre des gouttes produites. Par ailleurs, la formation et la segmentation de la goutte s'effectuent plus rapidement, donc cela permet également d'obtenir une meilleure productivité. La société Nisco engineering commercialisant les dispositifs de dripping en goutte à goutte par gravité commercialise également des dispositifs utilisant le potentiel électrostatique (voir Figure 12).

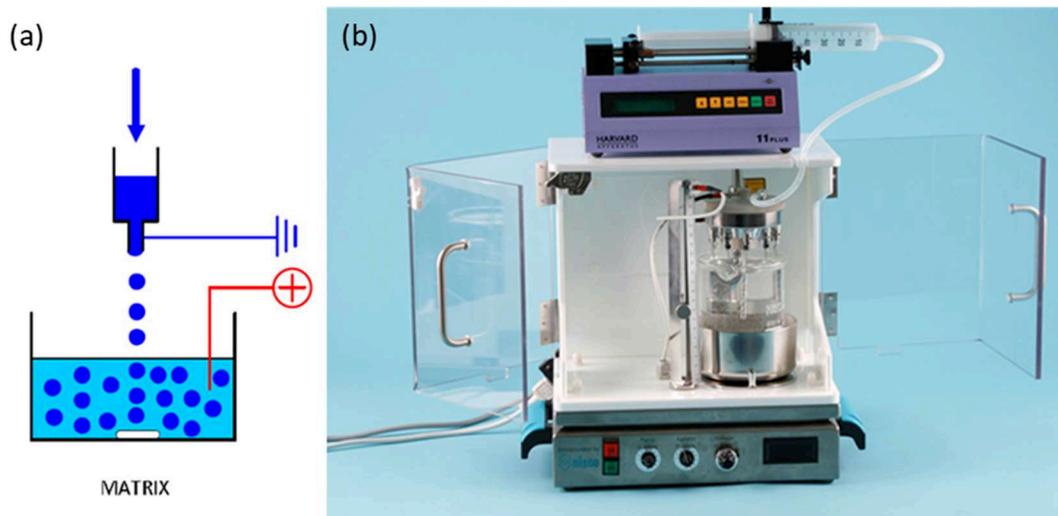


Figure 12 : Système de dripping en goutte à goutte avec potentiel électrostatique (Nisco©) - (a) fonctionnement ; (b) équipement avec une tête à 10 aiguilles

Cette technique permet donc d'obtenir une réduction de la taille des gouttes, allant jusqu'à 200 μm de diamètre environ, pour des polymères faiblement visqueux, mais la taille des gouttes augmente avec la viscosité du polymère^{248,249}. La distribution en taille est élevée (coefficient de variation allant de 11% à 59% environ), et augmente également avec la viscosité de l'alginate^{248,249}. Cette technique n'a pas d'impact sur la viabilité des cellules d'après Branko *et al.*²⁴⁹, mais tout comme le régime de goutte à goutte par gravité, elle ne permet pas d'obtenir une vitesse de production élevée²⁴⁶.

3.1.3. Régime de goutte à goutte avec flux d'air co-axial

Afin de réduire la taille des gouttes produites en régime de goutte à goutte, il est également possible d'ajouter un système de flux d'air co-axial, qui va assister les forces de gravité et ainsi faire tomber des gouttes plus rapidement, et de diamètre plus petit. Il est ainsi possible d'obtenir des gouttes de 800 μm de diamètre environ²⁴⁴.

De nouveau, un exemple de société commercialisant ce type de dispositif est la société Nisco© (Figure 13) :

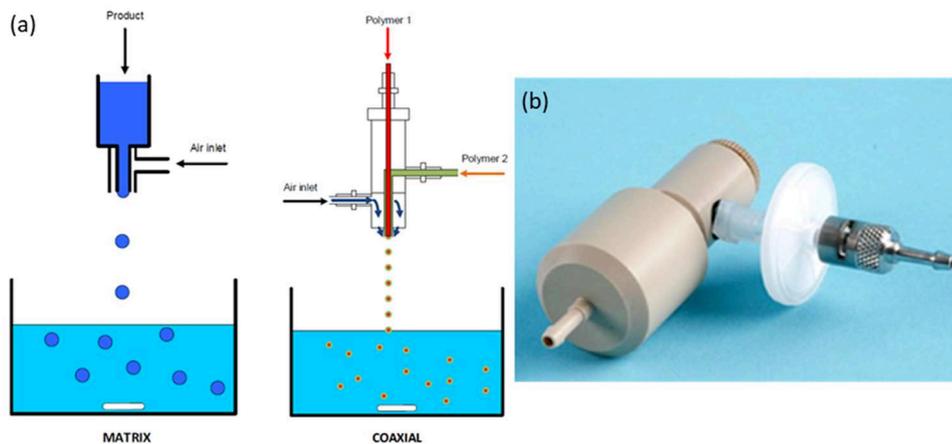


Figure 13 : Système de dripping en goutte à goutte avec flux d'air co-axial (Nisco©) - (a) fonctionnement ; (b) équipement

Cette technique permet de réduire la taille des gouttes, mais à un diamètre qui est encore important par rapport à la taille moyenne des îlots (140 μm)⁷³. Par ailleurs, l'ajout du flux d'air co-axial entraîne une distribution en taille plus importante, et les capsules obtenues sont donc plus poly-dispersées²⁴⁶. De plus, si le flux d'air n'est pas bien contrôlé, cela peut créer des turbulences qui mènent à un régime de spray, ce qui n'est pas idéal pour l'encapsulation d'îlots²⁴⁵ car les gouttes formées peuvent donc être trop petites par rapport à la taille des îlots. Enfin, cette technique ne peut pas non plus être utilisée pour des polymères trop visqueux (200mPa.s maximum, comme pour le régime de goutte à goutte par gravité)²⁴⁶.

3.1.4. Segmentation de jet par vibration

Il existe également des technologies formant des gouttes dans le régime de jet : régime dans lequel le débit appliqué est supérieur à un débit minimum à partir duquel le biopolymère forme un jet au lieu de former des gouttes. Afin de sectionner ce jet pour former les gouttes, il existe différentes techniques. La première est l'utilisation d'une buse vibrante. Grâce à l'application d'une vibration, le jet va se séparer en goutte dû à l'instabilité de Rayleigh²⁵⁰. Afin d'obtenir des gouttes les plus mono-dispersées possibles, il faut trouver le bon équilibre entre la fréquence de production et la vibration appliquée, celui-ci est obtenu lorsque le jet entre en résonance avec la vibration appliquée^{244,245}.

Il existe principalement trois entreprises qui commercialisent ce type d'équipements : Buchi© (voir Figure 14), Nisco© et Brace©²⁴⁴. Afin de trouver le bon point d'équilibre entre la fréquence et la vibration, ces appareils sont équipés de LED qui éclairent à la même fréquence que la

vibration appliquée sur le système. Ainsi, quand les conditions optimales sont trouvées, les gouttes doivent paraître immobiles²⁴⁴.



Figure 14 : Système de dripping en segmentation de jet par vibration (Buchi©)

Cette technique peut donc permettre d'obtenir des gouttes de taille relativement faible, et monodisperses, mais dans des conditions qui sont parfois compliquées à trouver, comme présenté précédemment. Par ailleurs, si le biopolymère utilisé est trop visqueux (viscosité supérieure à 200mPa.), il a un effet amortissant qui rend impossible l'utilisation de cette technique²⁴⁴.

3.1.5. Segmentation de jet par disque rotatif

Il existe une autre technique utilisant la segmentation de jet, mais à l'aide d'un disque rotatif équipé de fils fins. Cette technique, contrairement aux autres techniques de dripping citées précédemment, peut être utilisée avec des polymères visqueux. Elle a été présentée par Vorlop²⁵¹ en 1994 et a été développée par GeniaLab©. Le disque équipé de fils tourne sous le jet de biopolymère, et les fils viennent ainsi sectionner le jet de biopolymère en cylindres de mêmes tailles (voir Figure 15). Par la suite, les cylindres reprennent une forme sphérique sous l'effet de la tension de surface. Une partie du biopolymère peut être éjectée lors de la segmentation de jet. Afin de limiter ce phénomène, la roue peut être légèrement inclinée.

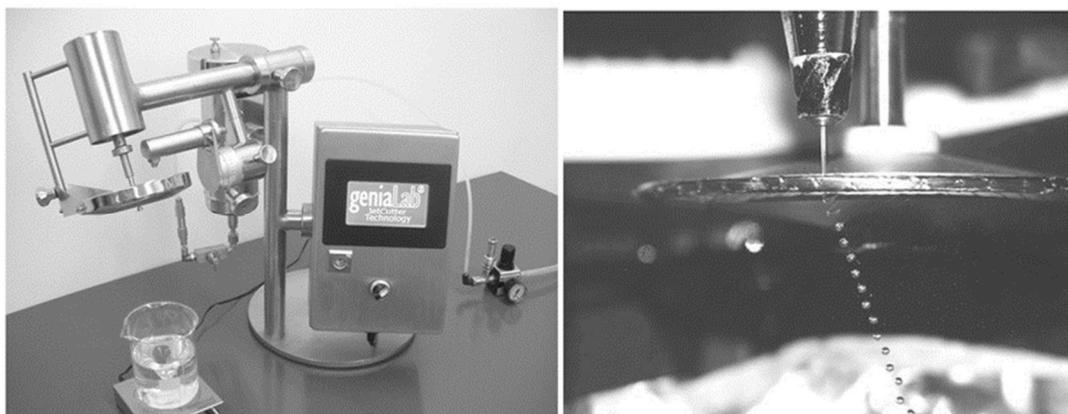


Figure 15 : Système de dripping en segmentation de jet par disque rotatif (GeniaLab©)

Cette technologie permet d'utiliser des polymères visqueux (plusieurs Pa.s)²⁵², et de former des capsules relativement monodisperses et de tailles réduites : jusqu'à 200 μ m de diamètre^{251,253,254}. Cependant, du biopolymère est perdu lors de la segmentation de jet, et par ailleurs, le cisaillement

subi par les cellules lors de leur passage dans l'aiguille à une pression élevée, ainsi que lors de la segmentation mécanique, est relativement élevé, même s'il n'empêche pas le développement des cellules encapsulées d'après Schwinger *et al.*²⁵²

3.1.6. Bilan des technologies de dripping

Les différentes technologies de dripping présentées permettent de former des capsules à des fréquences élevées pour les techniques de segmentation de jet, mais dont la forme n'est pas parfaitement contrôlée, et dont le diamètre peut difficilement atteindre moins de 500 μm . Le Tableau 5 résume les avantages (vert) et inconvénients (rouge) des différentes méthodes de dripping. La technique de segmentation de jet par disque rotatif semble présenter les meilleurs résultats, mais comme expliqué précédemment, le contrôle de la taille des gouttes n'est pas optimal, du biopolymère est perdu lors de la segmentation, et le cisaillement imposé sur les cellules est relativement élevé.

	Gravité	Potentiel électrostatique	Flux d'air co-axial	Vibration	Disque rotatif
Diamètre des capsules	Minimum 1,5 mm	Minimum 200 μm pour un polymère très peu visqueux	Minimum 800 μm	Minimum 500 μm	Minimum 200 μm
Mono-dispersité	CV > 15%	CV > 10%	CV \approx 10-15%	CV \approx 5-10% conditions difficiles à trouver	CV > 15% conditions difficiles à trouver
Productivité	Faible	\approx 4000 gouttes/min	\approx 4000 gouttes/min	Jusqu'à 40 000 gouttes/min	Jusqu'à 10 000 gouttes/s
Utilisation de polymère visqueux	Maximum 200 mPa.s	Jusqu'à plusieurs Pa.s mais produit des capsules beaucoup plus grandes et poly-disperses	Maximum 200 mPa.s	Maximum 200 mPa.s	Jusqu'à plusieurs Pa.s

Tableau 5 : Bilan des technologies de dripping

On peut donc voir que les technologies de dripping ne sont pas optimales, particulièrement en termes de contrôle de taille des gouttes, ainsi qu'en termes de gamme de viscosité de polymère utilisable. Par ailleurs, dans chacune des technologies de dripping présentées, les gouttes formées sont gélifiées en solution aqueuse de calcium, extérieure au système d'encapsulation. Par conséquent, la première goutte formée ne gélifie pas le même temps que la dernière, et les capsules obtenues n'ont donc pas exactement les mêmes propriétés mécaniques. Il est donc intéressant de se tourner vers des technologies permettant de contrôler plus précisément la taille des gouttes, tout en pouvant utiliser une gamme plus large de viscosité de polymère, et gélifier toutes les gouttes de manière uniforme. La microfluidique permet d'atteindre ces objectifs, comme cela est présenté dans la partie suivante.

3.2. Microfluidique

La microfluidique est la science et la technologie de la manipulation de faibles volumes de fluides (10^{-9} à 10^{-18} litres²⁵⁵) dans des canaux micrométriques (dont au moins une des dimensions varie de quelques dizaines à quelques centaines de micromètres²⁵⁵). Cette technologie a été développée dans les années 1980, et ses premières applications ont été dans le domaine de l'analyse, pour lequel la microfluidique présente de nombreux avantages : possibilité d'utiliser des très faibles quantités d'échantillon et réactifs, d'effectuer des séparations et détections à des bonnes résolutions et sensibilité, à faible coût, avec des temps d'analyse courts, et un faible impact sur l'appareil d'analyse²⁵⁶. La microfluidique est maintenant utilisée entre autres dans les domaines d'impression à jet d'encre, de puce à ADN, de technologies de laboratoires-sur-puce, de micropropulsion, et de technologies micro-thermiques²⁵⁷.

Les fluides peuvent s'écouler selon différents régimes : le régime turbulent, où la vitesse présente en tout point un caractère tourbillonnaire, dont la taille, la localisation et l'orientation varient constamment ; le régime laminaire, où l'écoulement est de manière parallèle et dans la même direction ; et le régime intermédiaire. Ces différents régimes sont caractérisés par le nombre de Reynolds (sans dimension), défini par l'équation (2), où ρ est la masse volumique du fluide (kg/m^3) ; u est la vitesse du fluide (m.s^{-1}) ; l est une longueur caractéristique du système ; et η est la viscosité dynamique du fluide (Pa.s) :

$$Re = \frac{\rho ul}{\eta} \quad (2)$$

Un écoulement turbulent est caractérisé par un nombre de Reynolds supérieur à 1, et un écoulement laminaire est caractérisé par un nombre de Reynolds inférieur à 1. Dans les systèmes microfluidiques, le nombre de Reynolds est inférieur à 1 et le régime est donc laminaire, car les forces visqueuses et capillaires dominent sur les forces inertielles (contrairement à des écoulements de fluides macroscopiques, où l'inertie est plus importante)²⁵⁵. Cela permet d'avoir un contrôle beaucoup plus précis sur le déplacement des fluides. Un autre avantage de la microfluidique est la possibilité de manipuler des fluides multiphasiques. En effet, il est ainsi possible de produire et contrôler des gouttes monodisperses d'une phase dispersée gazeuse ou liquide, dans un flux de phase continue liquide non miscible^{255,258-260}.

Les micro-gouttes ainsi formées présentent des propriétés intéressantes : taille réduite, large surface, vitesse de production, taille uniforme, stabilité interne etc.²⁶¹, et sont utilisées dans différents domaines comme la libération contrôlée de médicaments, la détection de virus, la synthèse de particules, et en particulier l'encapsulation de cellules.

3.2.1. Dispositifs de génération de goutte

Les méthodes de génération de goutte en microfluidique peuvent être séparées en deux catégories : active et passive^{261,262}. Les méthodes actives utilisent une force extérieure afin d'aider à la formation de la goutte, comme un déclencheur piézoélectrique, un système thermique, un champ électrique ou magnétique²⁶¹. Les méthodes passives, à l'inverse, utilisent uniquement la géométrie, les dimensions des canaux microfluidiques, et les débits des deux phases non miscibles (contrôlés par des pousse-seringue ou des contrôleurs en pression), afin de déformer l'interface entre les deux fluides et augmenter les instabilités interfaciales, jusqu'à la formation de gouttes monodisperses (dont la polydispersité est généralement de 1 à 3 %^{261,262}).

La majorité des études utilisent les méthodes de génération de goutte passives. Nous nous intéresserons dans la suite de cette partie uniquement à ces méthodes. Pour plus d'information sur les méthodes actives, il est possible de se référer aux revues de Zhu *et al.*²⁶³, Gu *et al.*²⁶² ou de Teh *et al.*²⁶⁴ Parmi les méthodes passives présentées par la suite, les techniques les plus utilisées sont la jonction T et les géométries à focalisation d'écoulement (flow focusing devices), présentées dans les parties 3.2.2 et 3.2.5. Pour un descriptif plus détaillé de ces techniques, il est possible de se référer aux revues citées précédemment, ainsi qu'à celle de Vladislavjevic *et al.*²⁶⁵

3.2.2. Jonction-T et jonction-Y

La jonction-T est la structure microfluidique la plus simple pour produire des gouttes. Cette géométrie a été présentée pour la première fois par Thorsen *et al.* en 2001²⁶⁰. La phase continue est portée par le canal principal, et la phase dispersée est injectée dans ce canal principal par un canal perpendiculaire à celui-ci. Les deux fluides forment une interface à la jonction des canaux, et par contrôle de l'écoulement des fluides, la phase dispersée entre dans le canal principal. Les forces de cisaillement produites par la phase continue entraînent un amincissement de la phase dispersée dans le canal principal, jusqu'à rupture et formation d'une goutte^{262,264-266} (voir Figure 16).

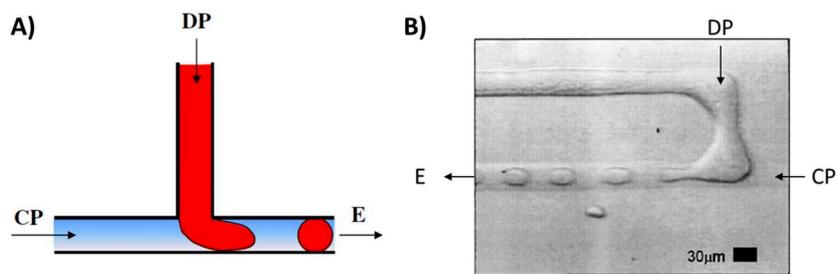


Figure 16 : Jonction-T (CP – Phase Continue, DP – Phase Dispersée, et E – Emulsion) ; A) Schéma de fonctionnement²⁶⁵; B) Dispositif utilisé par Thorsen *et al.*²⁶⁰

La taille des gouttes obtenues dépend des débits et rapports des débits des deux phases, de la dimension des canaux, de la viscosité des deux phases, et de l'utilisation de tensioactifs et leur concentration^{262,264}. Elle peut également être contrôlée activement par des forces extérieures comme des micro-vannes pneumatiques^{267,268} ou magnétiques²⁶⁹, ou des micro éléments chauffants²⁷⁰.

Il est aussi possible de modifier légèrement la géométrie de la jonction-T, pour une forme en Y par exemple, utilisée entre autres par Steegmans *et al.*^{271,272} ou Hong *et al.*²⁷³ (voir Figure 17). Les équipes de Steegmans *et al.* ont démontré qu'une Jonction-Y plane peut être utilisée comme tensiomètre microfluidique²⁷². Contrairement à la jonction-T, la taille des gouttes en jonction-Y est indépendante du débit et de la viscosité de la phase dispersée, elle dépend uniquement de la taille du canal et du nombre capillaire de la phase continue, défini par l'équation (3), où u est la vitesse du fluide ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) ; μ est la viscosité dynamique ($\text{Pa}\cdot\text{s}$) ; et σ est la tension superficielle ($\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$)^{265,271} :

$$Ca = \frac{u\mu}{\sigma} \quad (3)$$

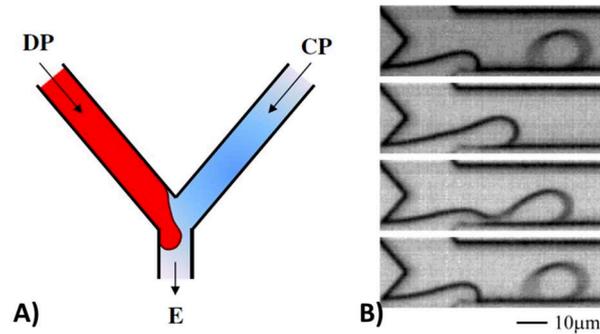


Figure 17 : Jonction-Y (CP – Phase Continue, DP – Phase Dispersée, et E – Emulsion) ; A) Schéma de fonctionnement²⁶⁵ ; B) Dispositif utilisé par Hong et al²⁷³.

3.2.3. Jonction-croix

Une autre géométrie proche de la jonction-T est la jonction-croix ou jonction-X. Ici, la phase dispersée est cisailée perpendiculairement et symétriquement par deux flux de phase continue opposés (voir Figure 18 A). Cela permet d’avoir une formation de gouttes plus contrôlée et stable²⁶⁴. Cette géométrie est utilisée entre autres par les équipes de Liu et Zhang²⁷⁴ et Hoa *et al.*²⁷⁵ (voir Figure 18 B).

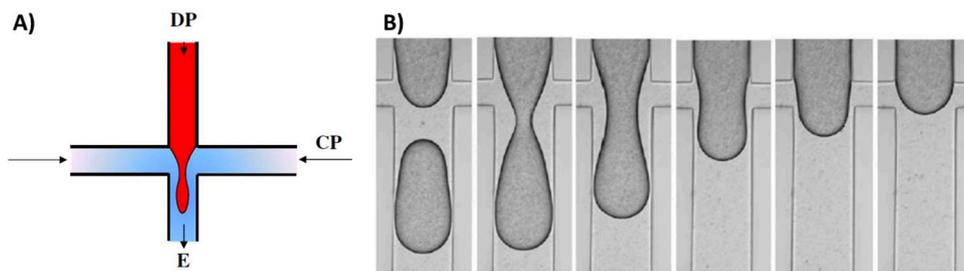


Figure 18 : Jonction-croix (CP – Phase Continue, DP – Phase Dispersée, et E – Emulsion) ; A) Schéma de fonctionnement²⁶⁵ ; B) Dispositif utilisé par Hoa et al.²⁷⁵

3.2.4. Géométrie à co-écoulement coaxial

La géométrie à co-écoulement coaxial a été introduite pour la première fois en 2004 par Cramer *et al.*²⁷⁶ Elle consiste en deux tubes alignés co-axialement : un microcanal contenant la phase continue, dans lequel est intégré un capillaire contenant la phase dispersée (voir Figure 19). La phase dispersée est donc cisailée par la phase continue tout autour de l’orifice du capillaire, afin de former des gouttes.

Les gouttes peuvent être obtenues selon deux mécanismes différents : directement au bout du capillaire (c’est le régime de goutte à goutte ou dripping), ou bien au bout d’un jet formé à la sortie du capillaire par la phase dispersée (c’est le régime de jet ou jetting) (voir Figure 19 B). La taille des gouttes obtenues, et le mécanisme d’obtention de ces gouttes dépendent des débits appliqués sur les phases continue et dispersée^{265,266}. En effet, pour un débit de phase dispersée faible, le cisaillement appliqué par la phase continue est important par rapport aux forces de tension de surface, et on obtient ainsi un régime de goutte à goutte. A l’inverse, pour un débit de phase dispersée suffisamment élevé par rapport au débit de phase continu, la force d’inertie de la phase

dispersée est plus importante que les forces de tension de surface, et on obtient un régime de jet^{265,266,276}.

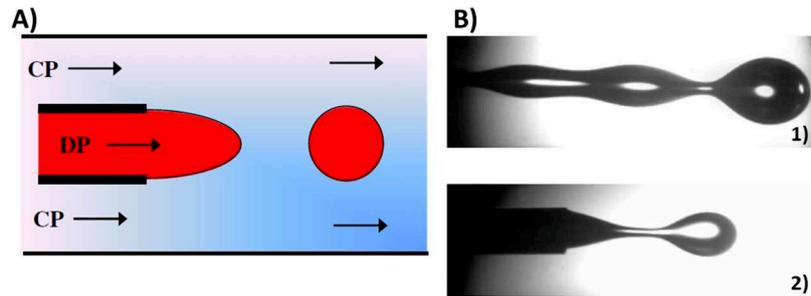


Figure 19 : Géométrie à co-écoulement coaxial (CP – Phase Continue, DP – Phase Dispersée) ; A) Schéma de fonctionnement²⁶⁵ ; B) Dispositif utilisé par Cramer et al.²⁷⁶ : 1) régime de jet, 2) régime de goutte à goutte

3.2.5. Géométries à focalisation d'écoulement (Flow Focusing Device)

La géométrie à focalisation d'écoulement consiste en un système plan ou cylindrique de jonction-croix ou de géométrie à co-écoulement coaxial, auquel est ajouté un orifice étroit juste avant le canal de sortie, appelé focalisation d'écoulement hydrodynamique^{265,277-279}. Comme on peut le voir en Figure 20 A et Figure 21 A, la phase dispersée est contenue dans le canal central, et est cisailée symétriquement par deux flux de phase continue opposés. Le co-écoulement de phase continue et phase dispersée est alors amené à l'intérieur de l'orifice, où le fluide extérieur (phase continue) applique une pression et un cisaillement importants sur le fluide intérieur (phase dispersée). Ce dernier est alors sous forme de jet très étroit, qui se rompt à l'intérieur de l'orifice ou en aval de celui-ci, pour former des gouttes^{259,265}.

La présence de deux flux symétriques de phase continue cisailants, au lieu d'un seul pour la jonction-T, et de l'orifice en aval du canal, permettent d'avoir une génération de gouttes plus stable et contrôlée, et ainsi d'obtenir des gouttes plus monodisperses²⁶⁴. En effet, la focalisation d'écoulement hydrodynamique permet (pour certaines gammes de pressions) à la rupture de la phase dispersée d'avoir lieu à ce point précis, et ainsi de s'assurer de la reproductibilité et monodispersité des gouttes obtenues²⁶⁴.

La géométrie à focalisation d'écoulement a été utilisée pour la première fois par Gañán-Calvo *et al.* en 1998 pour la formation de gouttes d'eau dans un flux d'air²⁸⁰ et en 2001 pour la formation de bulles d'air dans un liquide²⁸¹. La première utilisation pour une émulsion a été proposée par Anna *et al.*²⁵⁹ en 2003 sur une version plane (Micro Flow Focusing Device MFFD), pour former des gouttes d'eau dans de l'huile (voir Figure 21 B et C). Ces études ont démontré que la taille des gouttes dépend du débit d'huile (phase continue) et du rapport entre les débits de phase continue et phase dispersée, ainsi que de la géométrie du dispositif et de la viscosité des phases continue et dispersée.

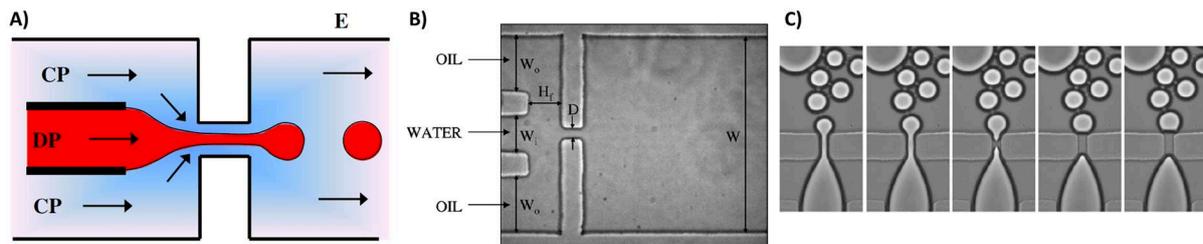


Figure 20 : Géométrie à focalisation d'écoulement plane (MFFD) (CP – Phase Continue, DP – Phase Dispersée, et E – Emulsion) ; A) Schéma de fonctionnement²⁶⁵ ; B) Dispositif utilisé par Anna et al.²⁵⁹ ; C) Formation de goutte avec rupture de la phase dispersée au sein de la focalisation d'écoulement hydrodynamique, dans le dispositif utilisé par Anna et al.²⁵⁹

Le dispositif en version cylindrique de la focalisation d'écoulement hydrodynamique, utilisée après un système de co-écoulement coaxial, est appelé dispositif axisymétrique^{262,263,265,282,283} (Axisymmetric Flow Focusing Device AFFD). Ce système fonctionne de la même manière qu'un MFFD, mais en 3D (voir Figure 21 A). Cela permet d'éviter des problèmes présents en système MFFD comme la mouillabilité de la phase dispersée aux parois de l'orifice²⁸³, et ainsi d'obtenir des gouttes monodisperses à des fréquences de production plus élevées qu'en MFFD^{263,283}. Ce système est utilisé entre autres par les équipes de Takeuchi *et al.*²⁸³ (voir Figure 21 B et C) et Schneider *et al.*²⁸²

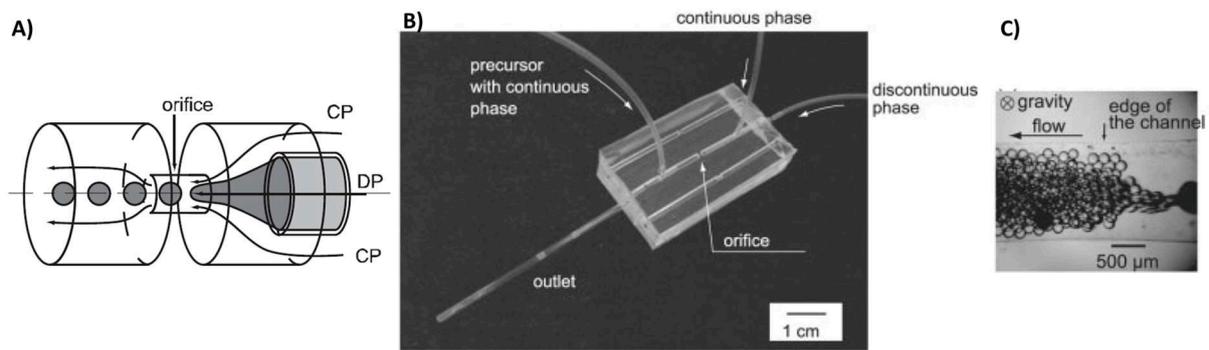


Figure 21 : Géométrie à focalisation d'écoulement axisymétrique (AFFD) (CP – Phase Continue, DP – Phase Dispersée) ; A) Schéma de fonctionnement²⁸³ ; B) Dispositif utilisé par Takeuchi et al.²⁸³ ; C) Formation de gouttes avec le dispositif utilisé par Takeuchi et al.²⁸³

Il existe quatre régimes de formation de goutte en MFFD : un régime de pincement (squeezing), un régime de goutte à goutte (dripping), un régime de jet (jetting), et un régime de tip-streaming^{263,265} (voir Figure 22).

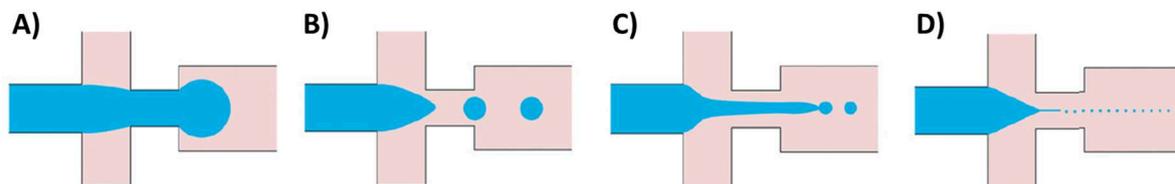


Figure 22 : Régimes de formation de goutte en géométries à focalisation d'écoulement : A) Pincement ; B) Goutte à goutte ; C) Régime de jet ; D) Tip-streaming

Dans le régime de pincement (ou squeezing), la phase dispersée forme une avancée qui occupe presque toute la largeur de l'orifice, la phase continue occupe seulement une fine épaisseur entre la paroi de l'orifice et l'interface avec la phase dispersée. La réduction de l'espace disponible pour la phase continue entre l'interface et les parois entraîne un gradient de pression autour de la phase dispersée, et lorsque ce gradient de pression est plus important que la pression à l'intérieur de la

phase dispersée, l'interface de cette dernière est pincée et une goutte est formée^{263,265}. Ce régime est aussi appelé le régime contrôlé par la géométrie, et les gouttes formées ont une taille proche ou supérieure à celle de l'orifice.

Dans le régime de goutte à goutte (ou dripping), la phase dispersée prend une forme de jet qui s'amincit de par la contrainte visqueuse imposée par la phase continue. Ces forces visqueuses prennent le dessus sur la tension interfaciale qui tend à stabiliser l'interface entre les phases continue et dispersée, jusqu'à formation d'une goutte de cette dernière. La rupture de la phase dispersée a lieu à l'intérieur de l'orifice, et les gouttes obtenues sont monodisperses et ont un diamètre approximativement égal à la largeur de l'orifice^{259,263,265}.

Le régime de jet (ou jetting) apparaît lorsque le débit de la phase dispersée est augmenté. Le jet formé par la contrainte visqueuse de la phase continue est alors plus long que dans le régime de goutte à goutte, et avance jusqu'à dépasser l'orifice, jusqu'à se séparer en gouttes par instabilité de Plateau-Rayleigh^{250,263,265}. La formation de gouttes est donc moins contrôlée et les gouttes obtenues sont plus grosses, et beaucoup moins monodisperses que celles obtenues en régime de goutte à goutte, à cause également des perturbations capillaires^{263,265}.

Le régime de tip-streaming a lieu en présence de tensioactif, à des rapport de débits de phase continue sur phase dispersée très élevés²⁸⁴. Ce phénomène a été démontré pour la première fois en 1934 par Taylor et al.²⁸⁵, où une goutte isolée a été soumise à un flux et étirée jusqu'à observer des extrémités en pointe. Des micro-gouttes ou jets très fins sont alors formés depuis ces extrémités^{265,285}. Ce phénomène a été utilisé par la suite en microfluidique par de nombreuses équipes^{265,286-292}. La phase dispersée forme un jet très long et très fin (dont l'épaisseur est plus fine que le diamètre de l'orifice de 2 ou 3 ordres de grandeur²⁶³), au bout duquel les gouttes sont formées. Il permet de produire des gouttes beaucoup plus petites qu'avec les autres régimes, et dépend fortement de la concentration en tensioactif^{265,284}.

Dans tous les dispositifs de formation de goutte présentés, il est donc possible d'obtenir des gouttes de taille précisément contrôlée (par la taille des canaux, les débits appliqués, et le régime de formation de goutte choisi), et par conséquent monodisperses ($CV < 5\%$), quelle que soit la viscosité de la phase dispersée. La taille des gouttes obtenues peut aller de quelques micromètres de diamètre (en tip-streaming) à quelques centaines de micromètres. Ces technologies microfluidiques sont donc particulièrement adaptées à l'encapsulation de cellules pour la thérapie cellulaire du diabète de type 1.

3.2.6. Géométrie utilisée pour la thèse

Dans le cadre de cette thèse, la géométrie choisie est celle de Tan *et al.*²⁹³ Il s'agit d'une jonction croix suivie d'un élargissement du canal de sortie sous forme de chambre triangulaire (voir Figure 23 A). Ces équipes témoignent d'une focalisation du gradient de vitesse provoqué par cet élargissement (voir Figure 23 B), qui permet de contrôler précisément la localisation de la rupture de la phase dispersée, et ainsi d'obtenir des gouttes parfaitement monodisperses, dont la taille dépend des débits des phase continue et dispersée.

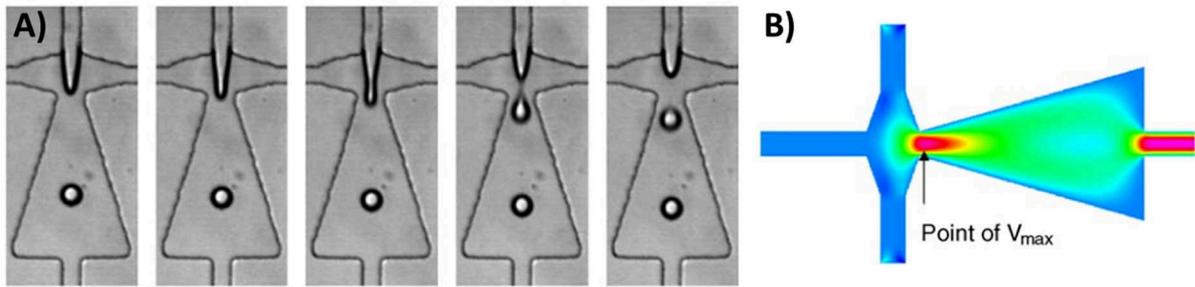


Figure 23 : Géométrie utilisée par Tan *et al.*²⁹³ : A) Dispositif utilisé ; B) Modélisation de la focalisation du gradient de vitesse au niveau de l'orifice de la jonction

Il s'agit donc d'une géométrie à la fois proche du type jonction croix, et des géométries à focalisation d'écoulement grâce à la chambre triangulaire. D'après Tan *et al.*, cette chambre triangulaire permet un contrôle précis de la rupture de la phase dispersée et donc de la taille des gouttes. De plus, la formation des gouttes suit les mêmes régimes qu'en MFFD. Par conséquent, dans la suite de cette thèse, la géométrie sera appelée MFFD.

3.2.7. Intégration de la gélification en microsystème

Comme expliqué précédemment, il est important de gélifier chaque goutte formée de manière uniforme, afin d'obtenir des capsules de propriétés mécaniques égales. Cela est possible en microfluidique, en intégrant l'étape de gélification dans le microsystème. Comme cela a été présenté dans la partie 2.2.2, la gélification peut s'effectuer de manière interne ou externe. Ces deux méthodes ont été intégrées dans des systèmes microfluidiques par différentes équipes.

3.2.7.1. Gélification interne

Afin de gélifier l'alginate par gélification interne en microfluidique, la technique utilisée le plus fréquemment par les différentes équipes est une génération de gouttes d'alginate contenant du carbonate de calcium (CaCO_3), soit cisailé directement par une huile contenant de l'acide acétique (voir Figure 24 A), soit cisailé par une huile neutre et suivi d'un co-écoulement de l'huile contenant les gouttes d'alginate + CaCO_3 avec une huile contenant de l'acide acétique (voir Figure 24 B). La diffusion de l'acide acétique ainsi présent dans la phase continue vers les gouttes d'alginate va permettre de dissocier le carbonate de calcium à l'intérieur des gouttes d'alginate selon la réaction décrite en partie 2.2.2, et diffuser les cations bivalents Ca^{2+} , entraînant ainsi la gélification des gouttes. Cette technique est utilisée entre autres par Zhang *et al.* (avec du CaCO_3 et de l'huile de soja contenant de l'acide acétique)²⁹⁴, et Tan et Takeuchi (avec du CaCO_3 et de l'huile de maïs contenant de l'acide acétique)²⁹⁵.

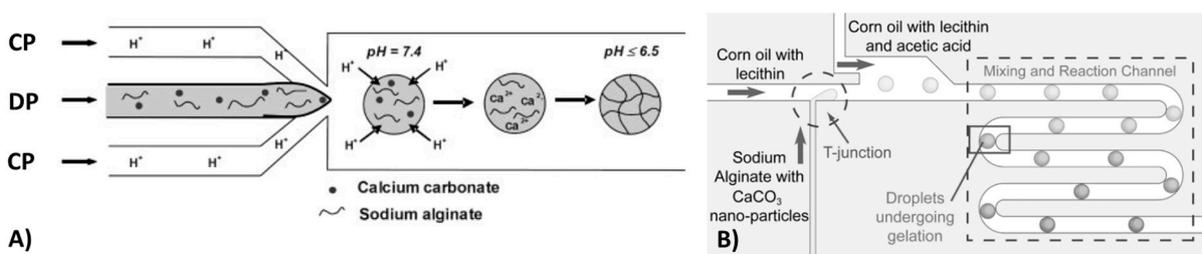


Figure 24 : Gélification interne en système microfluidique : A) Schéma du système utilisé par Zhang *et al.*²⁹⁴ : CP = Phase Continue d'huile de soja + acide acétique, DP = Phase Dispersée d'alginate + carbonate de calcium ; B) Schéma du système utilisé par Tan et Takeuchi²⁹⁵

L'équipe d'Akbari *et al.*²⁹⁶ utilise également la gélification interne, mais avec un système différent : les capsules sont constituées d'un cœur d'alginate + cellules, ne contenant pas de CaCO_3 , et le carbonate de calcium est contenu dans une couche externe d'alginate. Pour cela, un co-écoulement d'alginate + cellules avec de l'alginate + CaCO_3 est effectué, puis ce co-écoulement est cisailé par de l'huile contenant de l'acide acétique, afin de former des gouttes qui sont ensuite gélifiées par diffusion de l'acide et dissociation du CaCO_3 (voir Figure 25).

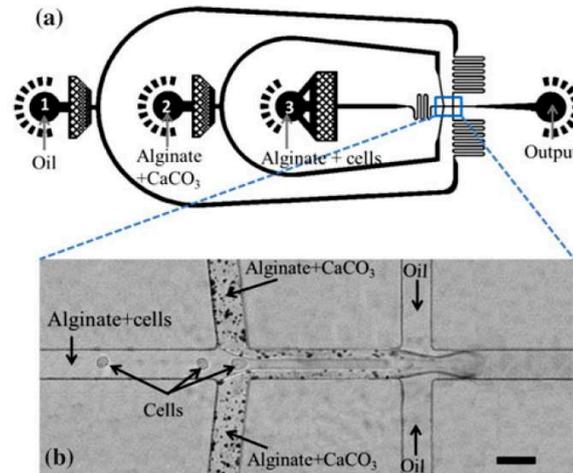


Figure 25 : Gélification interne en microfluidique, système utilisé par Akbari *et al.*²⁹⁶ : (a) Schéma de fonctionnement ; (b) Formation de gouttes cœur alginate-cellules, couche externe alginate- CaCO_3 , dans le dispositif utilisé

3.2.7.2. Gélification externe

La gélification externe en système microfluidique peut avoir lieu de différentes manières :

- Par formation de gouttes d'alginate et formation de gouttes de solution aqueuse de calcium, puis coalescence des deux (voir Figure 26 A)
- Par mélange de la phase dispersée et de la phase aqueuse gélifiante au niveau de la formation de goutte (voir Figure 28)
- Par apport de l'ion calcium depuis un agent gélifiant présent dans la phase organique (voir

Coalescence de gouttes :

La première méthode est utilisée par les équipes de Hong *et al.*²⁹⁷ et Shintaku *et al.*²⁹⁸ avec un MFFD formant les gouttes d'alginate par cisaillement par de l'huile, puis un apport de gouttes de solutions aqueuses de chlorure de calcium par un ou deux canaux latéraux (voir Figure 26 A). Ces équipes témoignent d'une viabilité des cellules encapsulées non affectée par l'encapsulation, mais les capsules obtenues ne sont pas du tout sphériques et monodisperses (voir Figure 26 B et C).

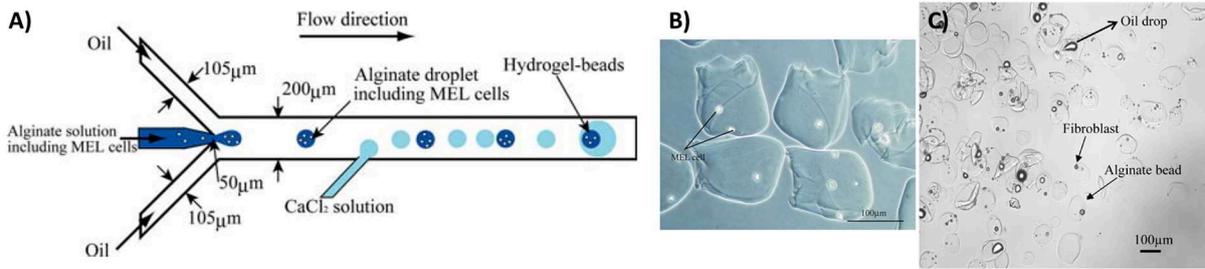


Figure 26 : Gélification externe en système microfluidique par coalescence de gouttes : A) Schéma du fonctionnement utilisé par Shintaku et al.²⁹⁸ ; B) Capsules obtenues par Shintaku et al.²⁹⁸ ; C) Capsules obtenues par Hong et al.²⁹⁷

Liu et al.²⁹⁹ ont également utilisé la méthode de coalescence de gouttes, mais dans leur système, les gouttes d'alginate et de solution aqueuse de CaCl_2 sont générées par un MFFD individuel, et coalescent dans une chambre prévue à cet effet (voir Figure 27). Cette méthode permet d'obtenir des capsules beaucoup plus monodisperses ($\text{CV} < 3\%$), mais dont la sphéricité n'est pas optimale.

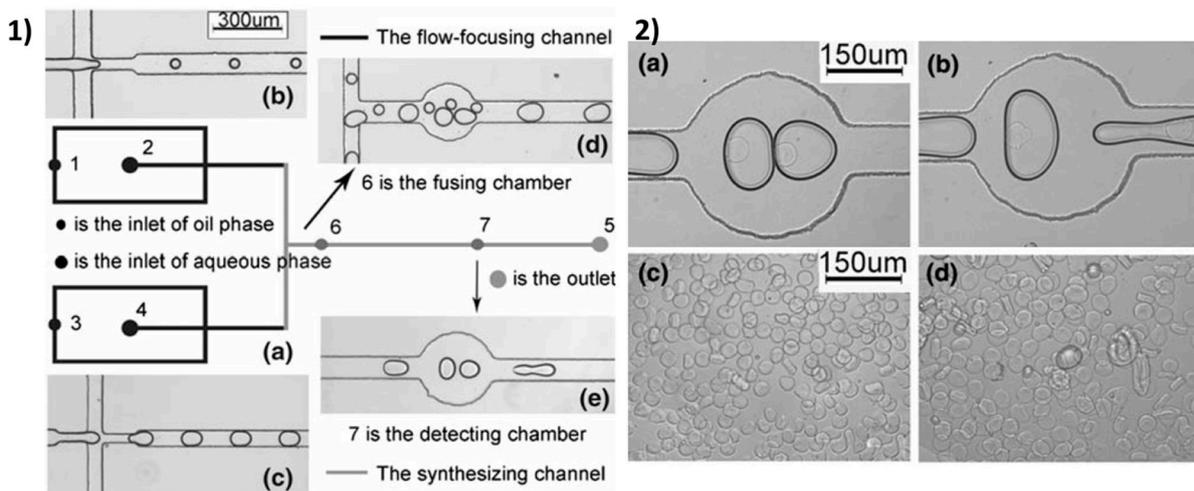


Figure 27 : Gélification externe en système microfluidique par coalescence de gouttes : 1) Schéma du fonctionnement utilisé par Liu et al.²⁹⁹ : (b) génération des gouttes d'alginate, (c) génération des gouttes de CaCl_2 , (d) coalescence des gouttes ; 2) (a) et (b) chambre utilisée pour la coalescence des gouttes, (c) et (d) capsules obtenues

Mélange des deux phases au niveau de la jonction

Cette deuxième technique consiste à injecter l'alginate et la phase aqueuse de calcium en même temps, qui se mélangent donc avant de former des gouttes dans la phase continue à l'aide d'une jonction T, Y ou croix (voir Figure 28 A). Cette technique est utilisée entre autres par Rondeau et al.³⁰⁰ (avec du DiméthylCarbonate en guise de phase continue) et Choi et al.³⁰¹ (avec de l'Hexadécane en guise de phase continue), et permet d'obtenir des capsules très sphériques et monodisperses (voir Figure 28 B).

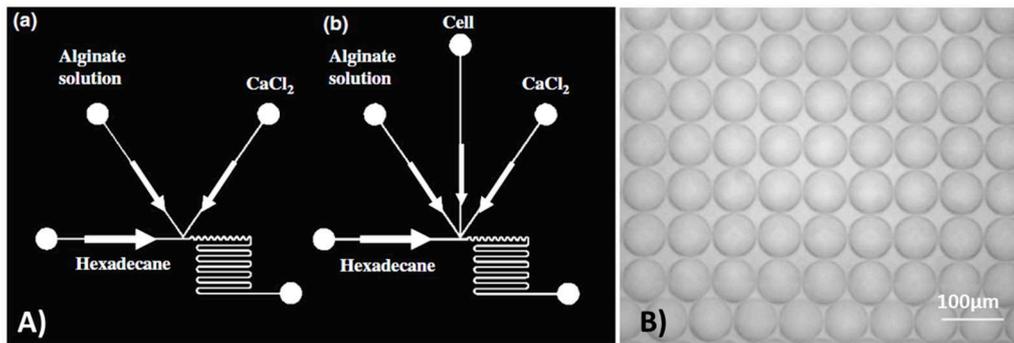


Figure 28 : Gélification externe en système microfluidique par mélange au niveau de la jonction, exemple de Choi et al.³⁰¹ : A) Schéma du fonctionnement utilisé ; B) Capsules obtenues

Apport de l'agent gélifiant dans la phase organique

Dans cette méthode, les gouttes d'alginate sont tout d'abord formées, puis une phase organique contenant un agent gélifiant est mise en contact avec la phase continue portant les gouttes d'alginate, par le biais d'un co-écoulement par exemple (voir Figure 29). Cette technique peut ainsi également être utilisée en étape de pré-gélification de l'alginate, avant que ce dernier soit gélifié complètement par une solution aqueuse. Elle est utilisée entre autres par les équipes de Zhang et al.²⁹⁴ (la phase organique gélifiante est de l'huile de soja contenant de l'acétate de calcium), Kim et al.^{302,303}, et Lee et al.³⁰⁴ (la phase organique gélifiante pour les deux derniers est de l'acide oléique contenant du chlorure de calcium). Cette technique permet d'obtenir des capsules lisses et sphériques, tout en maintenant une bonne viabilité des cellules.

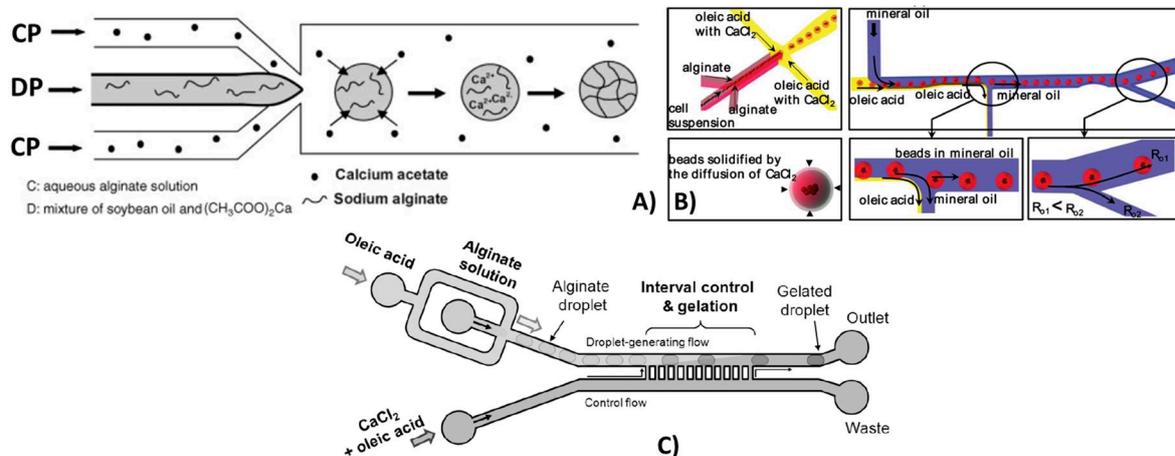


Figure 29 : Gélification externe en système microfluidique par apport de l'agent gélifiant dans la phase organique : A) Schéma du fonctionnement utilisé par Zhang et al.²⁹⁴ ; B) Schéma du fonctionnement utilisé par Kim et al.³⁰² ; C) Schéma du fonctionnement utilisé par Lee et al.³⁰⁴

Ces différentes techniques d'intégration de la gélification en microsystème permettent de gélifier chaque goutte la même durée, et par conséquent d'obtenir des capsules aux propriétés mécaniques identiques. Cependant, comme on a pu le voir, selon la méthode utilisée, les capsules ne sont pas toujours sphériques et lisses, ce qui est problématique dans une optique de greffe de ces capsules (voir partie 1.3.2). Concernant la gélification externe, les techniques qui semblent le plus adaptées pour une application d'encapsulation cellulaire pour le diabète de type 1 sont soit par mélange des deux phases au niveau de la jonction, soit par apport de l'agent gélifiant dans la phase organique. Dans le cadre de cette thèse, la méthode qui sera utilisée est la seconde.

3.3. Bilan et comparaison des technologies de microencapsulation

Afin de comparer les différentes technologies d'encapsulation, le tableau récapitulatif des technologies de dripping est rappelé en Tableau 6, auquel une colonne est ajoutée pour les technologies microfluidiques.

	Gravité	Potentiel électrostatique	Flux d'air co-axial	Vibration	Disque rotatif	Micro-fluidique
Diamètre des capsules	Minimum 1,5 mm	Minimum 200 μm pour un polymère très peu visqueux	Minimum 800 μm	Minimum 500 μm	Minimum 200 μm	5-1000 μm
Mono-dispersité	CV > 15%	CV > 10%	CV \approx 10-15%	CV \approx 5-10% conditions difficiles à trouver	CV > 15% conditions difficiles à trouver	CV < 5%
Productivité	Faible	\approx 4000 gouttes/min	\approx 4000 gouttes/min	Jusqu'à 40 000 gouttes/min	Jusqu'à 10 000 gouttes/s	Jusqu'à 10 000 gouttes/s
Utilisation de polymère visqueux	Maximum 200 mPa.s	Jusqu'à plusieurs Pa.s mais capsules beaucoup plus grandes et poly-disperses	Maximum 200 mPa.s	Maximum 200 mPa.s	Jusqu'à plusieurs Pa.s	Jusqu'à plusieurs Pa.s
Gélification	Externe au système, temps de gélification non uniforme entre première et dernière capsule collectées					Uniforme

Tableau 6 : Bilan comparatif des différentes technologies de microencapsulation

On peut donc voir que la microfluidique présente les meilleurs résultats dans une optique d'encapsulation de cellules pour le diabète de type 1. En effet, cette technologie permet d'obtenir des capsules monodisperses (CV<5%), lisses, sphériques, de taille inférieure à 200 μm , et cela même avec des polymères très visqueux. Par ailleurs, comme expliqué précédemment, l'intégration de la gélification en microsystème permet d'obtenir des capsules reproductibles. Enfin, de la même manière que la gélification, des procédés de rinçage et de transfert de capsules peuvent être intégrés en microfluidique également, permettant ainsi d'obtenir un système automatisé et reproductible.

4. Bilan et choix pour la thèse

On a donc pu voir que de nombreux essais cliniques utilisant des îlots de Langerhans en macroencapsulation ou microencapsulation sont en cours. Les différents résultats ont montré qu'il est possible de protéger les îlots du système immunitaire, mais dans les techniques de macroencapsulation, ces derniers sont confrontés à un manque d'oxygène. Les techniques de microencapsulation semblent donc plus adaptées à une meilleure survie des îlots *in vivo*.

Parmi les différentes technologies de microencapsulation, il a été démontré que la microfluidique donne de bien meilleurs résultats en termes de taille et forme de capsules, monodispersité, reproductibilité et automatisation.

Concernant les matériaux utilisés pour l'encapsulation, l'alginate est le meilleur candidat car il est biotolérable, chargé négativement, gélifie en conditions physiologiques et est disponible en grande quantité et à coût modéré sous forme purifiée. Cependant, ses propriétés mécaniques sont limitées et les résultats *in vivo* ne sont donc pour l'instant pas optimaux. Différentes équipes s'intéressent donc au fait d'améliorer l'alginate en termes de propriétés mécaniques, afin de lui conférer une meilleure résistance et plus longue stabilité *in vivo*. Pour cela, il est possible par exemple de modifier chimiquement l'alginate afin d'ajouter des liaisons covalentes aux liaisons ioniques présentes dans les gels d'alginate conventionnels, donnant lieu ainsi à une double gélification. Ce type d'alginate est développé entre autres par l'École Polytechnique Fédérale de Lausanne, mais la technologie d'encapsulation utilisée est une technologie de dripping.

Dans le cadre de cette thèse, le choix s'est donc porté sur ce type d'alginate modifié chimiquement, couplé à une technologie d'encapsulation en microfluidique. Pour cela, l'alginate a été développé par l'EPFL, et le système microfluidique au sein du laboratoire d'accueil de cette thèse, au CEA de Grenoble. La géométrie ayant été choisie pour la formation de gouttes est le système MFFD développé par Tan *et al.*²⁹³, et la technique de gélification choisie est celle de Zhang *et al.*²⁹⁴, consistant en une pré-gélification des gouttes d'alginate à l'aide d'une huile de soja contenant une dispersion d'acétate de calcium, avant de terminer la gélification des gouttes dans une solution aqueuse de calcium.

Le but de la thèse a donc été tout d'abord de réussir à produire des capsules en microfluidique avec les alginates modifiés chimiquement par l'EPFL. Pour cela, différentes caractérisations des fluides et du système ont été effectuées, qui seront décrites par la suite, afin de comprendre les mécanismes mis en jeu. Après être parvenu à former des capsules avec les différents alginates aux propriétés physico-chimiques variées, les propriétés de ces dernières étant importantes pour une application d'encapsulation de cellules ont été caractérisées. Enfin, des îlots de porcs néonataux ont été encapsulés et caractérisés *in vitro* et *in vivo*.

Chapitre 2 : Positionnement de l'étude

Table des matières

1. Description du projet	72
2. Méthodologie suivie	73
2.1 Pré-encapsulation.....	73
2.2 Formation de gouttes	74
2.3 Gélification des gouttes.....	74
2.4 Post encapsulation : caractérisation des capsules	74
3. Contraintes de l'étude	75

1. Description du projet

Les travaux effectués dans le cadre de cette thèse s'inscrivent dans un projet nommé FUTURCAPS (ANR-15-CE18-0022-02). Ce projet collaboratif implique l'Université Grenoble Alpes, l'École Polytechnique Fédérale de Lausanne, l'Hôpital Universitaire de Genève, l'Etablissement Français du Sang de Grenoble, et le CEA. Ce projet a deux ambitions : développer et évaluer de nouveaux matériaux d'encapsulation, et évaluer et comparer les technologies d'encapsulation. Pour cela, les performances de 2 différentes technologies d'encapsulation sont utilisées :

- L'encapsulation dite « classique » utilisant l'encapsulateur B-395 Pro produit par Buchi©, avec lequel les capsules d'alginate sont formées par dripping avec segmentation de jet par vibration, comme présenté dans l'Etat de l'art. Cet équipement est disponible à l'hôpital de Genève
- L'encapsulation en microfluidique, utilisant une géométrie à focalisation d'écoulement développée par Tan *et al.*²⁹³, présentée également dans l'Etat de l'art.

Afin d'étudier l'influence du matériau d'encapsulation, différents alginates sont utilisés :

- Un alginate de référence pour les encapsulations en microfluidique : l'ultra-pur Pronova™ SLG100, commercialisé par NovaMatrix.
- Un alginate de référence pour les encapsulations en goutte à goutte : l'alginate ultra-pur Pronova™ UP LVM, commercialisé également par NovaMatrix
- Des alginates modifiés chimiquement : différents processus réactionnels expliqués par la suite (Chapitre Pré-Encapsulation) sont suivis afin de greffer des dérivés de PolyÉthylène Glycol (PEG), contenant des groupements thiol (SH), acrylates, ou kétoprofène sur les chaînes carbonnées d'un alginate commercial Kelton HV (commercialisé par Kelco, San Siego, USA). Ainsi, 3 types d'alginates modifiés chimiquement ont été testés : le **Système A**, le **Système C** et l'**Alginate-Kétoprofène**. Ils seront présentés en détail par la suite.

Ces modifications de la structure chimique de l'alginate ont pour but de lui conférer de meilleures propriétés mécaniques, élasticité, stabilité et biocompatibilité. Les travaux effectués dans cette thèse ont pour objectif d'évaluer l'efficacité des alginates modifiés, ainsi que l'avantage de la microfluidique par rapport à l'encapsulation en goutte à goutte en termes de contrôle de taille et forme des capsules, dans le cadre d'une application en thérapie cellulaire pour le diabète de type 1. Pour cela, il est tout d'abord nécessaire de produire des capsules vides en microfluidique avec ces alginates modifiés chimiquement. Ces évaluations et comparaisons sont ensuite effectuées à travers l'encapsulation d'îlots de Langerhans, avec lesquels le but est d'optimiser les résultats en termes de viabilité *in vitro*, pour enfin aboutir à des tests *in vivo* sur souris.

Les différentes étapes de ces encapsulations sont réparties entre les partenaires du projet. L'équipe de recherche de l'EPFL (Suisse, Lausanne) effectue les réactions chimiques sur l'alginate Kelton permettant de greffer les différents dérivés de PEG (voir chapitre 4). Par la suite, ces alginates sont lyophilisés et envoyés au laboratoire du CEA de Grenoble. Des îlots de Langerhans de porc néo-natal sont isolés et purifiés par les Hôpitaux Universitaires de Genève, puis envoyés au CEA de Grenoble également. Les encapsulations en microfluidique sont effectuées au CEA de Grenoble, puis les îlots encapsulés sont caractérisés *in vitro* au CEA de Grenoble, puis à l'Université Grenoble Alpes. Enfin, un test *in vivo* a été effectué, en suivant le même procédé d'encapsulation (îlots de porc provenant de HUG, encapsulés avec les polymères synthétisés par l'EPFL et le système microfluidique développé par le CEA), et en greffant ces îlots encapsulés sur des souris fournies par les Hôpitaux Universitaires de Genève.

Ce projet est donc très collaboratif et multidisciplinaire, sa mise en place et son bon fonctionnement reposent sur le bon déroulement de nombreuses étapes, pouvant présenter des problèmes et limitations à différents niveaux.

2. Méthodologie suivie

Comme cela a été expliqué dans le chapitre Etat de l'Art, la microencapsulation de cellules peut se séparer en 3 étapes :

- La préparation du biopolymère, et le mélange de ce dernier avec les cellules
- La formation de gouttes avec le polymère contenant les îlots (ou bien sans îlots dans le cadre de formation de capsules vides)
- La transformation de ces gouttes en capsules, par gélification de l'alginate.

Une quatrième étape peut être définie comme la récupération des capsules et leur caractérisation.

Chaque étape présente des paramètres critiques à étudier et ajuster, ainsi que des paramètres pouvant avoir un impact sur la viabilité des îlots et le bon fonctionnement de l'encapsulation, et donc sur l'obtention d'îlots encapsulés viables et fonctionnels.

L'organisation du manuscrit suit donc principalement ces trois étapes. Le Chapitre 4 présente les différentes caractérisations nécessaires à une bonne préparation du polymère, et les résultats obtenus permettent de définir quels types d'alginate utiliser pour l'encapsulation de cellules. Ensuite dans le Chapitre 5, la formation de goutte en microfluidique a été étudiée et analysée, afin de réussir à produire des capsules dans les différents systèmes microfluidiques utilisés, avec les différents alginate. Enfin, le Chapitre 6 présente tout d'abord la caractérisation des capsules obtenues, ainsi que les résultats obtenus en encapsulation de cellules et d'îlots, les différentes optimisations effectuées, et les résultats d'un test in vivo.

2.1 Pré-encapsulation

Concernant la préparation du biopolymère et le mélange avec les îlots, les paramètres critiques et importants pour la formation de gouttes par la suite concernent principalement les propriétés physico-chimiques des biopolymères :

- La viscosité : elle a un impact sur la viabilité des cellules, autant en termes de contrainte visqueuse, qu'en termes de force de cisaillement appliquée pendant le mélange des cellules dans le polymère.
- La longueur des chaînes de l'alginate : elle a une influence sur la viscosité, et donc sur les paramètres cités au-dessus.
- La pureté de l'alginate : cela a également une influence sur la viabilité des cellules mélangées avec ce dernier.

Ces différentes propriétés doivent donc être caractérisées pour chaque polymère, afin de déterminer les paramètres à appliquer pour le bon fonctionnement de l'encapsulation et l'obtention d'îlots encapsulés viables et fonctionnels. Les méthodes utilisées sont présentées dans le chapitre Matériel et Méthodes.

2.2 Formation de gouttes

L'étape de formation de gouttes dépend de plusieurs paramètres, concernant à la fois les propriétés physico-chimiques des biopolymères, et le système microfluidique :

- Les propriétés rhéologiques (viscosité et élasticité) : elles ont un impact sur le temps de formation de goutte, et la taille, forme et monodispersité des gouttes obtenues ; ainsi que sur les forces de cisaillement appliquées pour former les gouttes, et peuvent donc impacter la viabilité des cellules contenues dans l'alginate.
- La tension interfaciale des polymères dans l'huile : elle a un impact sur la formation de gouttes, ainsi que sur le passage de l'interface eau-huile des polymères.
- Le caractère hydrophile-hydrophobe, caractérisé par l'angle de contact des polymères avec la surface des canaux : cela a un impact sur l'accroche des polymères dans les systèmes microfluidiques, et donc sur la manipulation des polymères et des gouttes.
- Le cisaillement appliqué par les flux de phase continue sur les biopolymères pendant la formation de gouttes : cela peut avoir un impact sur la viabilité des cellules encapsulées.

De la même manière, ces différents paramètres doivent être caractérisés afin de réussir au mieux l'encapsulation des îlots. Les méthodes et appareils utilisés pour les caractérisations sont présentés dans le chapitre Matériel et Méthodes.

2.3 Gélification des gouttes

La transformation des gouttes en capsules s'effectue par gélification ionique de l'alginate, en présence d'ions calcium Ca^{2+} en solution (en suivant le processus présenté dans le l'Etat de l'art partie). Ce processus peut être plus ou moins rapide en fonction de la composition et des propriétés physico-chimiques de l'alginate. La vitesse de gélification doit donc être caractérisée, afin de déterminer les paramètres à appliquer pour gélifier les différents alginates dans le système microfluidique. La méthode suivie afin de caractériser la vitesse de gélification des alginates, et son influence sur le système microfluidique sont présentées dans le Chapitre 5.

2.4 Post encapsulation : caractérisation des capsules

Enfin, une fois les gouttes gélifiées et les capsules formées, ces dernières présentent des propriétés physico-chimiques critiques pour une application de thérapie cellulaire (présentées plus en détails précédemment dans l'Etat de l'art) :

- La taille, la forme et la monodispersité : les capsules ne doivent pas être trop grandes pour bien oxygéner les îlots, et leur forme doit être le plus lisse et sphérique possible afin de ne pas provoquer de réponse immunitaire dans le cadre d'application in vivo.
- La perméabilité : les capsules formées doivent stopper les molécules du système immunitaire, tout en laissant passer l'oxygène, les nutriments et l'insuline.

Ces paramètres doivent donc également être caractérisés, et les différentes méthodes utilisées sont présentées dans le chapitre Matériel et Méthodes.

3. Contraintes de l'étude

Les principales limitations rencontrées dans cette thèse ont été la variabilité des lots de polymères reçus et la non disponibilité d'une quantité suffisante de chaque lot de biopolymère afin de pouvoir effectuer toutes les caractérisations présentées précédemment ; ainsi que la quantité limitée d'îlots humains pour les tests in vitro et in vivo.

En effet, comme nous le verrons au Chapitre 4, les processus réactionnels développés par l'EPFL pour la synthèse d'alginate chimiquement modifiés sont complexes : ainsi pour chaque synthèse d'un même type de polymère, chaque lot obtenu a des pourcentages de greffage et de pureté différents, et donc des propriétés physico-chimiques très différentes. Par conséquent, les caractérisations citées précédemment doivent être faites sur chaque lot différent (y compris pour un même polymère).

Afin de pouvoir effectuer toutes les caractérisations citées précédemment, la quantité de polymère nécessaire est d'environ 3mL. Or les conditions expérimentales des modifications chimiques de l'alginate permettent difficilement à l'EPFL de fournir les quantités suffisantes. En effet, à chaque synthèse, la masse maximale de polymère obtenue était d'environ 100 mg, ce qui permettait de préparer 2,4 mL de polymère.

Ces caractérisations ont donc été effectuées uniquement lorsque la quantité de polymère reçu était suffisante. Les caractérisations effectuées pour chaque lot sont résumées dans les Tableau 7, Tableau 8, et Tableau 9. Ces tableaux permettent de souligner les limites de l'étude, de par la variabilité des lots reçus, et les quantités limitées ne permettant pas d'avoir toutes les caractérisations pour un même lot.

Le but de cette thèse a donc été de caractériser les polymères dans un premier temps, lorsque cela était possible, afin de réussir à former des capsules. Ces capsules ont ensuite été caractérisées, afin de déterminer si leurs propriétés sont adaptées à une utilisation en encapsulation de cellules. Par la suite, des cellules et îlots ont été encapsulés, et leur viabilité a été mesurée et comparée, afin d'optimiser les différents paramètres cités précédemment lorsque cela était possible, et ainsi améliorer les résultats obtenus. Enfin, un test d'implantation d'îlots encapsulés in vivo a été effectué. Ces expériences ont été possibles grâce à la collaboration des différentes équipes partenaires de la thèse, et la mise en commun d'expertises très pluridisciplinaires.

Système A

LOT	VISCOSITE	RHEOLOGIE	TENSION DE SURFACE	ANGLE DE CONTACT	CISAILLEMENT	PERMEABILITE	TAILLE ET FORME	VIABILITE
FTR-159-3%	Oui	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non
LS1-058-4%	Non	Non	Oui	Oui	Non	Oui	Non	Non
LS1-125-4%	Oui	Non	Oui	Oui	Non	Oui	Non	Non
LS4/026 4%	Non	Non	Non	Non	Oui	Non	Non	Oui
LS3/003 - 4%	Oui	Non	Oui	Oui	Non	Oui	Oui	Oui
LS2/060 - 4%	Non	Non	Non	Non	Non	Oui	Oui	Oui
LS2/095-4%	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Oui	Oui
LS3/043 - 4%	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Oui
LS3/133 - 4%	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Oui
LS2/036 - 4%	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Oui	Oui

Tableau 7 : Bilan des caractérisations effectuées sur les lots de polymère Système A

Systeme C

LOT	VISCOSITE	RHEOLOGIE	TENSION DE SURFACE	ANGLE DE CONTACT	CISAILLEMENT	PERMEABILITE	TAILLE ET FORME	VIABILITE
LS3/039 + 040 - 4%	Oui	Non	Oui	Oui	Non	Non	Non	Non
LS4/027 + 28 4%	Non	Non	Non	Non	Oui	Non	Non	Oui
LS3/019 + 045 + FN3/62 + LS3/082 + 023 1, 2, 3 ET 4%	Non	Oui	Non	Non	Non	Non	Non	Non
LS3/022 + 023	Non	Non	Non	Non	Non	Oui	Non	Oui
LS2/039 + 53	Non	Non	Non	Non	Non	Oui	Non	Non
LS3019 + 044 + 045 + FN3-62 - 4%	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Oui
LS3/044 + 134 - 4%	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Oui
LS2/026 + 039 + 053 4%	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Oui	Oui

Tableau 8 : Bilan des caractérisations effectuées sur les lots de polymère Systeme C

Alginate-Kétoprofène

LOT	VISCOSITE	RHEOLOGIE	TENSION DE SURFACE	ANGLE DE CONTACT	CISAILLEMENT	PERMEABILITE	TAILLE ET FORME	VIABILITE
FN3-069 - 4%	Oui	Non	Oui	Oui	Non	Oui	Oui	Oui
LS4-025 4%	Non	Non	Non	Non	Oui	Non	Non	Oui
LS3/077 + 092 + 114 1, 2, 3 ET 4%	Non	Oui	Non	Non	Non	Non	Non	Oui
LS3/132 - 4%	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Oui
LS3/076 + 077 - 4%	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Oui	Oui
LS3/080-4%	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Oui	Oui

Tableau 9 : Bilan des caractérisations effectuées sur les lots de polymère Alginate-Kétoprofène

Chapitre 3 : Matériel et Méthodes

Table des matières

1. Banc expérimental et fabrication microfluidique	82
1.1. Géométrie utilisée.....	82
1.2. Fabrication des cartes microfluidique.....	83
1.2.1. Choix du matériau.....	83
1.2.2. Conception et usinage	83
1.2.3. Traitement de surface	84
1.3. Banc expérimental.....	84
1.4. Caractérisation des écoulements : microPIV.....	888
2. Solutions utilisées	90
2.1. Phases dispersées	90
2.2. Phases continues	91
2.3. Bain de Calcium et Sérum Physiologique	92
3. Caractérisations physico-chimiques des solutions	93
3.1. Rhéologie.....	93
3.2. Tension interfaciale.....	94
3.3. Angle de contact	95
3.4. Cinétique de gélification.....	95
4. Caractérisation des capsules	96
4.1. Taille et forme des capsules.....	96
4.2. Perméabilité.....	97
5. Encapsulation de cellules et d'îlots	988
5.1. Solutions utilisées.....	999
5.2. Comptage et caractérisation des îlots/cellules	999
5.3. Préparation des îlots et des alginates	100
5.4. Mesures de viabilité	101
5.5. Récolte des capsules et conservation.....	103
5.6. Implantation in vivo.....	104

Ce Chapitre décrit les équipements ainsi que les méthodes expérimentales utilisées au cours de cette thèse, afin de réussir à produire des capsules en microfluidique avec les différents alginates étudiés, et à encapsuler des îlots.

1. Banc expérimental et fabrication microfluidique

1.1. Géométrie utilisée

Les systèmes microfluidiques utilisés dans cette thèse ont pour la plupart été développés au sein du laboratoire avant le déroulement de la thèse. 3 principaux types de système ont été utilisés, décrits par la suite : le système automatisé GEL200, et les systèmes simplifiés MFFD200 et MFFD550. Chacun de ces systèmes possède, dans une carte microfluidique, au moins les deux modules suivants :

- **un module de formation de goutte en MFFD** (inspiré du dispositif développé par Tan *et al.*²⁹³, présenté dans l'Etat de l'art). Dans ce module, la phase dispersée (alginate) est contenue dans le canal central, et une phase continue, non miscible avec la phase dispersée (dans notre cas, de l'huile de soja), s'écoule dans deux canaux perpendiculaires. Au niveau de la jonction entre les deux phases, la phase continue cisaille la phase dispersée, produisant ainsi des gouttes. Cette jonction est suivie d'une chambre triangulaire, permettant de focaliser la rupture des gouttes au niveau de la jonction²⁹³ (Figure 30 A).
- **un module de pré-gélification** des gouttes (inspiré du dispositif de Zhang *et al.*²⁹⁴, présenté dans l'Etat de l'art également). Dans ce module, deux canaux périphériques sont positionnés de part et d'autre du canal central contenant la phase continue et les gouttes de phase dispersée (voir Figure 30 B). Ces canaux permettent d'apporter en co-écoulement une huile contenant un agent gélifiant (ou huile pré-gélifiante). Cet agent gélifiant diffuse vers les gouttes de polymère, et commence ainsi à les gélifier, avant que celles-ci ne soient transférées en solution aqueuse gélifiante. Cette pré-gélification permet aux capsules de ne pas être déformées, et maintenir leur forme sphérique lors du passage de l'interface huile-eau pour leur transfert en solution aqueuse gélifiante.

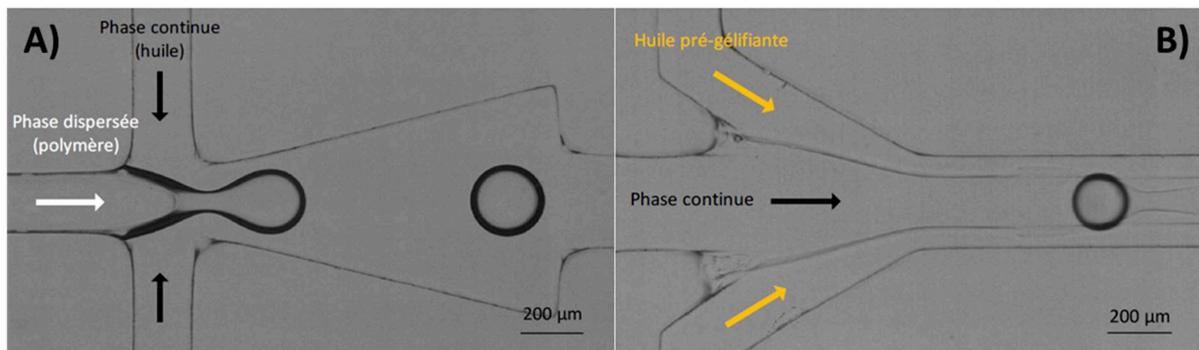


Figure 30 : Formation et pré-gélification de gouttes en microfluidique : A) module de formation de goutte en MFFD, inspiré de Tan *et al.*²⁹³ ; B) Module de Pré-gélification de goutte inspiré de Zhang *et al.*²⁹⁴

1.2. Fabrication des cartes microfluidiques

1.2.1. Choix du matériau

Le laboratoire du CEA dans lequel a été effectuée cette thèse s'est spécialisé dans la conception de cartes en matériaux thermoplastiques comme le COC (Cyclic Olefin Copolymer), le COP (Cyclic Olefin Polymer), ou le PMMA (Poly(Méthylméthacrylate)). Ces matériaux sont avantageux en termes de coûts, de compatibilité biologique, et d'industrialisation.

Les cartes microfluidiques utilisées dans cette thèse sont conçues en COC. Contrairement au PDMS souvent utilisé en microfluidique, ce matériau est quasiment imperméable aux gaz et possède des propriétés optiques intéressantes : il est transparent à la lumière pour des longueurs d'ondes supérieures à 400 nm, et est faiblement auto-fluorescent. De plus, il est compatible avec la stérilisation aux rayons gamma ou à l'autoclave, permettant ainsi de l'utiliser pour des applications médicales. Le COC est d'ailleurs approuvé par la FDA et est souvent utilisé dans le domaine des dispositifs médicaux.

Le COC est disponible sous formes de granules destinés à l'injection, mais notre laboratoire s'approvisionne directement auprès de l'entreprise TOPAS afin d'obtenir des plaques déjà formées. Plusieurs types de COC existent, possédant des températures de transition vitreuse différentes : TOPAS-8007 ($T_v=78^\circ\text{C}$) ; TOPAS-5013 ($T_v=134^\circ\text{C}$) ; TOPAS-6015 ($T_v=160^\circ\text{C}$), et TOPAS-6017 ($T_v=130^\circ\text{C}$). Comme la technique d'usinage provoque un échauffement local du matériau, le type de COC utilisé doit suffisamment résister à la température. Le COC préférentiellement utilisé au sein du laboratoire est le grade 5013.

1.2.2. Conception et usinage

Les cartes microfluidiques sont au format carte de crédit (85,6 mm x 54 mm), d'épaisseur allant de 1 à 2 mm. Les canaux microfluidiques sont fabriqués par usinage de bloc de COC. La technique d'usinage consiste à enlever de la matière au sein du bloc par fraisage. Les copeaux de matière sont ensuite évacués et la carte microfluidique est refermée par collage thermoplastique d'un second bloc de COC. Des puits d'entrée ou sortie sont creusés avant le collage au niveau des extrémités des canaux microfluidiques, afin de réaliser la connectique fluide entre les tubes d'injection/récupération des liquides et la carte.

L'architecture des cartes est dessinée en 3 dimensions à l'aide du logiciel de conception assistée par ordinateur (CAO) Solidworks. L'usinage est réalisé sur l'équipement Datron-M7HP (Figure 31), et est piloté par le logiciel CAO. Cet équipement permet d'usiner les cartes microfluidiques dans des conditions optimales car l'usinage s'effectue à l'éthanol plutôt qu'à l'huile de coupe, ce qui évite la contamination des échantillons. Suite à l'usinage, les canaux sont refermés grâce à un scellement thermique entre le bloc usiné et un bloc de COC plein. Pour cela, les deux blocs sont placés dans une presse à 127°C , température de déformation sous charge (DTUL) du COC, pendant 80 minutes.



Figure 31 : Equipement d'usinage Datron-M7HP

1.2.3. Traitement de surface

Lors de la formation de gouttes en microfluidique, la mouillabilité des parois des canaux est un paramètre influençant le détachement et l'accroche des gouttes. Afin d'avoir un bon détachement, et de former des gouttes monodisperses, la phase dispersée ne doit pas mouiller les parois. Dans notre cas, la phase dispersée étant aqueuse, les parois doivent donc être le plus hydrophobes possible. La mouillabilité adaptée peut être obtenue soit par utilisation de tensioactifs, soit par fonctionnalisation de surface. L'utilisation de tensioactifs peut avoir un impact négatif sur la viabilité des cellules. Par conséquent, dans le cadre d'encapsulation de cellules, il est préférable d'utiliser une fonctionnalisation de surface.

Le traitement de surface utilisé dans le cadre de cette thèse est une silanisation : il consiste en un dépôt d'une fine couche d'un silane (le FDTS, perFluoroDecylTrichloroSilane) (AB111155, ABCR) sur les parois des canaux. Ce dépôt est effectué en phase vapeur (Molecular Vapor Déposition), à pression constante. Cette technique permet de rendre les canaux très hydrophobes, et résiste aux solvants tels que l'éthanol.

1.3. Banc expérimental

Les deux modules présentés précédemment (partie 1.1) sont associés dans des cartes microfluidiques de différentes dimensions, donnant lieu à différents systèmes :

- Le **Système microfluidique simplifié MFFD200** : il est constitué d'une carte plastique en COC contenant les deux modules présentés précédemment (formation de goutte et pré-gélification), aux dimensions décrites en Figure 32. Suite à ces deux modules, le canal amène directement à une sortie de la carte microfluidique. Le montage utilisé pour ce système est présenté en Figure 33 : les fluides sont déplacés à l'aide de contrôleurs en pression, commercialisés par la société Fluigent (MFCS™-EZ, 4 voies, 0-1 bar), pouvant délivrer entre 0 et 1 bar. La pression appliquée sur les réservoirs contenant les fluides (bouteille, falcon ou eppendorf) permet de déplacer ces derniers et de les injecter dans la carte microfluidique, où les gouttes sont formées et pré-gélifiées. Ces gouttes sont ensuite récupérées dans un falcon en sortie de carte, contenant 5 mL de solution aqueuse

gélifiante. Dans ce falcon s'accumule donc la phase continue huileuse au-dessus de la phase aqueuse gélifiante. Les capsules doivent tout d'abord passer l'interface huile-eau afin d'être transférées en solution aqueuse gélifiante et ainsi terminer leur gélification, puis être transférées manuellement en sérum physiologique ou milieu de culture.

- Le **Système microfluidique simplifié MFFD550** : il s'agit du même système que le MFFD200, mais dans lequel les canaux du MFFD ont une dimension de 550 μm au lieu de 200 μm . Les rapports des dimensions sont les mêmes que ceux utilisés en Figure 32. Le montage utilisé pour ce système est également le même que celui utilisé pour le système MFFD200, présenté en Figure 33.

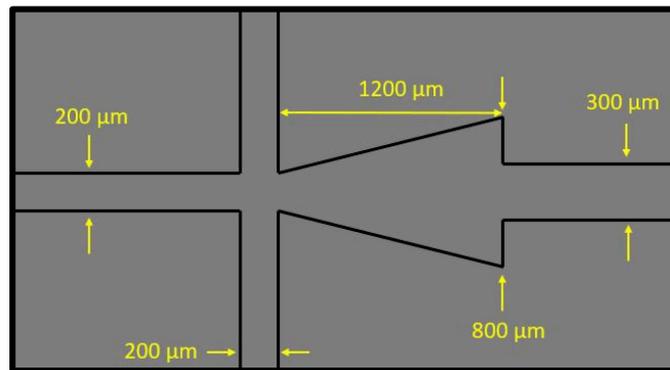


Figure 32 : Dimensions des canaux du système microfluidique simplifié MFFD200

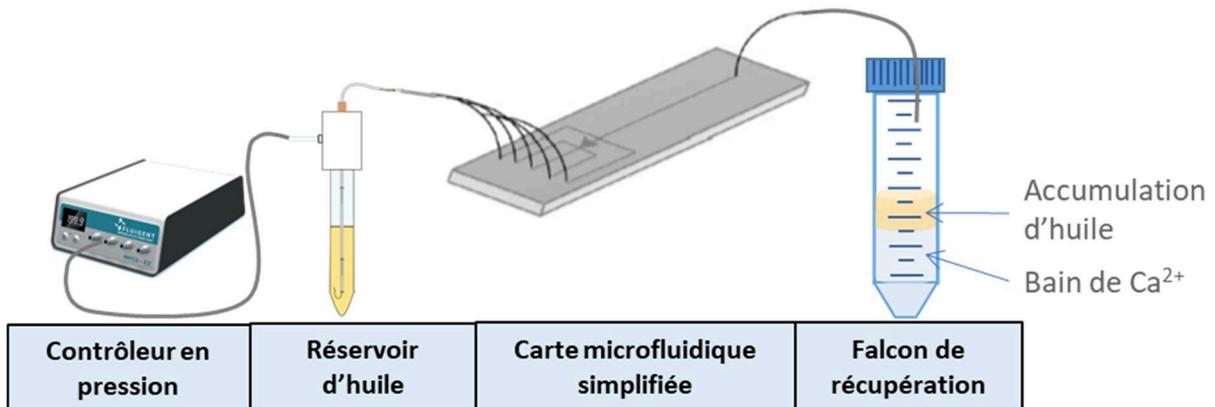


Figure 33 : Schéma du montage des systèmes microfluidiques simplifiés : les fluides sont mis en mouvement par un contrôleur en pression, les réservoirs d'huile sont identiques pour la phase continue et l'huile pré-gélifiante, et l'alginate est contenu dans un eppendorf ; les capsules sont récupérées en sortie de carte dans une phase aqueuse gélifiante

- Le **Système microfluidique automatisé GEL200** : il s'agit d'une carte en COC sur laquelle est fixée une puce en silicium (voir Figure 34 A). Cette puce contient les deux modules présentés précédemment (formation de goutte et pré-gélification), aux dimensions décrites en Figure 32, auxquels sont ajoutés deux modules de transfert de phase (voir Figure 34 B). Ces deux modules permettent de transférer chaque goutte tout d'abord depuis la phase continue huileuse vers une phase aqueuse contenant le calcium, terminant la gélification, puis de transférer chaque capsule gélifiée dans une autre solution aqueuse de sérum physiologique, ou de milieu de culture (Figure 34 B). Les canaux de pré-gélification et gélification sont contenus dans la carte en COC. Le montage utilisé pour ce système est proche de celui utilisé pour les systèmes simplifiés, mais ici, les capsules en sortie de carte sont directement en sérum physiologique ou milieu de culture (Figure 35).

Dans ces différents systèmes microfluidiques, les connexions fluidiques sont effectuées via un système développé au sein du laboratoire : le système Flowpad, qui permet d'assurer des connexions multiples.

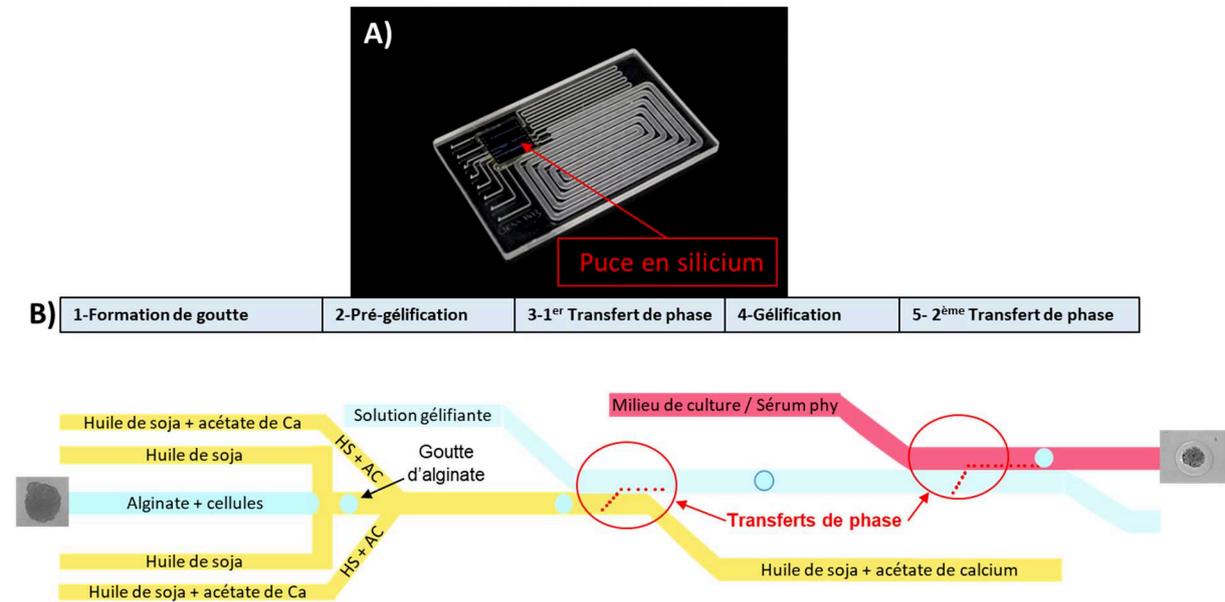


Figure 34 : Système microfluidique automatisé : A) Carte microfluidique en COC contenant le système de formation et gélification de gouttes ; B) Schéma du système présente à l'intérieur de la carte pour former et gélifier les gouttes, où HS est l'Huile de Soja, AC l'Acétate de Calcium, et Sérum Phy le Sérum Physiologique

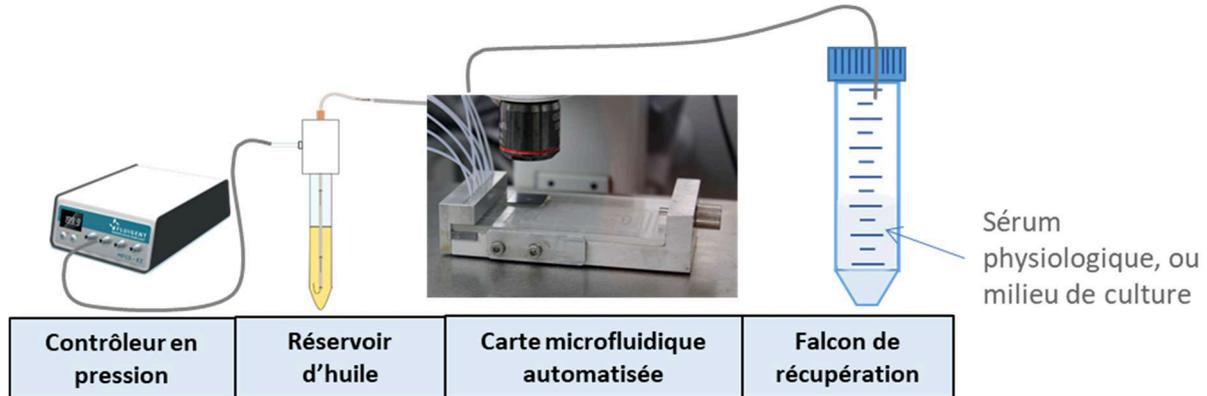


Figure 35 : Schéma du montage du système microfluidique automatisé GEL200 : les fluides sont mis en mouvement par un contrôleur en pression ; les réservoirs d'huile sont identiques pour la phase continue et l'huile pré-gélifiante, et l'alginate est contenu dans un eppendorf ; les capsules sont récupérées en sortie de carte directement en sérum physiologique ou milieu de culture

Les systèmes microfluidiques simplifiés présentent l'avantage d'une mise en place simple et rapide. Cependant, les capsules doivent être transférées manuellement depuis la solution gélifiante vers une solution de Sérum Physiologique ou milieu de culture. Par conséquent, selon la durée au bout de laquelle le transfert est effectué, les capsules présentent une disparité plus ou moins importante au niveau du temps de gélification et donc des propriétés mécaniques. En effet, si l'utilisateur récupère les capsules pendant 15 minutes (par exemple) dans le falton de sortie, avant de les transférer en solution aqueuse non gélifiante (comme du sérum physiologique), la première capsule formée aura été gélifiée 15 minutes alors que la dernière capsule formée seulement moins d'une minute. Afin d'avoir des capsules le plus reproductibles possible, il est

donc décidé dans cette thèse de transférer les capsules toutes les 5 minutes. Ainsi, tout au long des résultats présentés dans ce manuscrit, lorsque ce système est utilisé, les capsules sont transférées toutes les 5 minutes.

Pour effectuer le transfert, le falcon de récupération (contenant la phase continue d'huile de soja portant les capsules, et la phase aqueuse gélifiante en-dessous) est légèrement secoué afin de s'assurer que toutes les capsules passent bien l'interface huile-eau et soient transférées en phase aqueuse. La phase continue contenant l'huile de soja et l'huile-prégélifiante est ensuite retirée à l'aide d'une pipette de 10 mL. La majorité de la phase aqueuse de solution gélifiante est également retirée, en laissant environ 500 μ L-1 mL, de manière à pouvoir prélever les capsules. Ce reste de solution aqueuse contenant les capsules est ainsi prélevé à l'aide d'une pipette et transféré dans un falcon de 50 mL contenant 15 mL de sérum physiologique. Lorsque des cellules sont encapsulées, les capsules en sérum physiologique sont ensuite transférées en milieu de culture (voir partie 5.5).

Le système microfluidique automatisé quant à lui, présente l'avantage de produire des capsules qui sont toutes gélifiées exactement la même durée, et ont donc exactement les mêmes propriétés mécaniques. De plus, comme son nom l'indique, il permet d'avoir une formation de capsules complètement automatisée, en injectant les solutions utilisées en entrée de carte, et en récupérant en sortie directement les îlots encapsulés (Figure 34 B). Cependant, son utilisation est plus complexe, et il est donc nécessaire de connaître suffisamment les propriétés du polymère et les paramètres à utiliser. En effet, si les capsules ne sont pas assez gélifiées, ou si la fréquence de production est trop élevée, elles peuvent s'accrocher aux piliers des transferts de phase, ou bien coalescer dans les canaux, et créer des bouchons.

Dans le cadre de cette thèse, les 3 types de systèmes ont été utilisés pour former des capsules vides. Concernant l'encapsulation de cellules, toutes les expériences ont été faites en Système microfluidique simplifié MFFD550. Le montage obtenu est présenté en Figure 36.

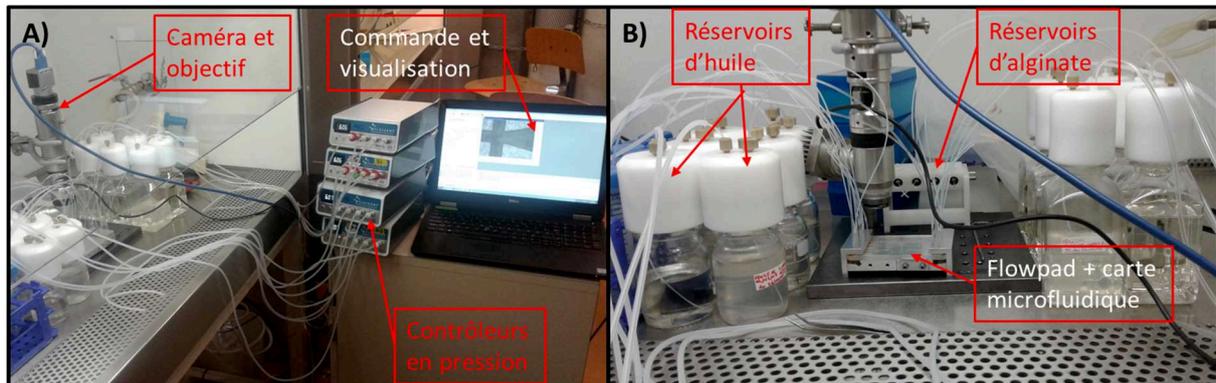


Figure 36 : Photos du montage utilisé pour l'encapsulation de cellules

Enfin, concernant la visualisation des expériences, 3 types de systèmes ont été utilisés :

- Pour les expériences en cartes GEL200 : microscope Olympus PROVIS AX70 muni d'un adaptateur Olympus U-CMAD-2, et d'objectifs x5 et x10, d'une lampe et d'une caméra ultra-rapide (permettant d'enregistrer jusqu'à 2 000 images/s).

- Pour les caractérisations des flux en micro-Particle Image Velocimetry (partie 1.4) : même montage que pour cartes GEL200, mais avec une caméra ultra-rapide Photron Fastcam SA 1.1.
- Pour les expériences en système microfluidique simplifié : tube optique (Navitar 1-60191) muni d'un système d'éclairage LED 1-62350 et d'une caméra (Basler acA640).
- Pour les mesures de viabilité : microscope inversé (Olympus IX50) muni d'objectifs x5, d'une lampe, et d'une caméra (Point Grey Research CMLN-13s2c).

Lors de la formation des gouttes, la visualisation du MFFD à l'aide des caméras a permis de déterminer la fréquence de production en temps réel, en comptant le nombre de gouttes produites à la minute. Cette fréquence a ainsi pu être optimisée en modifiant les pressions appliquées sur les fluides.

1.4. Caractérisation des écoulements : microPIV

Des expériences de micro-vélocimétrie par image de particules (micro-Particle Image Velocimetry ou micro-PIV) ont été effectuées, dans le but de déterminer les champs de vitesse des phases dispersée et continue lors de la formation de goutte, afin d'en déduire le taux de cisaillement. Cette technique est basée sur la technique de PIV, qui consiste à suivre le déplacement de particules fluorescentes introduites dans la solution étudiée, sur une durée précise. Pour cela, l'écoulement est éclairé par une nappe laser, et les particules fluorescentes sont imagées à haute fréquence. Les images, acquises dans un même plan de l'écoulement, sont ensuite analysées grâce à un algorithme d'intercorrélation, qui permet de déterminer le déplacement de groupes de traceurs fluorescents entre deux images consécutives. Connaissant le déplacement et le temps entre les deux images, un logiciel reconstruit alors le champ de vitesse dans le plan.

La micro-PIV utilise le même principe que la PIV, mais l'écoulement est mesuré sous un microscope. Ce dernier est entièrement éclairé, et le plan de mesure est le plan focal de l'objectif. La concentration en traceur ne doit pas être trop élevée pour ne pas bruyter les images. La faible quantité de traceurs est compensée par une acquisition d'un nombre important de paires d'images. Le calcul de corrélation est donc fait sur des centaines d'images, au lieu de seulement 2 images.

Les particules de traçage doivent suivre différents critères : elles doivent être suffisamment petites pour suivre le mouvement du fluide et ne pas le perturber, mais suffisamment grande pour que la quantité de lumière émise puisse être détectée. Il est estimé que le diamètre des particules de traçage doit être plus petit d'au moins 10 fois la dimension des canaux microfluidiques. Dans le cadre de cette thèse, les particules de traçage choisies sont des microbilles fluorescentes ($\lambda_{\text{ex}}=468 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=508 \text{ nm}$) de 3 μm de diamètre (G0300, Duke Scientific).

Pour les alginates, 5 μL de solution mère de billes (à $6,7 \cdot 10^8$ billes/mL) sont filtrés puis repris dans 150 μL d'alginate buffer pour l'alginate de référence, et 80 μL d'alginate buffer pour les alginates PEGylés. 250 μL et 320 μL d'alginates de référence et PEGylés respectivement, sont ensuite ajoutés, et le tout est mélangé à la pipette. On obtient ainsi des alginates à 2,5% massique pour l'alginate de référence, et 4% massique pour les alginates PEGylés (concentrations utilisées dans les autres expériences, voir partie 2.1). Pour l'huile de soja, 400 μL de solution mère de bille (qui est en phase aqueuse) sont filtrés puis rincés deux fois avec 400 μL de méthanol. Les billes filtrées sont ensuite incorporées dans 20 mL d'huile de soja. La solution est vortexée puis placée dans un bain à ultrasons chauffé à 30°C pendant 10 minutes afin de bien disperser les billes.

Ces expériences ont été réalisées avec le système microfluidique simplifié MFFD550 (car c'est celui qui est utilisé pour les encapsulations de cellules), et sous un microscope Olympus PROVIS AX70 muni d'objectifs x5 et x10, d'une lampe, ainsi que d'un cube FITC (Ex 472/30, Em 520/35, DM 498). L'acquisition des images est effectuée à l'aide d'une caméra ultra-rapide Photron Fastcam SA 1.1, à des fréquences d'acquisition de 1 000 ou 2 000 images/sec, pour un temps d'acquisition de 0,3 secondes à 5 secondes. Une lampe à mercure (France-Lampes, HBO 103 w/2 OSRAM) combinée à un filtre FITC permet d'exciter les billes fluorescentes (Figure 37).

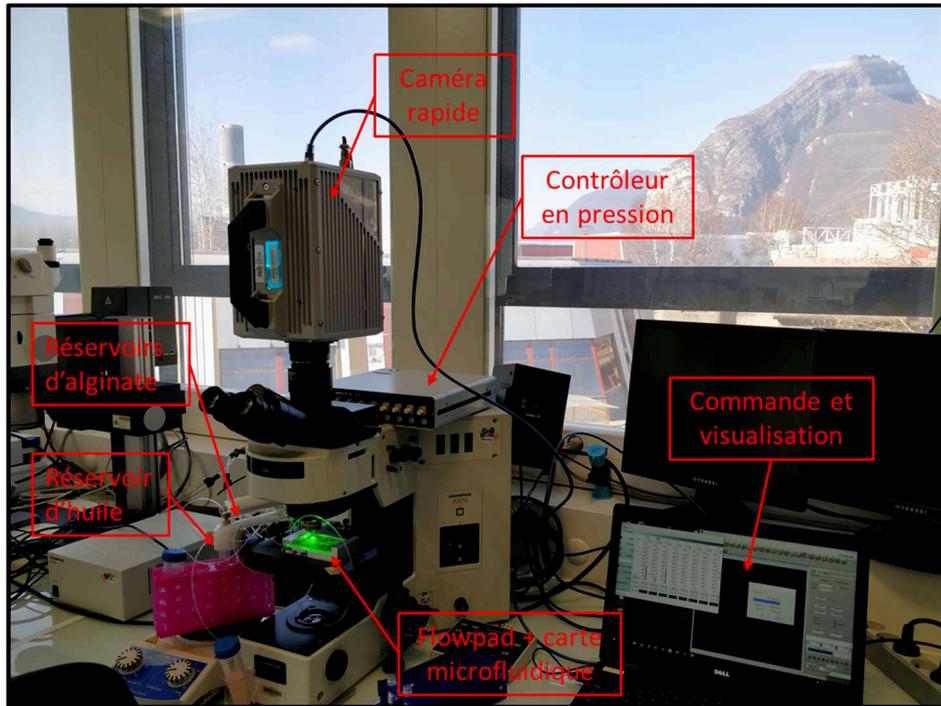


Figure 37 : Banc expérimental des expériences de caractérisation du flux par micro-PIV

Ainsi, pour chaque polymère étudié, une formation de goutte d'alginate contenant les billes fluorescentes, cisailée par l'huile de soja contenant les billes fluorescentes, est filmée (répété 3 fois pour chaque polymère). Les gouttes sont formées sur une gamme de pression en huile de soja allant de 100 mbar à 400 mbar. L'enregistrement des formations de gouttes s'effectue à l'aide du système optique décrit précédemment, à des fréquences de 1000 ou 2000 images/sec. Les analyses de micro-PIV sont ensuite effectuées sur les images obtenues, par groupes de 200 ou 400 images (pour une fréquence d'enregistrement de 1000 ou 2000 fps respectivement), grâce à un programme MATLAB d'intercorrélation (développé par S. Wereley, utilisé avec permission). Ce programme permet d'obtenir les champs de vitesse (Figure 38 A), qui sont traités avec le logiciel CleanVec (développé par S.M. Soloff et C.D. Meinhart, en libre accès), ainsi que les champs de cisaillement à partir de ces champs de vitesse (Figure 38 B).

Enfin, pour l'analyse des champs de cisaillement, il faut noter que le taux de cisaillement étant calculé grâce à la différence de vitesse entre deux points du champ de vitesse, il en résulte que pour les contours de la goutte, les champs de vitesse entraînent artificiellement une valeur de taux de cisaillement très élevée. Ces contours de l'image de cisaillement ne sont donc pas à considérer, et les valeurs de taux de cisaillement à l'intérieur de l'alginate sont prises juste en-dessous de ces valeurs surévaluées.

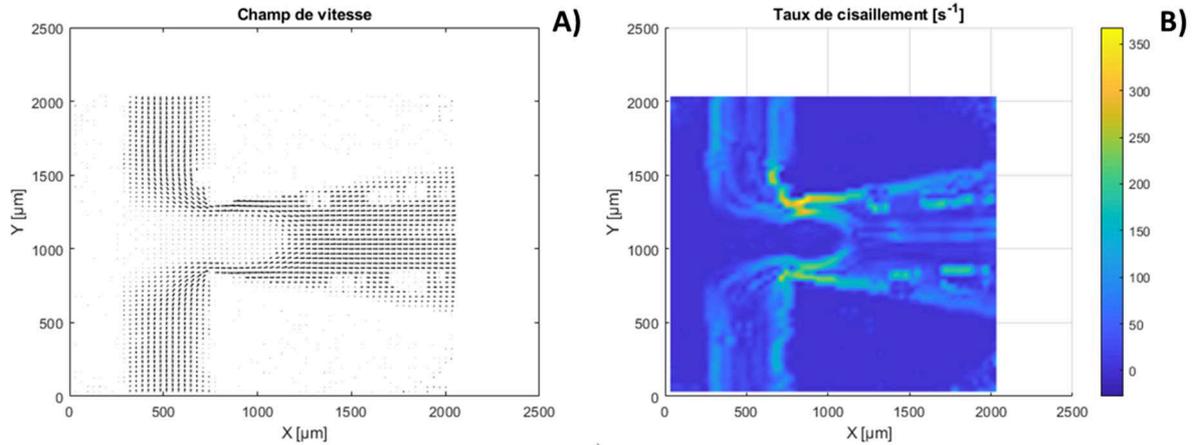


Figure 38 : Exemple de résultats obtenus pour les caractérisations de micro-PIV : A) Champ de vitesse ; B) Taux de cisaillement

2. Solutions utilisées

2.1. Phases dispersées

Dans le cadre de cette thèse, différents alginates ont été utilisés pour former des capsules puis encapsuler des cellules et des îlots : des alginates modifiés chimiquement par une équipe de l'École Polytechnique Fédérale de Lausanne (Suisse), partenaire de la thèse ; et des alginates de référence ultra-purs Pronova™ SLG100, SLM100, et UP LVM, commercialisés par NovaMatrix,

Les alginates modifiés chimiquement sont synthétisés en deux étapes : tout d'abord, des dérivés de Poly Ethylène Glycol (PEG) sont synthétisés : il s'agit de PEG sur lequel différents groupements chimiques sont greffés : des groupements thiol (SH), ou acrylate, ou kétoprofène. Ces dérivés de PEG sont ensuite greffés sur un alginate de départ : l'alginate Kelton HV (lot n° 61650A, $\eta=813 \text{ mL.g}^{-1}$ dans 0,1 M NaCl, $T=25^\circ\text{C}$, $G/M=0,67$), commercialisé par Kelco (San Diego, USA, CA). On obtient ainsi trois types d'alginates modifiés chimiquement ayant été utilisés dans cette thèse :

- Le Système A : Alginate sur lequel est greffé le dérivé PEG-SH.
- Le Système C : mélange de 2 alginates : le premier sur lequel est greffé le dérivé PEG-SH, et le deuxième sur lequel est greffé le dérivé PEG-acrylate.
- L'alginate-kétoprofène : Alginate sur lequel est greffé le dérivé PEG-Kétoprofène.

Les étapes de synthèse permettant d'obtenir ces alginates PEGylés sont décrites plus en détails dans le Chapitre 4, et également dans les articles publiés par l'EPFL.³⁰⁵⁻³⁰⁸ Une fois synthétisés, ces alginates sont lyophilisés par l'EPFL, et envoyés aux laboratoires du CEA. Une fois reçus sous forme lyophilisée, ces alginates sont tout d'abord exposés aux UV pendant 30 minutes afin de les stériliser (dans le cadre d'encapsulation de cellules ou îlots), puis sont solubilisés dans une solution aqueuse d'alginate buffer, composée de MOPS (Sigma-Aldrich, M1254) à 10 mM et de NaCl (Sigma-Aldrich, S9625) à 0,4 % massique. Les composés utilisés dans cette solution n'étant pas stérile, elle est donc préparée dans un laboratoire normal (salle grise), puis son pH est ajusté à 7,4, et la solution est filtrée (à l'aide de filtres 0,22 μm, Millipore, Millex®-GV Hydrophilic PDVF) et autoclavée (à 120°C), afin de s'assurer de la stérilité.

Ces alginates sont utilisés à différentes concentrations au cours de la thèse : de 1 à 4 % massique dans le chapitre 4 pour leur caractérisation, puis à 4 % massique pour les encapsulations de cellules et îlots. Ils sont donc solubilisés à 4 % massique en premier lieu, puis dilués si besoin. L'étape de solubilisation est assez complexe, car les polymères obtenus peuvent être très visqueux, et il est difficile de s'assurer de leur homogénéité. Dans un premier temps, les alginates ont été solubilisés à l'aide d'un agitateur vortex versatile Vortexer (commercialisé par Dutscher), à 3000 rpm, pendant 1 à 2 heures, puis les bulles d'air étaient évacuées à l'aide d'un bain à ultrasons. Cette méthode n'était cependant pas suffisante lorsque les alginates étaient très visqueux. Par la suite, les alginates ont donc été solubilisés à l'aide de pipettes Microman E M100E (commercialisées par Gilson). Ces pipettes sont munies de cônes à piston (Capillary pistons CP100, commercialisés par Gilson également), qui permettent de prélever tout type de fluide, même extrêmement visqueux. Ainsi, les agglomérats d'alginate mal solubilisés parviennent à être dispersés et solubilisés à l'aide de ces pipettes. Les bulles d'air (si des bulles d'air ont été introduites) sont ensuite évacuées par centrifugation, à 400 g. Sur les premières expériences effectuées dans cette thèse, les alginates devaient également être filtrés une fois solubilisés (avec un filtre Pall, Acrodisc Syringe Filter Supor Membrane, 0.2µm, PN4602). Cependant, cette étape de filtration était très compliquée de par la viscosité des alginates (d'autant plus qu'ils sont utilisés à 4 % dans cette thèse, alors que les équipes de l'EPFL les utilisent à une concentration maximale de 3 %), et un volume non négligeable de polymère était perdu. Par la suite, les équipes de l'EPFL ont donc optimisé leurs protocoles afin de filtrer le polymère avant lyophilisation, afin de nous permettre de l'utiliser directement après solubilisation.

Concernant l'alginate de référence SLG100 (ou SLM100), il est reçu sous forme solide, en bouteille de 250mg, et solubilisé à l'aide d'une solution aqueuse stérile de NaCl (Merck, EMPROVE®, 1-06400) à 150mM, et de HEPES (Merck, 1-37075) à 10mM, dont le pH est ajusté à 7,4 au préalable, à l'aide d'un pHmètre VWR pHenomenal™. Cette solution est préparée en conditions stérile, sous un PSM, avec des composés stériles, et ne nécessite donc pas d'être autoclavée. Cet alginate est utilisé à différentes concentrations au cours de la thèse également : de 1 à 4 % massique dans le chapitre 4 pour les caractérisations (comme pour les alginates PEGylés), puis à 2,5 % massique pour les encapsulations de cellules et îlots. Il est donc solubilisé à 4 % massique en premier lieu, puis dilué si besoin. Afin d'optimiser la solubilisation et d'obtenir un polymère homogène, il est laissé à agiter 12h à l'aide d'un barreau aimanté.

2.2. Phases continues

Les phases continues sont constituées d'huile de soja (Super refined Soybean oil, USP EP LQ (MH), Croda), notée HS, et d'huile pré-gélifiante, notée HS+AC. Cette huile pré-gélifiante est de l'huile de soja contenant des cristaux d'acétate de calcium (Calcium Acetate, Sigma Aldrich, PHR1362), à 2% massique. Elle est préparée par broyage colloïdal, afin d'obtenir des cristaux d'acétate de calcium les plus petits possibles (et ainsi moins impacter la surface des capsules), à l'aide d'un broyeur planétaire à billes (RETSCH, PM200), et du protocole suivant :

- 30 g de poudre d'acétate de calcium sont séchés une nuit dans une étuve à 100°C (les expériences ont montré que cette étape de séchage améliore l'efficacité du broyage).
- La poudre séchée est mélangée avec 60 g d'huile de soja, afin d'obtenir une concentration massique de 33% en acétate de calcium.
- Le mélange huile - acétate de calcium est placé dans un bol de broyage de 50 mL en alumine (RETSCH 01-462-0153), contenant des billes de zirconium de 2 mm (Verder

Scientific, 05.368.0089) (voir Figure 39(1) : bol contenant les billes de zirconium ; Figure 39(2) : ajout du mélange huile de soja-acétate de calcium dans le bol).

- Le bol est refermé et placé à l'étuve à 60°C une nuit entière afin de réduire la viscosité de la solution et améliorer l'efficacité du broyage.
- Le broyage est réalisé durant 2 heures, alternant des cycles de broyage de 5 minutes à 500 rpm et des cycles de repos de 1 minute (Figure 39(3))
- La solution d'huile+acétate de calcium et les billes de zirconium sont transférés dans un contenant en plastique et de l'huile de soja pure est ajoutée afin d'obtenir une concentration en acétate de calcium à 9% (Figure 39 (4), (5) et (6))
- L'ensemble est ensuite filtré pour récupérer les billes de zirconium (Figure 39 (7)).
- L'huile pré-gélifiante est stockée à la concentration de 9% (Figure 39(8)), et la solution est diluée avant chaque expérience à la concentration de 2%.

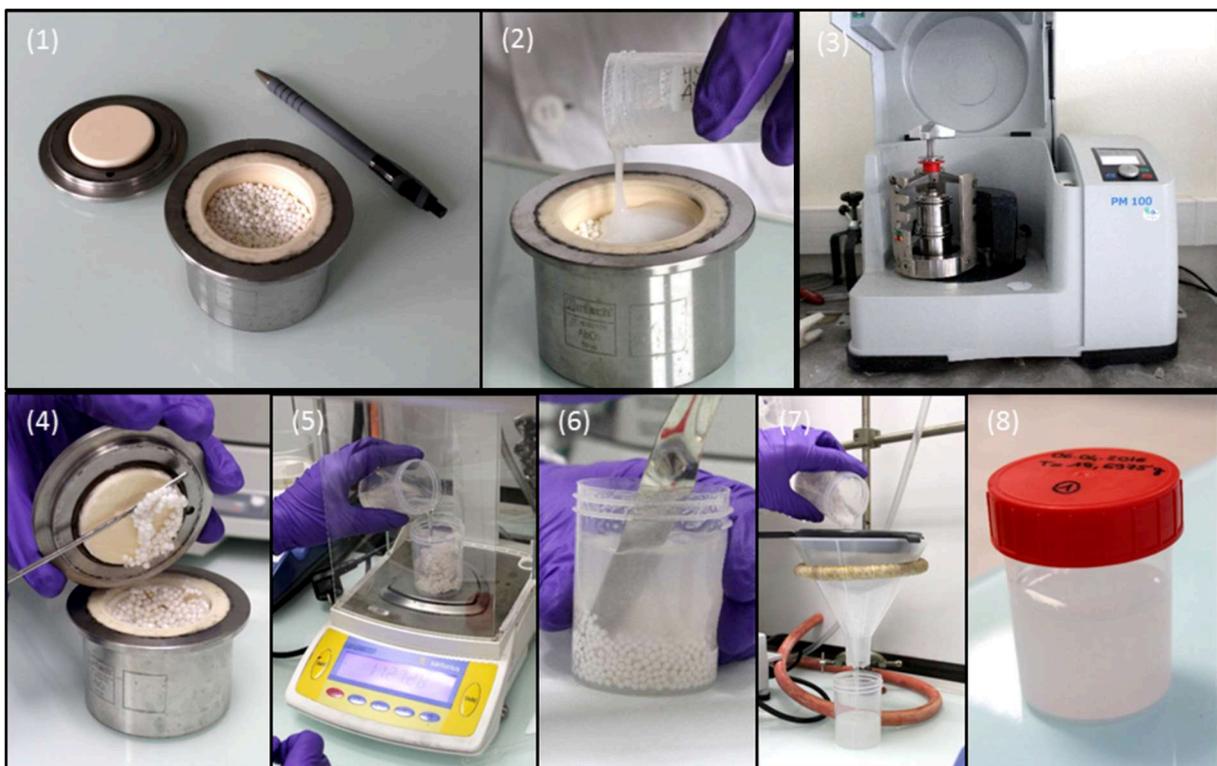


Figure 39 : Etapes de préparation de l'huile pré-gélifiante par broyage colloïdal des particules d'acétate de calcium dans l'huile de soja

Malgré le broyage, l'acétate de calcium finit toujours par sédimenter au cours du temps. Il est donc important de bien vortexer la solution de HS+9%AC avant d'effectuer la dilution, et la solution de HS+2%AC avant de démarrer les expériences en microfluidique.

2.3. Bain de Calcium et Sérum Physiologique

La solution gélifiante (bain de calcium) et la solution de rinçage (sérum physiologique) sont préparées à l'aide de NaCl (Merck, EMPROVE®, 1-06400), CaCl₂ (Merck, EMPROVE®, 1-02465) et HEPES (Merck, 1-37075) en poudres, en conditions stériles. Pour cela, des solutions mères aqueuses de NaCl, CaCl₂, et HEPES sont préparées sous Poste de Sécurité Microbologique (PSM),

dans un laboratoire de type L2, puis les volumes nécessaires sont prélevés afin d'obtenir les concentrations décrites dans le tableau suivant

	NaCl	CaCl ₂	HEPES
Bain de Calcium	80mM	30-100mM	25Mm
Sérum Physiologique	150mM	2mM	10Mm

Le pH de ces solutions est ensuite ajusté à 7,4 à l'aide d'un pHmètre (VWR, pHenomenal™), par ajout de quelques gouttes de NaOH ou HCl. Les solutions n'ont pas besoin d'être autoclavées puisqu'elles sont préparées en conditions stériles, avec des composés stériles.

3. Caractérisations physico-chimiques des solutions

3.1. Rhéologie

Les propriétés rhéologiques des différents alginates utilisés ont été caractérisées à l'aide d'un rhéomètre Kinexus pro+ (commercialisé par la société Malvern Panalytical) (Figure 40 A), muni d'un cône CP1/60 (angle de 1°, 60mm de diamètre). Pour chaque mesure, 1mL d'échantillon est déposé sur le plateau (Figure 40 B), puis le cône se place à un écart de 30 µm entre le centre du cône et le plateau (Figure 40 C), et applique une gamme de cisaillement ou un balayage en fréquence. Le plateau est régulé en température, les mesures ont ainsi été effectuées à 22°C.

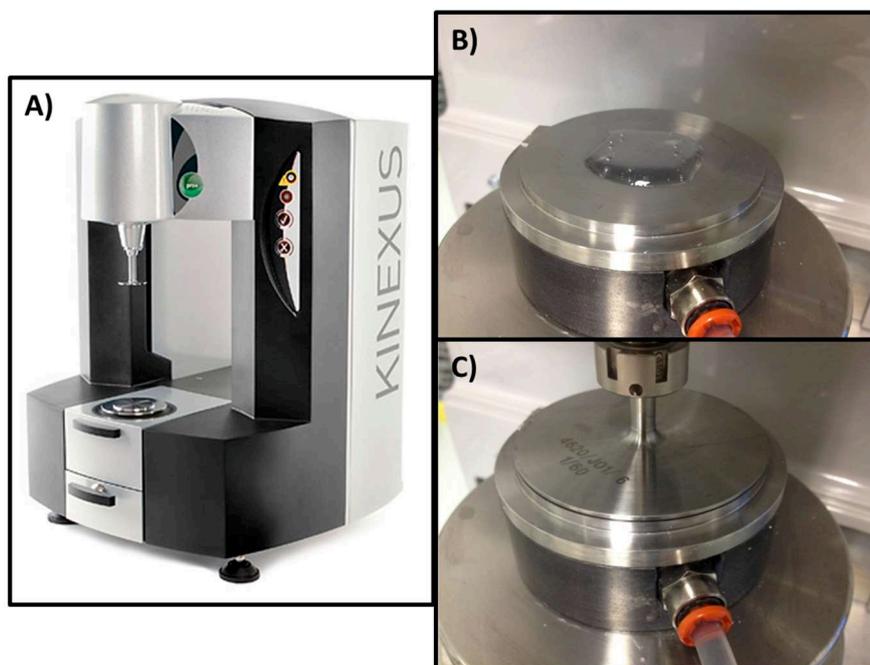


Figure 40 : Caractérisation des alginates en rhéologie : A) Rhéomètre cône-plan utilisé (Kinexus pro+, Malvern Panalytical) ; B) Dépôt de l'échantillon (1 mL) sur le plan du rhéomètre ; C) Cône CP1/60 placé sur l'échantillon étudié

Deux types de tests ont été effectués : des mesures en mode « Viscosimétrie », et des mesures en mode « Oscillation ». Pour les mesures en viscosimétrie, la viscosité des échantillons a été mesurée par l'appareil en fonction du taux de cisaillement, sur une gamme allant de $0,001s^{-1}$ à $1000s^{-1}$.

Concernant les mesures en oscillation, elles sont faites en deux étapes : dans un premier temps, des mesures en oscillation avec balayage en déformation sont effectuées (de 0,01 à 100 %), à fréquence imposée, afin de déterminer la zone linéaire de viscoélasticité (zone pour laquelle le polymère répond correctement à la sollicitation). Un taux de déformation est ensuite choisi dans cette zone de linéarité, afin d'effectuer des mesures en oscillation avec balayage en fréquence (de 0,005 à 10 Hz), à taux de déformation fixe. Le taux de déformation choisi pour les différents polymères varie de 0,8 à 10 %. Ces mesures permettent de déterminer les modules élastiques G' et visqueux G'' des différents polymères étudiés.

Les résultats obtenus avec ces différents tests seront présentés dans le chapitre 4.

3.2. Tension interfaciale

Des mesures de tensions interfaciales des différents alginates dans les phases dispersées ont été effectuées avec l'appareil Kruss DSA100 (Figure 41 A), en utilisant la méthode de la goutte pendante (Figure 41 B). Pour cela, le polymère à analyser est prélevé à l'aide d'une seringue (500 μ L, Gastight 1750 PLL, Hamilton®), dont l'aiguille présente un diamètre interne de 0,25 mm et un diamètre externe de 0,52 mm (gauge 25, PN 7018345, EDF Nordson®). Cette seringue est ensuite placée au-dessus d'une cuve de spectroscopie contenant la phase continue (Huile de Soja). Une goutte de polymère de 25 à 38 μ L (volume ajusté à chaque polymère afin d'optimiser la mesure) est ensuite formée dans la phase dispersée. La mesure de tension interfaciale est effectuée toutes les secondes pendant 5 à 10 minutes, sur 3 gouttes pour chaque condition testée. Une moyenne des valeurs obtenues pour chaque goutte est ensuite effectuée. Les résultats présentés dans le Chapitre 5 correspondent à la moyenne effectuée sur les 3 gouttes, et les barres d'erreur représentent les écarts types entre ces trois valeurs.

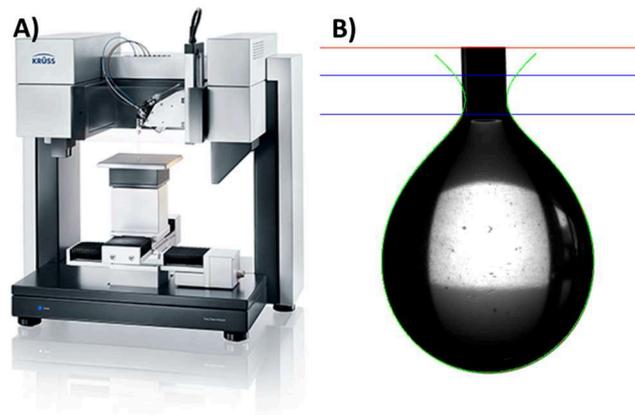


Figure 41 : Mesure de tension interfaciale : A) Appareil Kruss DSA100 utilisé ; B) Mesure de la tension interfaciale par la méthode de la goutte pendante

3.3. Angle de contact

Des mesures d'angle de contact des différents polymères sur différentes surfaces, en huile de soja, ont été effectuées. Le même appareil que pour la tension interfaciale, Kruss DSA100, a été utilisé (Figure 41 A), ainsi que la même seringue. Des gouttes d'alginate sont formées dans l'huile de soja, et sont déposées sur la surface étudiée : silicium silanisé ou COC silanisé (Figure 42). Ces gouttes stabilisent pendant 3 heures, avant que les angles de contacts ne soient mesurés par l'appareil (du côté gauche et du côté droit de la goutte). Pour chaque mesure, une moyenne est effectuée entre les angles obtenus de chaque côté, et pour chaque polymère étudié, les résultats présentés dans le chapitre 5 sont les moyennes des valeurs obtenues sur chaque goutte (pour n=3 gouttes), les barres d'erreur représentent les écarts types sur ces trois valeurs.

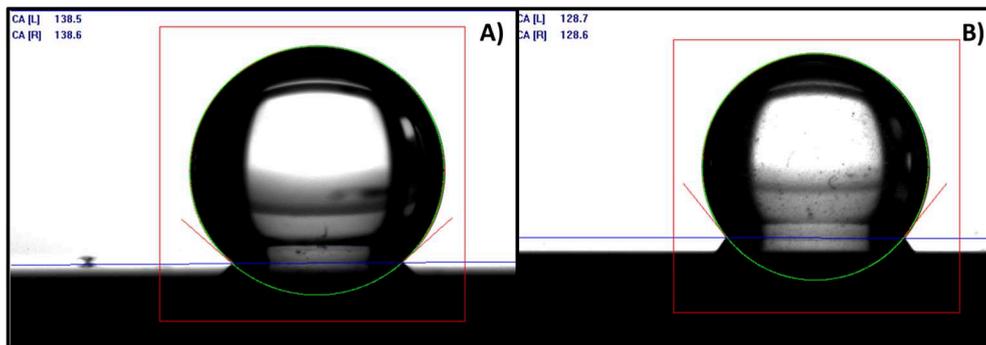


Figure 42 : Exemple de mesure d'angle de contact pour différents polymères étudiés : A) Alginate de référence SLG100 ; B) Alginate Système A

3.4. Cinétique de gélification

La cinétique de gélification des différents polymères a été étudiée. Pour cela, une goutte de polymère est déposée sur une lame de verre. Une lamelle est posée sur le dessus, à une épaisseur contrôlée à l'aide de scotch double face de 50 μm d'épaisseur. La solution aqueuse gélifiante est ensuite déposée autour de la goutte d'alginate par capillarité (Figure 43). L'avancée du front de gélification de l'alginate est alors observée et enregistrée pendant environ 10min, à l'aide d'une caméra à une fréquence de 2 images par seconde. Les images sont ensuite analysées sur ImageJ afin d'obtenir l'avancée du front de gélification en fonction du temps (Figure 44). Les résultats sont présentés dans le chapitre 4.

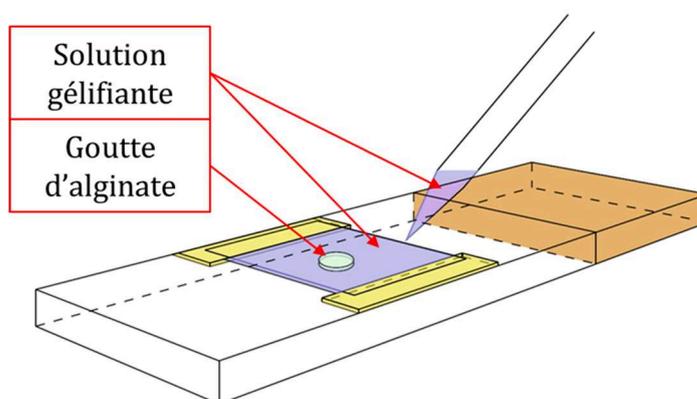


Figure 43 : Illustration du montage utilisé pour les mesures de cinétique de gélification³⁰⁹

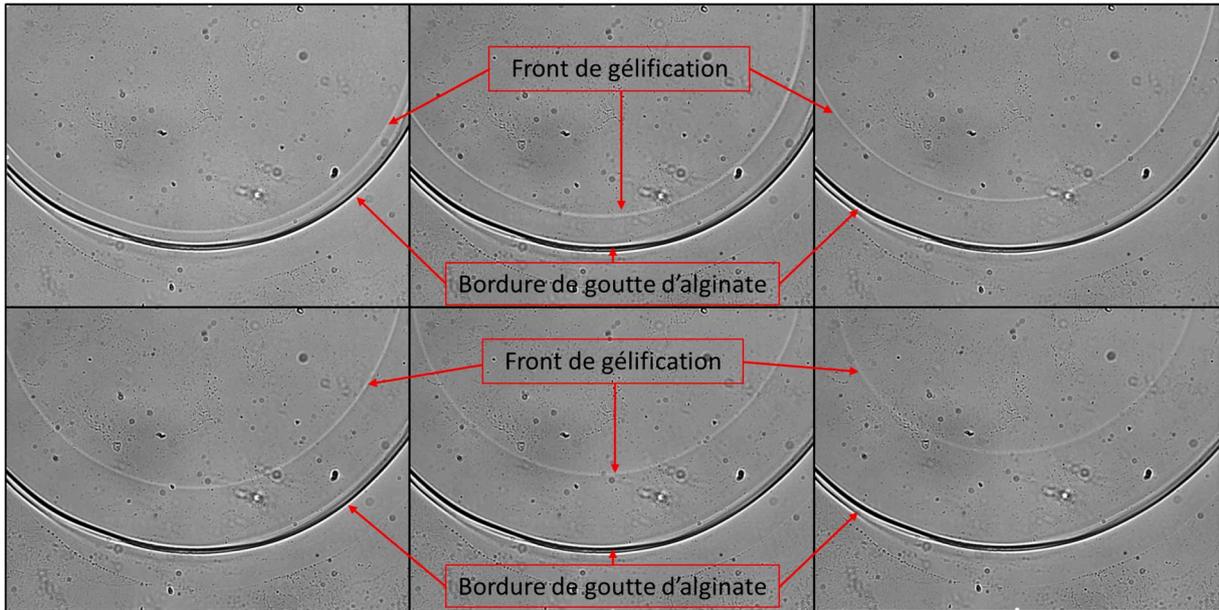


Figure 44 : Détermination expérimentale de la cinétique de gélification, par mesure de la vitesse d'avancement du front de gélification

4. Caractérisation des capsules

4.1. Taille et forme des capsules

Les capsules formées en microfluidique sont caractérisées en termes de taille et de forme, par analyse d'images grâce au logiciel ImageJ. Pour cela, les mesures suivantes sont effectuées sur une centaine de capsules pour chaque expérimentation :

- Diamètre maximal (d_{max}) et minimal (d_{min}) de la capsule (voir Figure 45 A et B).
- Aspect Ratio AR :

$$AR = \frac{d_{min}}{d_{max}}$$

L'Aspect Ratio témoigne de la sphéricité de la capsule : une capsule parfaitement sphérique aura un AR de 1, et plus la valeur s'éloigne de 1, moins la capsule est sphérique (plus elle est ovale). Dans les exemples donnés en Figure 45, la capsule caractérisée en A) a un AR de 0,99, alors que celle caractérisée en B) a un AR de 0,79.

- Moyenne de tous les diamètres obtenus, et écart type.
- Coefficient de variation CV :

$$CV = \frac{\text{écart type}}{\text{moyenne}}$$

il témoigne de la monodispersité des capsules.

- Pourcentage de capsules satellites.

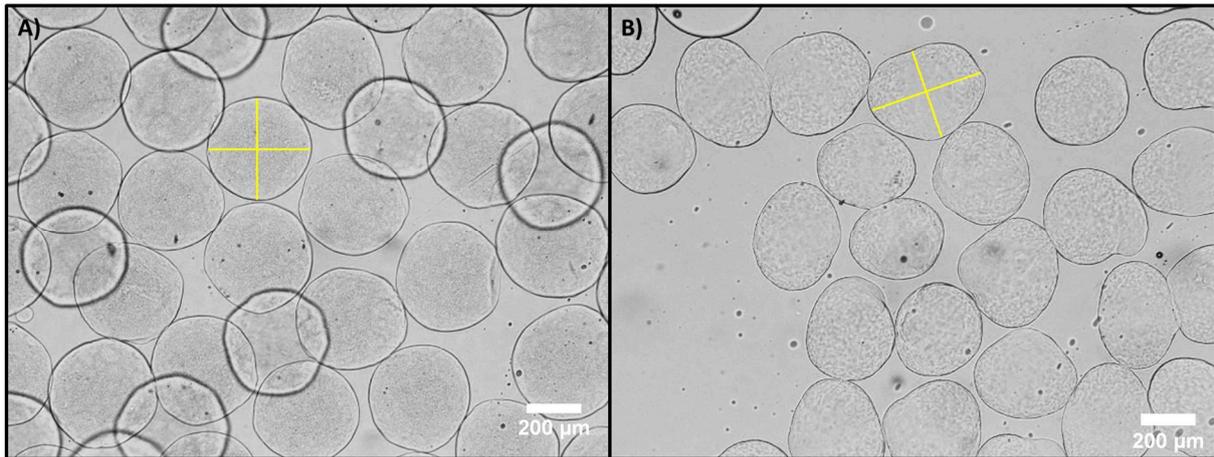


Figure 45 : Exemples de mesures de diamètre maximal et minimal de capsules : A) sur une capsule d'alginate Système A - 4% ; B) sur une capsule d'alginate de référence SLG100 - 2,5%

Les résultats de caractérisation de capsules sont présentés dans le Chapitre 6.

4.2. Perméabilité

La perméabilité des capsules a été caractérisée grâce à la méthode suivante :

Des capsules vides des différents alginates testés sont tout d'abord produites en microfluidique (une centaine pour chaque condition testée). Ces capsules sont ensuite mises dans des solutions aqueuses de Fluorescéine Isothiocyanate Dextran (FITC-Dextran) de différentes tailles (Sigma Aldrich, FD20S, FD40S, FD70S, FD150S, FD250S, FD500S), préparées à 0,033mg/mL dans du Sérum Physiologique (150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, permettant de maintenir les capsules gélifiées). Les tailles suivantes ont été testées : 20 kDa, 40 kDa, 70 kDa, 150 kDa, 250 kDa, et 500kDa. Dans chaque solution, des billes de verre de 425-600 µm de diamètre (Sigma Aldrich, G8772) sont ajoutées aux capsules afin de servir de contrôle négatif (Figure 46 A). Les capsules sont agitées dans ces solutions pendant 48h à température ambiante, à l'aide d'un agitateur à microplaques.

Suite à cela, les solutions contenant les FITC-Dextran, capsules et billes de verre sont récupérées, et observées en microscopie confocale. La mise au point est effectuée de manière à se placer à l'intérieur des capsules/billes de verre, et des photos sont prises en fluorescence (Figure 46 B).

Enfin, les images obtenues sont analysées sur ImageJ, avec le protocole suivant, utilisé pour chaque condition (sur 3 capsules différentes par condition testée) : sur chaque capsule, 8 diamètres sont tracés, pour chaque diamètre, le profil de fluorescence est obtenu (Figure 46 C). Une moyenne est ensuite faite des 8 profils de fluorescence obtenus. On obtient ainsi un profil moyen de fluorescence, à partir duquel on calcule la valeur moyenne de l'intensité de fluorescence au niveau du plateau, représentant l'intérieur de la capsule. Après avoir répété ce protocole sur 3 capsules différentes, une nouvelle moyenne est faite sur ces 3 valeurs. Ce protocole est réitéré pour obtenir de la même manière la valeur moyenne de l'intensité de fluorescence à l'intérieur des billes de verre en solution. Puis, l'intensité de fluorescence de la solution est mesurée (zone correspondant au fond des images, sans capsule ni bille de verre). En calculant le rapport entre l'intensité de fluorescence à l'intérieur des capsules et billes de verre, par l'intensité de fluorescence de la solution, on obtient ainsi le pourcentage de passage de molécules de FITC-dextran. Les billes de verre servant de référence, le pourcentage de passage obtenu pour les capsules est donc normalisé par la valeur de pourcentage de passage obtenue pour les billes de

verre. On obtient ainsi les résultats présentés dans le Chapitre 6. Les barres d'erreur correspondent aux écarts types obtenus en effectuant la moyenne des valeurs d'intensité de fluorescence sur les 3 capsules étudiées.

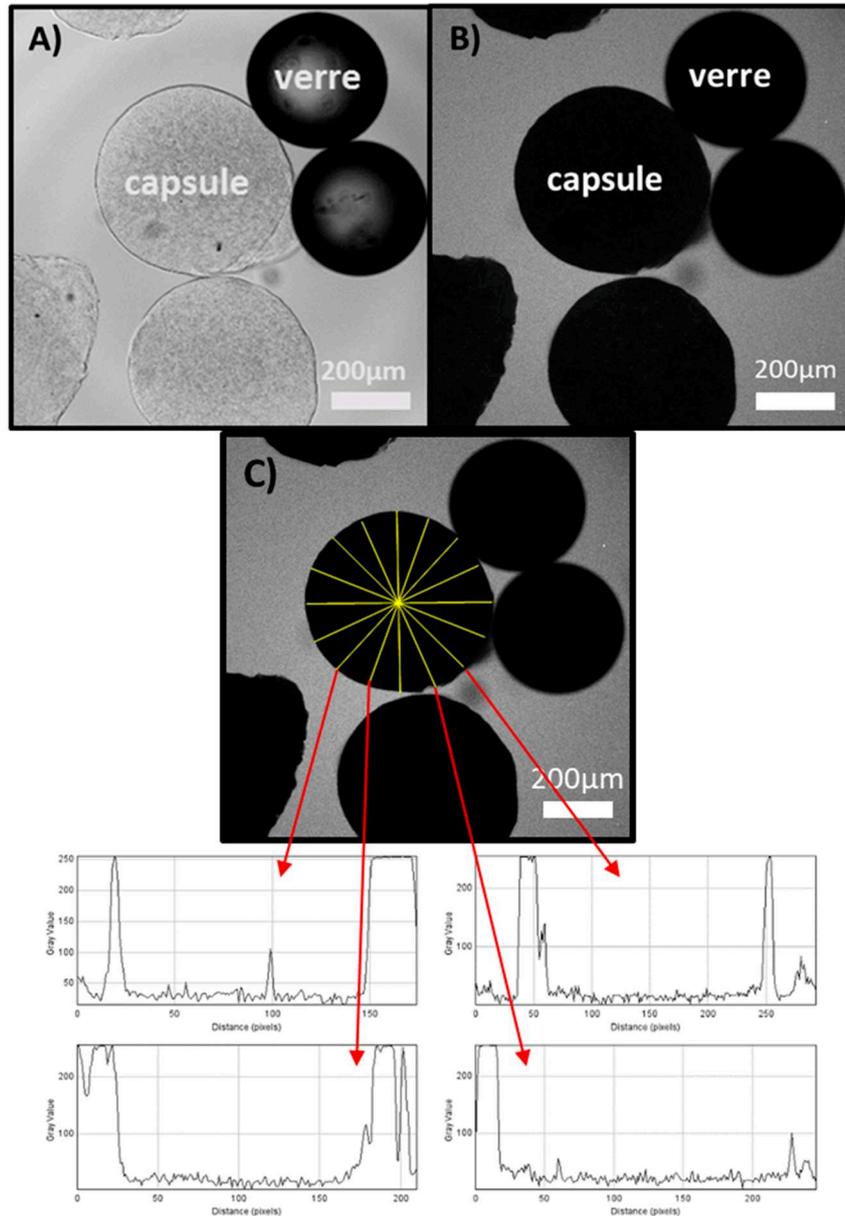


Figure 46 : Mesure de la perméabilité des capsules : A) Capsules en solution de FITC-Dextran + billes de verre, en lumière blanche ; B) Capsules en solution de FITC-Dextran + billes de verre, en fluorescence ; C) Détermination des profils d'intensité de fluorescence sur 8 diamètres d'une capsule

5. Encapsulation de cellules et d'îlots

Les expérimentations d'encapsulation de cellules ont été effectuées en laboratoire de classe de confinement L2, sous Poste de Sécurité Microbiologique. Les différents types de cellules

encapsulées sont des INS-1 (cellules de lignée dérivées de cellules pancréatiques β de rats, sécrétrices d'insuline), des îlots de Langerhans issus de porcs néo-nataux, fournis par l'Hôpital Universitaire de Genève, et des îlots de Langerhans humains, fournis par l'Etablissement Français du Sang de Grenoble.

5.1. Solutions utilisées

Les différentes solutions utilisées pour les encapsulations de cellules et d'îlots sont les suivantes :

- Milieu de culture des INS-1, composé de 215 mL de RPMI 1640 (PAN Biotech RPMI 1640 Medium, DD Biolab), 25 mL de sérum de veau fœtal (PAN Biotech, FBS Premium, 0,2 μ m sterile filtered P30-14401), 2,5 mL de Sodium Pyruvate (PAN Biotech, Sodium Pyruvate 100 mM, P04-43100), 2,5 mL d'Hepes (PAN Biotech, Hepes Buffer 1 M, P05-01100), 2,5 mL de L-Glutamine (PAN Biotech, P04-80050), 2,5 mL de pénicilline-streptomycine (PAN Biotech, P06-19100), et 250 μ L de 2-Mercaptoéthanol (Sigma Aldrich, M6250) à une concentration de 50 μ M. Pour le milieu de culture des INS-1 encapsulées, 55 mg de chlorure de calcium sont ajoutés (pour maintenir les capsules gélifiées), à partir d'une solution aqueuse stérile de CaCl_2 .
- Tampon phosphate salin DPBS (Gibco™, 14190144, ThermoFisher Scientific), pour rincer les cellules.
- Trypsin-EDTA (Gibco™, 25300054, ThermoFisher Scientific), pour décoller les cellules INS-1 de leur flasque de culture (lors du passage).
- Bleu de Trypan (Gibco™, 15250061, ThermoFisher Scientific), pour marquer les cellules mortes lors du comptage des INS-1.
- Milieu d'îlots de porc (Corning® Mediatech Inc., Neonatal Porcine Islet Culture Media, 98-343-CV).
- Milieu d'îlots humains, fourni par l'EFS lors de réception d'îlots humains.

5.2. Comptage et caractérisation des îlots/cellules

Pour chaque lot d'îlots reçus, une caractérisation en nombre et taille est effectuée, afin d'adapter les conditions expérimentales. Pour cela, les îlots imagés, et une macro a été développée sous ImageJ afin de déterminer par automatiquement la taille des îlots. Ces tailles sont ensuite analysées sous excel afin de déterminer la répartition en taille, et le nombre d'îlots. Une fois le nombre d'îlots déterminé, le volume à prélever afin d'avoir environ 20 000 IEQ est calculé.

Concernant l'encapsulation d'INS-1, les cellules étant maintenues en culture, les encapsulations ont été effectuées juste après le passage d'une flasque à confluence, en suivant un protocole habituel suivant :

- Le milieu de la flasque est retiré
- 5 mL de PBS sont ajoutés, pour rinçage, puis retirés.
- 2,5 mL de Trypsine sont ajoutés, puis la flasque est mise à incuber à 37°C pendant 5 minutes.
- La flasque est retirée de l'étuve, et secouée légèrement, afin de bien détacher toutes les cellules.
- 7,5 mL de milieu de culture sont ajoutés, afin de désactiver la Trypsine.
- Les 10 mL de suspension cellulaire sont récupérés en falcon de 60 mL, et centrifugés 5 minutes à 900 rpm

- Le surnageant est retiré, et 2 mL de milieu de culture sont ajoutés
- 100 μ L de la suspension cellulaire obtenue sont prélevés, puis ajoutés dans 900 μ L de PBS
- La solution obtenue est de nouveau diluée de moitié avec du bleu de Trypan (100 μ L de suspension cellulaire + 100 μ L de bleu de Trypan).
- Le comptage des cellules est effectué manuellement en lame de Malassez, sur la suspension cellulaire diluée obtenue
- Une fois la concentration cellulaire de la suspension de départ déduite, le volume à prélever afin d'avoir $5 \cdot 10^6$ cellules est calculé.

5.3. Préparation des îlots et des alginates

Les alginates utilisés pour les encapsulations de cellules sont à une concentration massique de 2,5% pour l'alginate de référence SLG100, et de 4% pour les alginates PEGylés. Ils doivent, préalablement à l'encapsulation, être mélangés aux îlots/cellules. Le fait d'ajouter les îlots/cellules dilue les alginates, il est donc nécessaire de préparer les alginates à des concentrations plus élevées afin d'avoir les concentrations finales voulues. Pour cela, l'alginate de référence SLG100 est solubilisé à 4% massique, et les alginates PEGylés sont solubilisés à 5,45% massiques. Il est également nécessaire que les îlots/cellules soient en suspension dans de l'alginate buffer avant de les mélanger aux alginates, et dans un volume connu. Pour cela, le protocole suivant est appliqué :

- Le volume nécessaire d'îlots/cellules en suspension dans leur milieu est prélevé (volume correspondant à 20 000 IEQ pour les îlots, et $5 \cdot 10^6$ cellules pour les INS-1).
- Ces îlots sont centrifugés à 100g pendant 3 minutes (900 rpm, 5 minutes pour les INS-1), afin de retirer le surnageant.
- 1ml de sérum physiologique est ajouté pour les rincer.
- La suspension est centrifugée suivant les mêmes paramètres que précédemment, afin de retirer le surnageant.
- 1ml d'alginate buffer est ajouté.
- La suspension est centrifugée (mêmes paramètres).
- Un volume précis d'alginate buffer surnageant est retiré :
 - Pour l'alginate de référence SLG100 : 887,5 μ L du surnageant sont retirés.
 - Pour les alginates PEGylés : 920 μ L du surnageant sont retirés.
- Les alginates préalablement solubilisés aux concentrations plus élevées sont ajoutés aux suspensions îlots/cellules + alginate buffer :
 - Pour l'alginate de référence SLG100 : aux 112,5 μ L restants, 187,5 μ L d'alginate à 4% sont ajoutés.
 - Pour les alginates PEGylés : aux 80 μ L restants, 220 μ L d'alginate à 5.45% sont ajoutés.
- Les îlots/cellules et l'alginate sont mélangés à l'aide d'un cône de pipette gel-loading 200 μ L (Corning® gel-loading pipet tips, Sigma Aldrich, CLS4884).

On obtient ainsi un mélange d'alginate + îlots/cellules, aux concentrations massiques souhaitées : 2,5% massique pour l'alginate de référence SLG100, et 4% massique pour les alginates PEGylés.

5.4. Mesures de viabilité

Pour les mesures de viabilité, différents marqueurs ont été utilisés au cours de la thèse : pour marquer les cellules vivantes, le premier type de marqueur ayant été utilisé est le Fluorescéine Diacétate (FDA) (ThermoFisher Scientific, S1303), puis un autre type de marqueur a été utilisé : le Syto™ 13 (ThermoFisher Scientific, S7575) (marqueur d'acides nucléiques des cellules vivantes, fluorescent en vert) ; pour marquer les cellules mortes, de l'Iodure de Propidium (IP) (ThermoFisher Scientific, P1304MP) a été utilisé (marqueur des cellules mortes, intercalent des acides nucléiques, fluoresce en rouge).

Le protocole de marquages est le suivant :

- Un échantillon d'flots est déposé dans un puits de 2 mL.
- 1 µL de Syto-13 (5mM) est ajouté, puis 2 mL de milieu (concentration finale : 2.5µM).
- La solution est laissée à l'incubateur pendant 15min.
- 20 µL d'une solution de PI à 1mg/ml sont ajoutés (concentration finale : 10 µg/ml).
- L'échantillon est ensuite observé en fluorescence ($\lambda_{ex}=545$; $\lambda_{ém}=630$).
- Des photos des cellules vivantes et des cellules mortes sont prises, afin d'être ensuite analysées sur ImageJ.

Un exemple d'images obtenues est présenté en Figure 47. Le protocole utilisé sur ImageJ pour déterminer les viabilités à partir des images obtenues est le suivant :

- Sur la totalité de l'image des cellules vivantes en fluorescence, l'aire et la densité intégrée (Integrated density, IntDen) sont calculées.
- La moyenne d'intensité (mean gray value) est calculée sur 15 cercles sélectionnés dans le fond d'image (ne contenant aucune cellules) à différents endroits (pour prendre en compte la fluorescence du fond en tout point, et ainsi avoir une valeur fiable même si l'intensité n'est pas parfaitement homogène).
- La moyenne des intensités obtenues sur les 15 cercles de fond est calculée (cela nous donne l'intensité de fluorescence moyenne du fond).
- L'intensité de fluorescence des cellules vertes est ainsi calculée avec la formule suivante :

$$Fluo\ verte = IntDen - Aire \times moyenne(fond)$$

- Le même protocole est suivi pour l'image des cellules mortes en fluorescence.
- Le pourcentage de viabilité est ainsi obtenu grâce au calcul suivant :

$$\% \text{ viabilité} = \frac{Fluo\ verte}{Fluo\ rouge + Fluo\ verte}$$

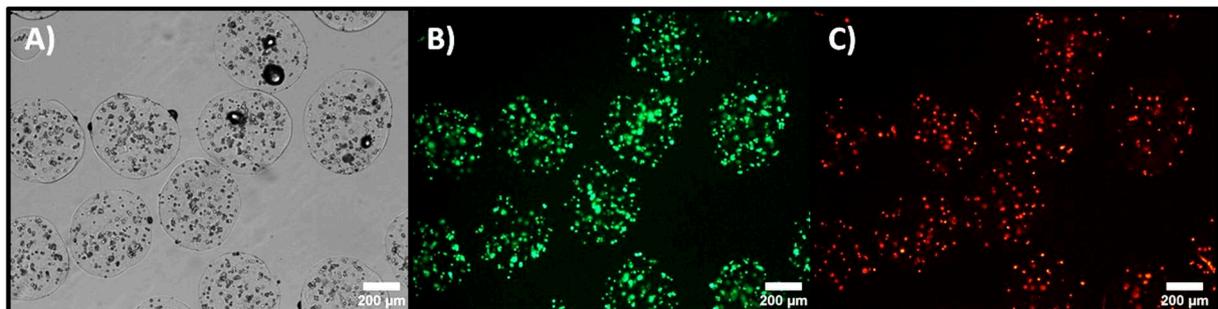


Figure 47 : Exemple d'images obtenues lors de mesures de viabilité sur des cellules encapsulées, marquées au Syto13-IP :
 A) Image en lumière blanche ; B) Image en fluorescence, les cellules vivantes marquées par le Syto13 fluorescent en vert ;
 C) Image en fluorescence, les cellules mortes marquées par l'IP fluorescent en rouge

5.4.1. Test d'impact des fluides sur les cellules

Un premier test de viabilité a été effectué sur des cellules INS-1 mélangées dans les différents alginates, afin de déterminer l'impact des fluides sur les cellules. Pour cela, les protocoles de préparation des cellules et de mélange avec l'alginate décrits dans les parties 5.2 et 5.3 sont suivis. Suite au mélange des cellules avec les alginates, une première mesure de viabilité est effectuée juste après mélange, puis des mesures de viabilité sont effectuées toutes les 10 minutes jusqu'à 40 minutes de contact entre les cellules et l'alginate.

Ce test a été effectué sur les alginates Système A, Système C et alginate-kétoprofène à chaînes longues et chaînes courtes, à différentes concentrations (2, 3 et 4 % massique) ; ainsi qu'en alginate de référence SLG100 aux mêmes concentrations (2, 3 et 4 % massique). Les résultats sont présentés en Chapitre 4.

5.4.2. Mesures de viabilité pendant les encapsulations

Lors des expériences d'encapsulation de cellules ou îlots, des mesures de viabilité sont effectuées sur les îlots/cellules tout au long de l'encapsulation (Figure 48) :

- Dans le milieu à t_0 (juste avant l'expérience) (Mesure de viabilité 1 sur la Figure 48)
- Juste après avoir mélangé les cellules avec l'alginate (Mesure de viabilité 2 sur la Figure 48)
- En fin d'expérience, dans l'alginate restant n'ayant pas été utilisé pour former des capsules (Mesure de viabilité 3 sur la Figure 48)
- En fin d'expérience, dans les capsules (Mesure de viabilité 4 sur la Figure 48)

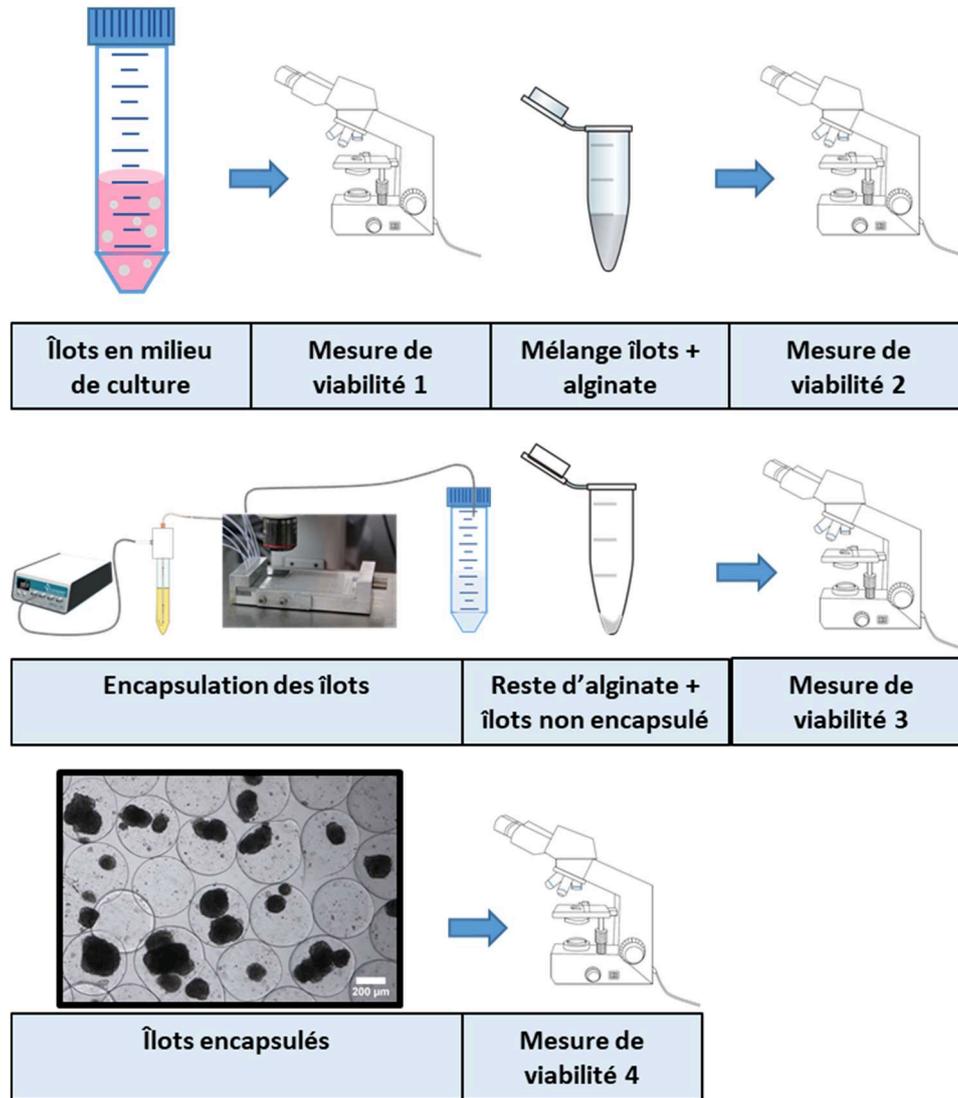


Figure 48 : Mesures de viabilité effectuées au cours d'une expérience d'encapsulation

5.5. Récolte des capsules et conservation

La récolte des capsules diffère en fonction du type de système microfluidique utilisé. Pour les encapsulations de cellules effectuées dans cette thèse, il a été décidé d'utiliser uniquement le système microfluidique simplifié MFFD550. Dans ce système, les capsules en sortie sont récupérées dans un falcon contenant 5 mL de solution aqueuse gélifiante, et transférées en Sérum Physiologiques toutes les 6 minutes (pour plus de détails, voir partie 2.3).

A la fin de l'expérience d'encapsulation, une fois que les capsules ont sédimenté dans le falcon de récupération contenant le sérum physiologique, les capsules et les restes de solution gélifiante, le surnageant est retiré et les capsules sont transférées dans une flasque ou un falcon (en fonction de l'utilisation des capsules par la suite) contenant du milieu de culture. Si les capsules sont conservées au CEA pour des mesures de viabilité *in vitro* sur plusieurs jours, ces dernières sont récupérées en flasques et conservées à l'incubateur (à 37°C). En revanche, si les capsules doivent être envoyées à l'Université Grenoble Alpes (partenaire de la thèse) pour des mesures de viabilité

et sécrétion d'insuline, elles sont alors récupérées en falcon 50 mL, et envoyées par livreur à l'UGA dans l'heure qui suit l'encapsulation.

5.6. Implantation in vivo

Un test d'implantation d'îlots encapsulés et de capsules vides in vivo a été effectué. Pour cela, le protocole suivant a été utilisé :

- Les capsules vides ont tout d'abord été produites en système microfluidique simplifié MFFD550, en conditions stériles sous Poste de Sécurité Microbiologique (au CEA de Grenoble)
- Les îlots de Langerhans ont été encapsulés, également sous PSM (à l'Hôpital de Genève)
- Suite aux encapsulations des îlots, les capsules vides ainsi que les capsules contenant les îlots sont tout d'abord rincées plusieurs fois dans une solution de HBSS contenant 2 mM de chlorure de calcium (afin de bien maintenir l'alginate gélifié).
- Une fois rincées, les capsules sont maintenues dans cette solution de HBSS+CaCl₂
- Les souris sont endormies
- Une petite incision est effectuée sur leur abdomen (Figure 49 A).
- Les capsules contenues dans la solution de HBSS+CaCl₂ sont injectées dans la cavité péritonéale des souris à travers cette incision (Figure 49 B).
- L'incision est refermée à l'aide d'un point de suture (Figure 49 C).
- Les souris sont réveillées.

Les souris ont ensuite été nourries et entretenues normalement, en cage, pendant deux semaines. A l'issue des deux semaines, elles ont été sacrifiées pour récupérer les capsules à l'intérieur, et les observer.

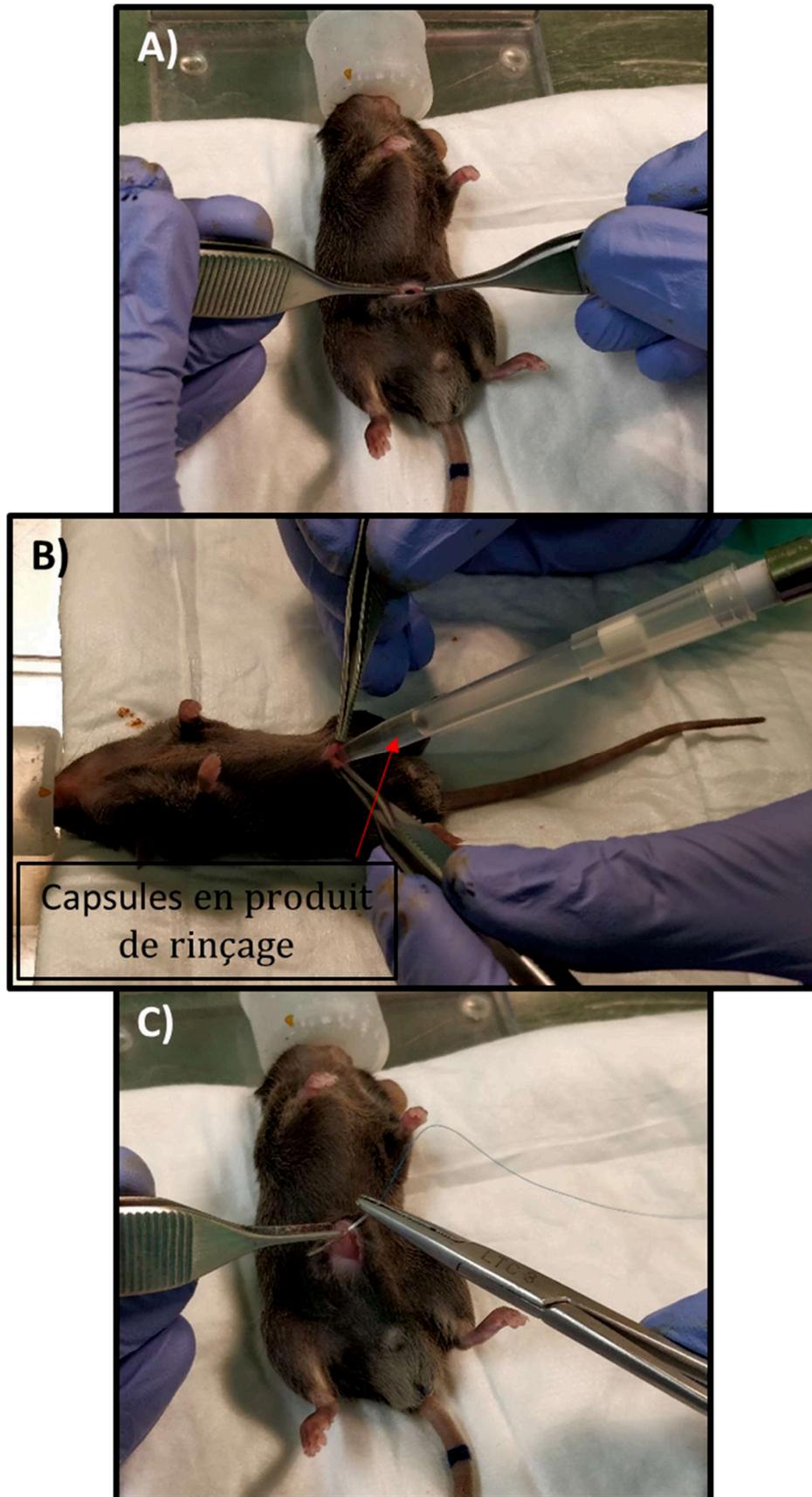


Figure 49 : Greffe de capsules dans la cavité péritonéale d'une souris : A) incision sur l'abdomen ; B) Injection de la solution de HBSS+CaCl₂ contenant les capsules ; C) point de suture pour refermer l'incision

Chapitre 4 : Pré-encapsulation

Table des matières

1. Phase de pré-encapsulation, méthodologie de l'étude	110
1.1 Modification chimique de l'alginate.....	110
1.1.1 Synthèse des dérivés de PEG.....	111
1.1.2 Greffage des dérivés de PEG sur l'alginate	113
2. Caractérisation des alginates	116
2.1 Rhéologie.....	116
2.1.1 Viscosité et contrainte de cisaillement en fonction du taux de cisaillement.....	118
2.1.2 Propriétés viscoélastiques et comparaison.....	133
2.2 Structure et pureté des polymères.....	137
2.2.1 Pureté et pourcentage de greffage.....	137
2.2.1 Longueur des chaînes.....	141
3. Impact des fluides sur la viabilité	143
4. Bilan	145

1. Phase de pré-encapsulation, méthodologie de l'étude

Comme présenté précédemment, l'encapsulation de cellules en système microfluidique se sépare en 3 principales étapes : l'étape de pré-encapsulation, d'encapsulation, et de post-encapsulation. L'étape de pré-encapsulation consiste en la préparation des solutions utilisées pour l'encapsulation, en particulier les biopolymères, ainsi que la préparation des cellules à encapsuler, et le mélange des deux.

La préparation des phases continues (huile de soja et huile pré-gélifiante) suit les protocoles décrits dans le Matériel et Méthodes. Ces protocoles sont établis de manière à obtenir des huiles le plus reproductibles possibles, afin de ne pas changer les conditions expérimentales et les paramètres à utiliser dans le système microfluidique.

La solubilisation de l'alginate de référence suit également le protocole décrit dans le Matériel et Méthodes : 6 mL d'alginate buffer (dont la composition a été décrite précédemment) sont ajoutés dans un flacon de 250 mg d'alginate SLG100 (ou SLM100) Ultrapure Pronova, afin d'obtenir un alginate à 4% massique. Le mélange est ensuite laissé à agiter à température ambiante pendant 24h.

Concernant les alginates modifiés chimiquement par l'EPFL, ils sont formés à partir de l'alginate Kelton HV de chez Kelco (San Diego, USA). Il existe ensuite différents protocoles de synthèse utilisés, donnant lieu à des alginates ayant différentes compositions chimiques, et donc différentes propriétés physico-chimiques. Les méthodes de synthèse sont expliquées dans la suite de ce paragraphe.

1.1 Modification chimique de l'alginate

Le but de ces modifications chimiques est d'améliorer les propriétés mécaniques, l'élasticité, et la stabilité à long terme de l'alginate. Concernant les propriétés mécaniques et l'élasticité, il a été décidé par l'EPFL d'ajouter du Poly(Ethylène-Glycol) sur la chaîne carbonée de l'alginate, car il présente de bonnes propriétés mécaniques et élastiques (voir Etat de l'Art). Concernant la stabilité à long terme, les chaînes de PEG greffées contiennent des groupes fonctionnels à leur extrémité, qui vont former des liaisons covalentes entre eux. L'alginate ainsi obtenu gélifiera donc de deux manières : par gélification ionique avec la formation de la boîte à œufs (comme l'alginate normal) (voir Etat de l'art), ainsi que par gélification covalente entre les groupements fonctionnels des chaînes de PEG, plus stable que la gélification ionique.

Ces synthèses utilisent différents mécanismes de réactions organiques, basés sur le déplacement des électrons de composés organiques. Elles peuvent être séparées en deux principales étapes : la synthèse des dérivés de PEG contenant un groupement fonctionnel à leur extrémité, et le greffage de ces dérivés de PEG sur l'alginate. Dans le cadre de cette thèse, les dérivés de PEG ayant été utilisés sont les suivants :

- PEG auquel a été ajouté une fonction thiol : PEG-SH (voir Figure 50 A)
- PEG auquel a été ajouté une fonction acrylate : PEG-acrylate (voir Figure 50 B)
- PEG auquel a été ajouté du Kétoprofène : PEG-ketoprofen (voir Figure 50 C)

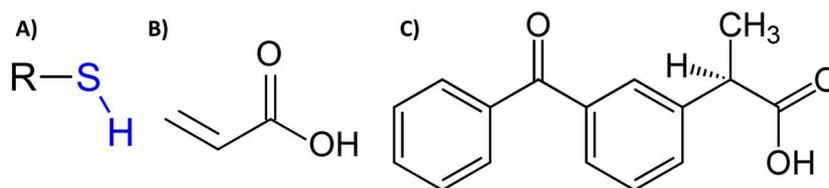


Figure 50 : Différents groupes fonctionnels ajoutés sur le PEG : A) Fonction thiol ; B) Fonction Acrylate ; C) Kétoprofène

Ces différents dérivés de PEG, une fois greffés, donnent lieu à différents types d'alginate. Ceux utilisés dans le cadre de cette thèse seront nommés comme suit :

- **Système A** : Alginate auquel est greffé du PEG-SH
- **Système C** : mélange de deux alginate : le premier auquel est greffé du PEG-SH et le deuxième auquel est greffé du PEG-acrylate
- **Alginate-Ketoprofen** : Alginate auquel est greffé du PEG-Kétoprofène

Pour le Système A et l'Alginate_Ketoprofen, les dérivés de PEG sont synthétisés par l'EPFL. Pour le Système C, les dérivés de PEG (PEG-acrylate et PEG-SH) sont achetés auprès de Biochempeg et Sigma. Pour les trois alginate, les dérivés de PEG sont greffés sur l'alginate par l'EPFL.

Tout au long de ce manuscrit, le même code couleur, représenté en Figure 51, sera utilisé pour présenter les résultats obtenus avec les différents alginate.

SLG100	1%	2%	3%	4%
Système A	1%	2%	3%	4%
Système C	1%	2%	3%	4%
Alginate-Kétoprofène	1%	2%	3%	4%

→
Concentration

Figure 51 : Code couleur utilisé tout au long de cette thèse pour représenter les résultats obtenus pour les différents alginate

1.1.1 Synthèse des dérivés de PEG

1.1.1.1 Synthèse du PEG-SH

La synthèse du dérivé PEG-SH suit de nombreuses étapes, décrites dans les Figure 52 et Figure 53. Il faut tout d'abord synthétiser l'intermédiaire réactionnel azide-PEG-amine, à partir du PEG, selon le protocole décrit en Figure 52.

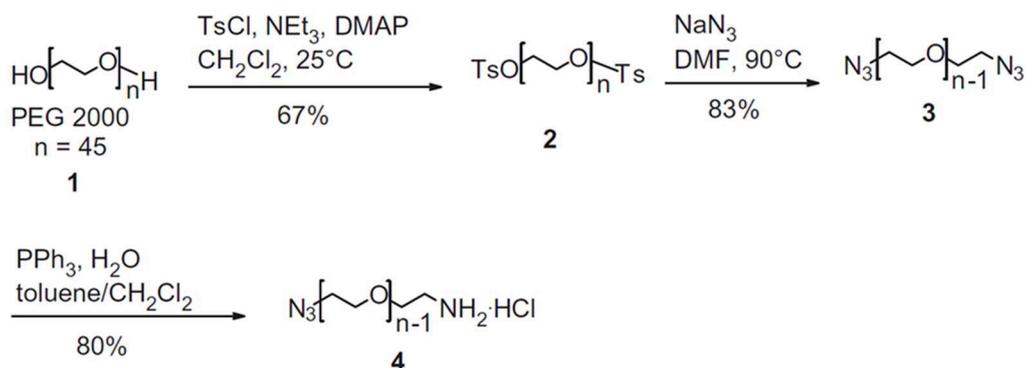


Figure 52 : Premières étapes de synthèse du PEG-SH : synthèse de l'intermédiaire réactionnel azide-PEG-amine³⁰⁵

Pour cela, le PEG (composé **1**) subit tout d'abord une ditosylation, dans les conditions décrites en Figure 52, permettant d'obtenir le composé **2**. Ce composé est ensuite filtré sur gel de silice, et les fonctions tosyloxy sont remplacées par des fonctions azoture de sodium par substitution nucléophile, permettant d'obtenir ainsi le composé **3**. Ce composé subit ensuite une monoréduction afin de supprimer la symétrie, et l'ajout d'un équivalent de triphénylphosphine et milieu acide permet d'obtenir le composé **4**. Pour plus de détails, il est possible de se référer à la publication de Passemard *et al.*³⁰⁵

Une fois cet intermédiaire réactionnel obtenu, les étapes décrites en Figure 53 peuvent être suivies. Pour un équivalent de azide-PEG-amine, on ajoute 3 équivalents de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDCI), 3 équivalents de Triéthylamine (NEt_3) et 2 équivalents de composé **2** (synthétisé au préalable, selon le protocole décrit dans la publication de Passemard *et al.*³⁰⁶), dans du dichlorométhane (DCM). Le mélange réactionnel est agité pendant 24 heures à température ambiante, puis lavé avec une solution de chlorure d'ammonium (NH_4Cl), et une solution saturée de bicarbonate de sodium (NaHCO_3). La phase organique est séchée et concentrée à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le produit est ensuite purifié par Flashchromatographie sur gel de silice. On obtient ainsi les composés **3a** et **3b** (voir Figure 53).

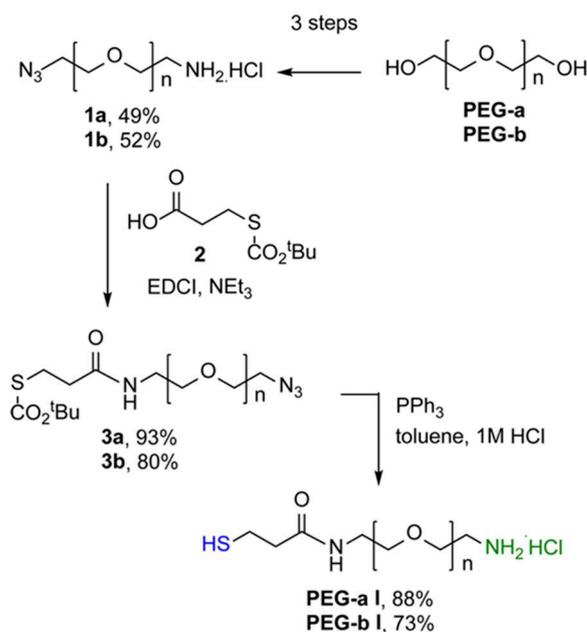


Figure 53 : Protocole de synthèse du dérivé PEG-SH³⁰⁶

Enfin, afin d'obtenir le dérivé PEG-SH, 1 équivalent de composé 3a ou 3b est mis en solution dans du toluène, 1,8 équivalents de Triphénylphosphine (PPh_3) sont ajoutés, et le mélange est agité pendant 30 minutes à température ambiante. Une solution à 1 M d'acide chlorhydrique (HCl) est ensuite ajoutée, tout en maintenant l'agitation pendant 48 heures à température ambiante. Les deux phases sont alors séparées et la phase organique est lavée avec une solution à 1 M de HCl, les phases aqueuses sont lavées avec du DCM avant d'être concentrées à l'évaporateur rotatif. Après coévaporation avec du toluène, on obtient le dérivé PEG-SH (composés PEG-a-I et PEG-b-I sur la Figure 53).

1.1.1.2 Synthèse du PEG-Kétoprofène

La synthèse du dérivé PEG-Ketoprofen s'effectue dans les conditions décrites en Figure 54, et plus précisément dans la publication de Noverraz *et al.*³⁰⁸ Le composé utilisé au départ est un dérivé de PEG, où une extrémité est constituée d'un groupement NH ou OH, et l'autre d'un groupement NH protégé par un tert-butoxycarbonile (Boc). Cette protection permet par la suite de greffer le kétoprofène par estérification uniquement sur l'extrémité composée du groupe fonctionnel OH ou NH. Un traitement en conditions acides est ensuite effectué pour retirer la protection tert-butoxycarbonile, et le PEG-kétoprofène est ainsi obtenu.

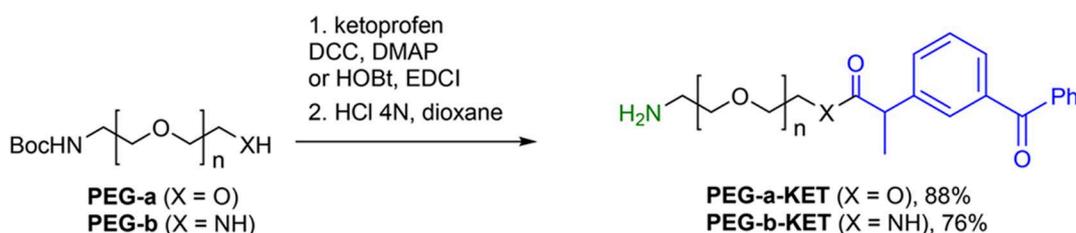


Figure 54 : Protocole de synthèse du dérivé PEG-Ketoprofen³⁰⁸

Après différents tests, la méthode retenue par l'EPFL est l'utilisation uniquement du composé de départ ayant un groupement OH en extrémité.

1.1.2 Greffage des dérivés de PEG sur l'alginate

Pour greffer différents groupes fonctionnels sur les chaînes carbonées de l'alginate, de nombreuses équipes utilisent la réactivité des groupements carboxyliques de l'alginate (voir Figure 55). Cependant, ces groupements sont essentiels à la gélification ionique de ce dernier, puisque c'est à leur niveau que se forment les liaisons ioniques au sein de la « boîte à œufs » (voir Etat de l'art). Il a donc été décidé de greffer les chaînes de PEG sur les groupes hydroxyles de l'alginate, même s'ils sont plus difficiles à modifier chimiquement. Cela permet de maintenir les groupements carboxyliques libres pour la formation des boîtes à œufs, et ainsi d'avoir une gélification double avec la formation des liaisons ioniques et des liaisons covalentes.

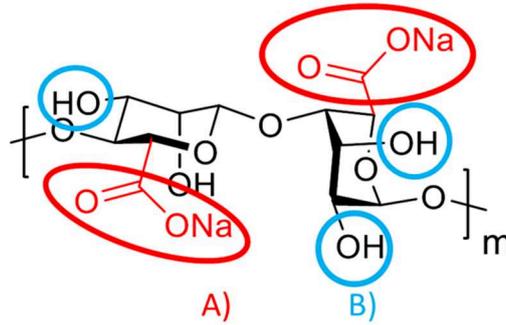


Figure 55 : Groupements fonctionnels de l'alginate : A) Groupement carboxylique, essentiel pour la gélification ionique avec la formation de boîtes à œufs ; B) Groupement hydroxyle, utilisé pour le greffage des chaînes de PEG

Le greffage des dérivés de PEG sur le groupement hydroxyle de l'alginate peut se séparer en deux principales étapes : la protection des groupements carboxyliques de l'alginate, puis le greffage des dérivés de PEG et la déprotection des groupements carboxyliques. En effet, il est nécessaire, dans un premier temps, de bloquer l'accès aux groupements carboxyliques afin de forcer la réaction de greffage préférentiellement sur les groupements hydroxyles. Pour cela, de l'Hydroxyde de Tétrabutylammonium (TBAOH) est utilisé (voir Figure 56). Le TétrabutylAmmonium (TBA) se fixe sur les groupements carboxyliques de l'alginate, les rendant non réactifs. Par la suite, les dérivés de PEG peuvent ainsi être greffés, avant d'enlever le TBA des extrémités carboxyliques grâce à du Tris(2-carboxyéthyl(phosphine)) (TCEP).

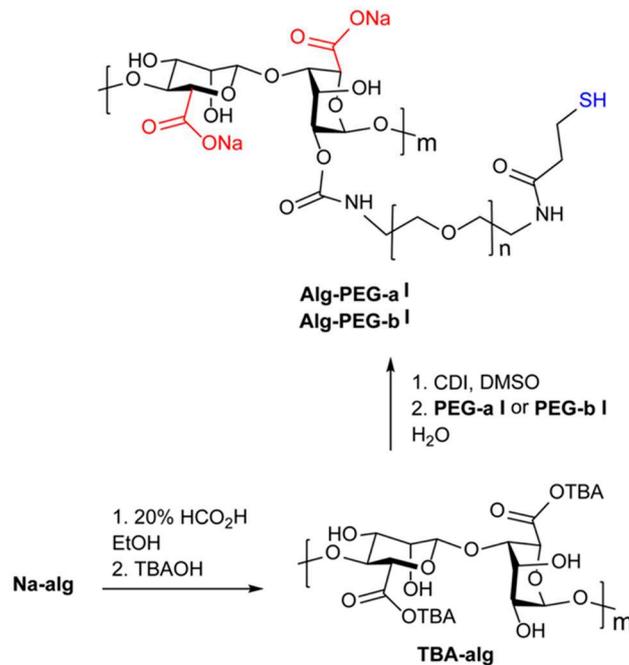


Figure 56 : Mécanisme réactionnel de greffage des dérivés de PEG sur l'alginate³⁰⁶

Pour la première étape (protection de l'alginate avec le TBAOH), l'alginate est solubilisé dans de l'éthanol, puis refroidi à 0°C. La poudre obtenue est ensuite filtrée et nettoyée avec un mélange

eau/éthanol, puis avec de l'acétone. Le solide obtenu est ensuite séché sous vide à 40°C, puis solubilisé dans de l'eau. Enfin, le TBAOH est ajouté goutte à goutte jusqu'à obtenir un pH neutre, et la solution est directement lyophilisée.

Pour la deuxième étape, l'alginate-TBA est dissous dans du Diméthylsulfoxyde (DMSO), et laissé à agiter pendant 12h. Du Carbonyldiimidazole (CDI), précédemment dissout dans du DMSO, est ensuite ajouté, et la solution est agitée à température ambiante pendant 30 minutes. De l'acétone est ensuite ajouté afin d'enclencher la précipitation de l'intermédiaire de réaction alginate-imidazole. Le précipité obtenu est filtré et nettoyé à l'acétone. Le solide est séché de nouveau pendant 15 minutes sous vide à 40°C, puis transféré dans un ballon en verre. De l'eau distillée est ensuite ajoutée, et le mélange est laissé à agiter jusqu'à dissolution complète. Le dérivé de PEG synthétisé précédemment est ensuite dissout dans un peu d'eau, et ajouté au mélange. La solution est agitée à température ambiante pendant 2 heures. La réaction est ensuite stoppée par addition d'Hydroxide de Sodium, jusqu'à obtenir un pH de 11. La solution est alors transférée dans une membrane de dialyse, et dialysée dans de l'eau distillée. Le premier jour, l'eau est changée une première fois, puis un second changement d'eau est effectué, avec ajout de Tris(2-carboxyéthyl(phosphine)) (TCEP) au préalable dans le tube de dialyse. La dialyse est continuée pendant deux jours supplémentaires, avec un ajout de TCEP supplémentaire le premier jour, et dialyse dans de l'eau distillée changée trois fois le second jour. Le dernier jour de dialyse, du carbonate de sodium est ajouté dans le récipient, afin de rétablir un pH de 7. La solution est ensuite filtrée et lyophilisée, afin d'obtenir l'alginate PEGylé sous forme solide.

Le CDI utilisé dans l'étape de greffage des dérivés PEG sur l'alginate-TBA donne un sous-produit basique : l'imidazole. L'alginate étant donc en conditions basiques, cela peut avoir pour conséquence de dégrader les chaînes et réduire leur longueur, et par conséquent modifier les propriétés rhéologiques du produit obtenu. Afin de neutraliser ce sous-produit, il est possible d'ajouter un équivalent d'acide, et donc éviter d'être en condition basique, et ainsi maintenir la longueur des chaînes. Ainsi, afin d'obtenir un polymère aux chaînes plus longues, 1 équivalent d'acide acétique est ajouté avant l'ajoute de CDI³⁰⁷. Selon le protocole utilisé (avec ajout d'acide ou non), le polymère obtenu n'a donc normalement pas la même longueur de chaînes, et par conséquent pas les mêmes propriétés rhéologiques.

Pour plus de détails sur les conditions expérimentales de synthèse de ces alginates PEGylés, il est possible de se référer aux publications de Passemard *et al.*^{305,306}, Szabó *et al.*³⁰⁷, et Noverraz *et al.*³⁰⁸ Comme cela a été montré, il existe de nombreuses étapes, et plusieurs paramètres pouvant avoir un impact pour une application d'encapsulation de cellules. Tout d'abord, dans les étapes de synthèse, de nombreux solvant organiques néfastes pour les cellules sont utilisés. L'étape de purification est donc essentielle, et il est très important de caractériser la pureté du polymère final obtenu. Ensuite, les synthèses présentant de nombreuses étapes, il est très difficile d'être parfaitement reproductible d'un lot à l'autre. Par conséquent, les pourcentages de greffage, ainsi que les propriétés physico-chimiques des alginates obtenus sont souvent différents. Cela peut influencer sur les propriétés rhéologiques des polymères. En effet, le protocole de synthèse peut influencer sur la longueur des chaînes, cette dernière ayant un effet direct sur les propriétés rhéologiques du polymère. Dans notre application, ces paramètres sont importants car par exemple, un polymère très visqueux sera plus difficile à mélanger avec les cellules et cette étape pourra donc avoir plus d'impact sur leur viabilité. De plus, les propriétés rhéologiques régissent la déformation et l'écoulement du polymère sous l'effet d'une contrainte, et sont donc également critiques pour son utilisation en système microfluidique. Ces différents paramètres ont donc été caractérisés, et les résultats obtenus sont présentés par la suite.

2. Caractérisation des alginates

2.1 Rhéologie

Lors de l'utilisation des biopolymères en microfluidique, ces derniers sont soumis à une contrainte et à un cisaillement afin de déplacer les fluides, particulièrement lors de la formation de la goutte. Il est donc important de caractériser le cisaillement présent dans le système (cela sera effectué dans le chapitre Encapsulation), et l'influence de ce cisaillement sur les polymères. L'étude de la déformation et l'écoulement d'un matériau sous l'effet d'une contrainte est, comme expliqué précédemment, l'étude des propriétés rhéologiques.

Ce type d'étude consiste donc principalement à appliquer un cisaillement au matériau sous différentes formes (en contrôle de la contrainte ou du taux de cisaillement, avec une application de cisaillement constant ou en oscillation etc), et à mesurer différentes grandeurs comme la viscosité, la contrainte de cisaillement ou le taux de cisaillement, qui sont définies par la suite.

La Figure 57 présente le fonctionnement de l'application d'un cisaillement à un échantillon situé entre deux plaques parallèles, et la Figure 58 présente les grandeurs du système à partir desquelles seront calculées les paramètres caractéristiques pour ce modèle, comme la contrainte de cisaillement et le taux de cisaillement



Figure 57 : Modèle plan-plan pour les mesures de rhéologie : le cisaillement est appliqué à l'échantillon qui est entre les deux plateaux, lorsque celui du haut est en mouvement. Le plateau du bas reste fixe. Les figures représentent une illustration des couches planes du fluide, qui se déplacent les unes par rapport aux autres³¹⁰.

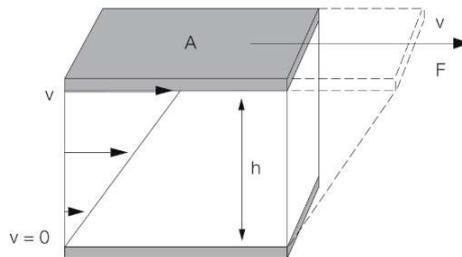


Figure 58 : Grandeurs utiles pour calculer la contrainte de cisaillement et le taux de cisaillement : A est l'aire de cisaillement; h est l'écart entre les deux plateaux ; F est la force de cisaillement; et v est la vitesse³¹⁰.

La contrainte de cisaillement τ est la contrainte mécanique appliquée au fluide, représentée par l'équation (4), où F est la force de cisaillement (en N), A est l'aire de cisaillement (en m²), et τ est en N/m², soit en Pa. Elle est mesurée par le rhéomètre en chaque point.

$$\tau = \frac{F}{A} \quad (4)$$

Le taux de cisaillement, ou vitesse de cisaillement $\dot{\gamma}$ décrit la variation spatiale de la vitesse d'écoulement et est définie par l'équation (5), où v est la vitesse (en m/s), h est l'écart entre les plateaux (en m), et $\dot{\gamma}$ est en s^{-1} . Il est également mesuré par le rhéomètre en chaque point.

$$\dot{\gamma} = \frac{v}{h} \quad (5)$$

On obtient alors la viscosité dynamique η , qui représente la résistance des molécules du matériau au mouvement imposé par le cisaillement, grâce à l'équation (6), où η est en Pa.s :

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \quad (6)$$

Ce type d'étude permet ainsi de déterminer le comportement d'un fluide lorsqu'il subit une contrainte ou un taux de cisaillement, et en particulier si ce fluide est :

- **Newtonien** : la contrainte de cisaillement évolue linéairement par rapport au taux de cisaillement, et la viscosité du fluide est le rapport de proportionnalité entre les deux. Cette viscosité est donc constante et ne dépend pas de la contrainte ou du taux de cisaillement appliqués au fluide.
- **Non Newtonien** : la contrainte de cisaillement n'est pas une fonction linéaire du taux de cisaillement, et la viscosité du fluide évolue donc en fonction de la contrainte ou du taux de cisaillement qui lui est appliquée. On exprime alors η et τ en fonction de $\dot{\gamma}$ dans le cas d'un taux de cisaillement appliqué, comme dans l'équation (7) ; ou η et $\dot{\gamma}$ en fonction de τ , dans le cas d'une contrainte de cisaillement appliquée, comme dans l'équation (8) :

$$\eta(\dot{\gamma}) = \frac{\tau(\dot{\gamma})}{\dot{\gamma}} \quad (7)$$

$$\eta(\tau) = \frac{\tau}{\dot{\gamma}(\tau)} \quad (8)$$

Parmi les fluides non Newtoniens, il existe principalement 2 catégories :

- Les fluides rhéofluidifiants, pour lesquels la viscosité diminue lorsqu'un cisaillement leur est appliqué
- Les fluides rhéoépaississants, pour lesquels la viscosité augmente lorsqu'un cisaillement leur est appliqué. Pour les différents types de fluides, ces comportements rhéologiques peuvent survenir dès l'application du cisaillement, c'est le cas des fluides sans seuil ; ou bien uniquement lorsque le cisaillement appliqué dépasse une valeur seuil, c'est le cas des fluides à seuil. Ces derniers seront présentés un peu plus en détails par la suite.

Dans le cadre de la formation de gouttes en microfluidique, il a déjà été établi et présenté dans le chapitre Etat de l'art que les paramètres importants sont principalement les rapports de débits, la viscosité et la tension de surface des fluides. D'après différentes études, s'ajoutent à ces paramètres le caractère rhéofluidifiant et les propriétés viscoélastiques de la phase dispersée, qui ont un effet sur la fréquence de génération de gouttes, leur taille, ainsi que la présence de gouttes satellites.³¹¹⁻³¹⁵

En ce qui concerne la fréquence de génération de gouttes, Wong *et al.*³¹⁶ ont étudié l'effet de la viscosité et du caractère rhéofluidifiant sur la formation de gouttes de carboxyméthylcellulose de sodium. Ils ont démontré que l'augmentation de la viscosité et du caractère rhéofluidifiant augmentent le temps nécessaire pour la formation d'une goutte. Cela a pour conséquence de réduire la fréquence de génération de gouttes.

Par ailleurs, il a été démontré que l'élasticité d'un fluide (qui dépend de la capacité d'étirement de ses chaînes) entraîne la formation de gouttes satellites, ainsi que des filaments entre les gouttes, dont la taille augmente avec le caractère élastique du fluide.^{311,313,314,316} La formation de ces filaments entre les gouttes augmente le temps nécessaire à la formation des gouttes. La fréquence de génération de gouttes diminue donc lorsque l'élasticité augmente.

Enfin, il a également été démontré que plus un fluide est visqueux, rhéofluidifiant, ou élastique, plus la taille des gouttes formées est importante^{316,317}.

Il est donc essentiel de caractériser les propriétés rhéologiques de la phase dispersée afin de comprendre et contrôler plus précisément la formation de gouttes en microfluidique, et ainsi optimiser les propriétés des capsules obtenues dans le cadre d'une application en thérapie cellulaire.

Pour déterminer ces propriétés, il existe différents appareils et tests rhéologiques. Dans le cadre de cette thèse, un rhéomètre cône-plan Malvern a été utilisé, selon le protocole décrit dans le Matériel et Méthodes. Les tests réalisés ont été : tout d'abord, l'application d'une gamme de cisaillement allant de 0,1 s⁻¹ à 1000 s⁻¹. Ce test permet de déterminer l'évolution de la contrainte et de la viscosité au cours du cisaillement, et ainsi de déterminer les grandeurs caractéristiques du polymère comme l'indice d'écoulement, l'indice de consistance et le temps de relaxation. Ces différents paramètres donnent des informations sur le comportement des fluides (Newtonien, non Newtonien et degré de rhéofluidification ou rhéoépaississement) en fonction du cisaillement. Un deuxième test a ensuite été effectué : l'application d'une déformation fixe dans la zone linéaire de viscoélasticité, en oscillation avec un balayage en fréquence. Ce test permet de déterminer les modules élastiques et visqueux d'un polymère, et d'en déduire son comportement viscoélastique.

2.1.1 Viscosité et contrainte de cisaillement en fonction du taux de cisaillement

Dans le premier test effectué, une gamme de taux de cisaillement $\dot{\gamma}$ allant de 0,1 s⁻¹ à 1000 s⁻¹ est donc appliquée sur le polymère. Différents paramètres sont alors mesurés, et en particulier la contrainte de cisaillement τ , et la viscosité dynamique η . Dans la suite de ce chapitre, lorsque la viscosité est évoquée, cela fait référence à la viscosité dynamique (sauf précision contraire).

Il existe différents modèles théoriques de comportement des fluides. L'utilisation du bon modèle, qui est au plus proche des résultats obtenus, permet de déterminer des grandeurs caractéristiques du fluide, et ainsi de mieux comprendre son comportement. Les principaux modèles utilisés dans la littérature sont les suivants :

- **Loi d'Ostwald-de-Waele** (ou loi en puissance) : modèle mathématique simple, permettant de modéliser facilement la zone rhéofluidifiante ou rhéoépaississante d'un fluide sans seuil, en reliant la contrainte de cisaillement au taux de cisaillement, selon l'équation (9), où τ est la contrainte de cisaillement (Pa) ; $\dot{\gamma}$ est le taux de cisaillement (s⁻¹) ; k est l'indice de consistance (Pa) ; et n est l'indice d'écoulement (constante sans dimension).

$$\tau = k\dot{\gamma}^n \quad (9)$$

- **Modèle de Bingham** : ce modèle est adapté aux fluides à seuil viscoplastiques, qui ont un comportement de solide parfait sous faibles contraintes, et un comportement de fluide visqueux Newtonien au-delà d'une contrainte seuil. Il relie la contrainte de cisaillement au

taux de cisaillement selon l'équation (10), où τ est la contrainte de cisaillement (Pa) ; $\dot{\gamma}$ est le taux de cisaillement (s^{-1}) ; et η_B et τ_{0B} sont les constantes caractéristiques du fluide : η_B est la viscosité plastique de Bingham (Pa.s), et τ_{0B} est la contrainte seuil de Bingham (Pa).

$$\tau = \tau_{0B} + \eta_B \dot{\gamma} \quad (10)$$

- **Modèle de Herschel-Bulkley** : ce modèle est également adapté aux fluides à seuil : tout comme pour le modèle de Bingham, le fluide a un comportement de type solide parfait sous faibles contraintes, mais au-delà de la contrainte seuil, son comportement est de type visqueux non Newtonien. Il peut être défini comme une combinaison du modèle de Bingham et de la loi d'Ostwald-de-Waele. Il relie également la contrainte de cisaillement au taux de cisaillement, selon l'équation (11), où τ est la contrainte de cisaillement (Pa) ; $\dot{\gamma}$ est le taux de cisaillement (s^{-1}) ; τ_{0H} est la contrainte seuil de Herschel-Bulkley (Pa) ; k_H est l'indice de consistance (Pa) ; et n_H est l'indice d'écoulement, qu'on retrouve dans la loi en puissance (constante sans dimension).

$$\tau = \tau_{0H} + k_H (\dot{\gamma})^{n_H} \quad (11)$$

- **Loi de Carreau-Yasuda** : cette loi permet de décrire précisément la viscosité apparente d'un fluide sans seuil Newtonien ou non-Newtonien (selon les valeurs des paramètres). Elle lie la viscosité en fonction du taux de cisaillement, et permet l'ajustement d'un rhéogramme sur toute la gamme de cisaillement. Elle est définie par l'équation (12), où η est la viscosité (Pa.s) ; $\dot{\gamma}$ est le taux de cisaillement (s^{-1}) ; λ et n sont des constantes propres au fluide ; η_0 est la viscosité pour un taux de cisaillement nul (Pa.s) ; et η_∞ est l'asymptote de la viscosité pour un taux de cisaillement très élevé (Pa.s).

$$\eta = \eta_\infty + (\eta_0 - \eta_\infty) [1 + (\lambda \dot{\gamma})^a]^{\frac{n-1}{a}} \quad (12)$$

- **Modèle de Cross** : ce modèle est une variante simplifiée du modèle de Carreau-Yasuda (cas particulier avec $a=m$ et $m=n-1$), également proche de la loi en puissance d'Ostwald-de-Waele mais plus précis. Il permet de décrire les fluides sans seuil newtoniens ou non Newtoniens, rhéofluidifiants ou rhéoépaississants (selon les valeurs des paramètres), sur toute la gamme de cisaillement, comme la loi de Carreau-Yasuda. Il relie la viscosité au taux de cisaillement, selon l'équation (13), où η est la viscosité (Pa.s) ; $\dot{\gamma}$ est le taux de cisaillement (s^{-1}) ; α et m sont des constantes propres au fluide ; η_0 est la viscosité pour un taux de cisaillement nul (Pa.s) ; et η_∞ est l'asymptote viscosité pour un taux de cisaillement très élevé (Pa.s).

$$\eta = \eta_\infty + \frac{\eta_0 - \eta_\infty}{1 + (\alpha \dot{\gamma})^m} \quad (13)$$

Afin d'interpréter les résultats obtenus sur les polymères caractérisés, il a donc été décidé d'appliquer tout d'abord la **loi d'Ostwald-de-Waele**, pour avoir un premier aperçu du type de comportement des fluides. Cette loi présente l'avantage de modéliser de manière facile et précise le caractère rhéofluidifiant ou rhéoépaississant d'un fluide, cependant, elle modélise **uniquement les zones rhéofluidifiantes ou rhéoépaississantes**, et ne prend pas en compte les plateaux Newtoniens, elle n'est donc pas suffisante pour connaître le comportement du fluide sur la gamme entière de taux de cisaillement.

Les résultats obtenus avec la loi d'Ostwald-de-Waele seront donc complétés par une modélisation avec les modèles de **Cross** ou de **Carreau-Yasuda**, pour avoir des **informations plus précises**

sur les propriétés des fluides, ainsi qu'une modélisation de la viscosité sur la **totalité de la gamme de cisaillement** étudiée (elles permettront ainsi de prédire une valeur de viscosité pour n'importe quel taux de cisaillement).

Pour utiliser la loi d'Ostwald-de-Waele, on applique tout d'abord le logarithme sur l'équation (9), on obtient alors l'équation suivante :

$$\log(\tau) = \log(k) + n \log(\dot{\gamma}) \quad (14)$$

Ainsi, en traçant le logarithme des valeurs de contrainte de cisaillement en fonction du logarithme des valeurs de taux de cisaillement, on obtient des courbes sur lesquelles une régression linéaire donne les valeurs des indices k et n .

Cette loi nous permet ainsi de déterminer les paramètres suivants :

- L'indice k qui est l'**indice de consistance**, il témoigne de la viscosité du fluide. En effet, k est égal à la valeur de la viscosité lorsque le cisaillement est de 1 s^{-1} .
- L'indice n qui est l'**indice d'écoulement**. Ce dernier détermine si le fluide est Newtonien ou non Newtonien :
 - Si $n = 1$, le fluide est Newtonien
 - Si $n < 1$, le fluide est rhéofluidifiant
 - Si $n > 1$, le fluide est rhéoépaississant.

La valeur de n détermine également le degré de rhéofluidification ou rhéoépaississement : plus la valeur est éloignée de 1, plus le caractère rhéofluidifiant ou rhéoépaississant est prononcé³¹⁸.

Concernant l'utilisation des modèles de Cross ou Carreau-Yasuda, la méthode utilisée pour ajuster les modèles sur les résultats expérimentaux est l'approximation non-linéaire par moindres carrés. Pour cela, les valeurs de viscosités sont calculées avec les équations (12) et (13), en utilisant des paramètres de départ choisis manuellement. L'erreur, représentée par le carré de la différence entre les valeurs prédites par les modèles et les valeurs expérimentales, est calculée en chaque point. Puis la somme des erreurs est minimisée en ajustant les paramètres. On obtient les valeurs des paramètres de chaque modèle lorsque cette somme des erreurs est minimale.

Les paramètres obtenus avec les modèles de Cross et de Carreau-Yasuda sont les suivants :

- L'indice sans dimension m , qui est défini par $m = 1 - n$. Par conséquent, m définit également le caractère Newtonien ou non Newtonien du polymère : le polymère est Newtonien si $m = 0$, rhéofluidifiant si $0 < m < 1$, et rhéoépaississant si $m < 0$. Le caractère rhéofluidifiant est plus prononcé pour une valeur de m proche de 1.
- La **viscosité à cisaillement nul** η_0 : c'est la viscosité au cisaillement le plus faible, soit finalement la viscosité du composé au repos.
- La **viscosité à cisaillement infini** η_∞ : c'est l'asymptote de la viscosité pour un cisaillement très élevé.
- La **constante de temps α ou λ** qui définit le temps de relaxation du polymère
- A partir de ce dernier paramètre, on peut obtenir le **cisaillement critique** $\dot{\gamma}_C$ par la relation suivante : $\dot{\gamma}_C = \frac{1}{\alpha}$: ce cisaillement critique est le cisaillement à partir duquel les chaînes de polymère n'ont plus le temps de reprendre leur conformation d'équilibre, et s'alignent donc en suivant le flux. C'est donc le cisaillement à partir duquel le polymère passe d'un domaine Newtonien à un domaine non Newtonien.

Après modélisation avec les modèles de Cross et de Carreau-Yasuda, les valeurs des constantes obtenues pour les deux modèles sont données, ainsi que la somme des erreurs.

Concernant l'analyse des résultats obtenus, le caractère rhéofluidifiant sera étudié à partir des indices d'écoulement obtenus avec la loi d'Ostwald-de-Waele (qui modélise plus précisément ce phénomène), et les autres paramètres étudiés seront ceux obtenus avec le modèle de Cross ou Carreau-Yasuda.

2.1.1.1 Influence de la concentration

Il a tout d'abord été décidé de s'intéresser à l'influence de la concentration de l'alginate sur son comportement rhéologique. Pour cela, les mesures rhéologiques décrites précédemment ont été effectuées sur des alginates de référence SLG100 dont la concentration varie de 1% à 4% massique.

La Figure 59 rassemble les courbes des logarithmes des contraintes de cisaillement en fonction des logarithmes du taux de cisaillement pour les différentes concentrations d'alginate SLG100, ainsi que les régressions linéaires, et l'aperçu de ces mêmes courbes en échelle normale sur le coin supérieur du graphique. Les régressions linéaires ont permis d'obtenir les indices d'écoulement n et de consistance k (calculé à partir de $\log(k)$) de la loi d'Ostwald de Waele, qui sont rassemblés dans le Tableau 10.

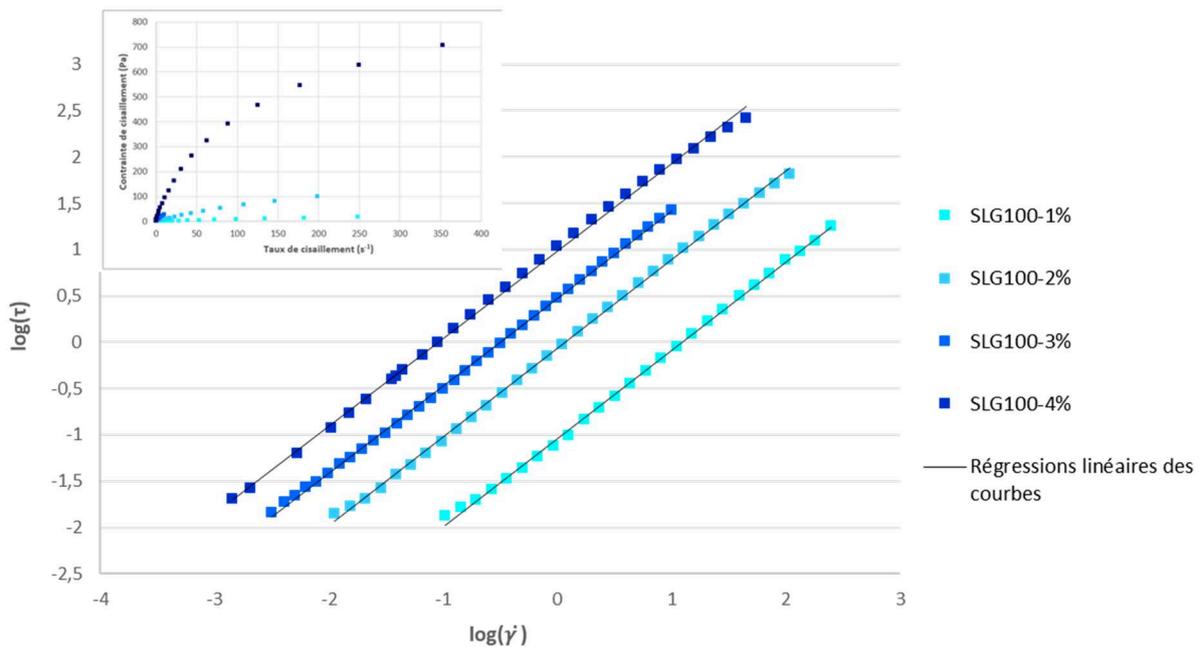


Figure 59 : Etude de l'influence de la concentration sur le comportement rhéologique de l'alginate de référence SLG100, à l'aide de la loi d'Ostwald-de-Waele ; le graphique dans le coin supérieur représente la contrainte de cisaillement en fonction du taux de cisaillement, en échelle non logarithmique

Polymère	n	$\log(k)$	k	R^2
SLG100-1%	0,952	-1,042	0,091	0,999
SLG100-2%	0,958	-0,070	0,851	0,999
SLG100-3%	0,945	0,473	2,972	0,999
SLG100-4%	0,945	0,986	9,683	0,999

Tableau 10 : Valeurs obtenues pour les indices de consistance et d'écoulement avec le fit par la loi d'Ostwald-de-Waele uniquement sur les parties rhéofluidifiantes des rhéogrammes

Dans la gamme de cisaillement étudiée, les modèles de Cross et de Carreau-Yasuda ajustent aussi bien les courbes expérimentales. Cependant, les valeurs des indices obtenus, et en particulier celles de la viscosité à cisaillement nul sont aberrantes pour le modèle de Carreau-Yasuda (Tableau 11). Le modèle gardé est donc celui de Cross.

La Figure 60 rassemble donc les courbes de viscosité dynamique en fonction du taux de cisaillement, en échelle logarithmique, ajustées par le modèle de Cross. Les valeurs des paramètres obtenues sont rassemblées dans le Tableau 12.

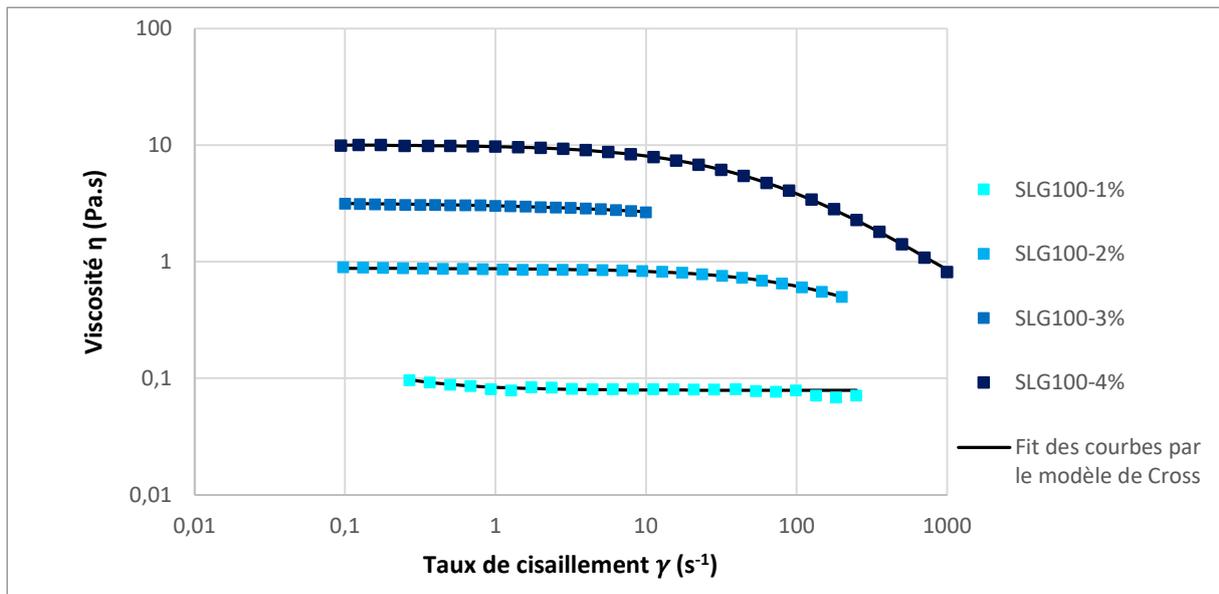


Figure 60 : Influence de la concentration sur le comportement rhéologique des alginate - Utilisation du modèle de Cross

Polymère	n	a	η_0 (Pa.s)	η_∞ (Pa.s)	λ	$\dot{\gamma}_c$ (s ⁻¹)	Erreur
SLG100-1%	2,681.10 ⁻⁵	0,433	4,458.10 ¹²	7,877.10 ⁻²	7,839.10 ¹⁴	1,276.10 ⁻¹⁵	6,83.10 ⁻⁴
SLG100-2%	0	0,810	0,880	0	2,558.10 ⁻³	390,980	1,261.10 ⁻³
SLG100-3%	0,932	0,003	2,549.10 ⁸	0,083	0,364	2,747	6,296.10 ⁻²
SLG100-4%	0,206	0,838	10,060	0	0,020	50,291	4,846.10 ⁻²

Tableau 11 : Valeurs des paramètres obtenues avec le modèle de Carreau-Yasuda pour les alginate de référence SLG100 à différentes concentrations

Polymère	m	η_0 (Pa.s)	η_∞ (Pa.s)	α	$\dot{\gamma}_c$ (s ⁻¹)	Erreur
SLG100-1%	0,102	0,143	0	3,521.10 ³	284,021	1,81.10 ⁻³
SLG100-2%	0,834	0,880	0	3,573.10 ⁻³	279,884	1,30.10 ⁻³
SLG100-3%	0,451	3,249	0	3,191.10 ⁻³	313,390	2,05.10 ⁻²
SLG100-4%	0,822	10,073	0	0,018	55,108	5,023.10 ⁻²

Tableau 12 : Valeurs des paramètres obtenues avec le modèle de Cross pour les alginate de référence SLG100 à différentes concentrations

Afin d'étudier le caractère rhéofluidifiant de ces alginates, les valeurs des indices d'écoulements obtenus avec le modèle d'Ostwald-de-Waele sont pris en considération (Tableau 10). Tout d'abord, pour tous les polymères, on a bien des coefficients de détermination R^2 supérieurs à 0,99, ce qui valide l'utilisation de la loi Ostwald-de-Waele. L'indice d'écoulement est toujours inférieur à 1, ce qui est caractéristique des fluides non Newtoniens rhéofluidifiants. Cela s'explique par le fait que lorsqu'un cisaillement est appliqué, les chaînes de polymère se désenchevêtrent partiellement, avant de s'orienter dans le sens du flux, réduisant ainsi la viscosité. Le caractère rhéofluidifiant de ces alginates est peu prononcé (indice proche de 1).

La valeur de l'indice d'écoulement n semble être peu impactée par la concentration des alginates. On peut cependant noter une légère diminution quand la concentration augmente, témoignant d'une augmentation du caractère rhéofluidifiant du polymère. Cela peut s'expliquer par le fait qu'un polymère plus concentré présente un enchevêtrement de chaînes plus important que pour un polymère peu concentré. Par conséquent, lorsqu'un cisaillement est appliqué et désenchevêtre les chaînes (entraînant une réduction de la viscosité), le différentiel de viscosité résultant sera plus important pour un polymère concentré que pour un polymère peu concentré. Ce résultat rejoint les résultats publiés par Ma *et al.*³¹⁸

La Figure 60 montre que l'alginate de référence SLG100 est rhéofluidifiant, mais que selon la concentration de polymère utilisée, et le taux de cisaillement appliqué, le polymère peut se comporter comme un fluide Newtonien (dans les gammes de cisaillement du plateau Newtonien), ou rhéofluidifiant.

Les analyses suivantes sont effectuées à partir des paramètres obtenus avec le modèle de Cross (Tableau 12). En accord avec la littérature (Gomez *et al.*³¹⁹ et Marcotte *et al.*³²⁰), on constate sans surprise que la viscosité à cisaillement nul augmente avec la concentration (Figure 60) (ce résultat est observable également au niveau des indices de consistance k obtenus avec le modèle d'Ostwald-de-Waele).

Le taux de cisaillement critique $\dot{\gamma}_c = \frac{1}{\alpha}$ à partir duquel le polymère est en régime rhéofluidifiant diminue lorsque la concentration augmente (temps de relaxation beaucoup plus grand). Cela signifie que le plateau Newtonien est plus étendu pour les viscosités faibles. Cette tendance n'est cependant pas observée pour la concentration de 3 %. Cela est dû à une erreur de mesure, qui a entraîné une réduction de la gamme de taux de cisaillement étudiée, faussant donc la valeur de taux de cisaillement critique calculée par le modèle.

Le temps de relaxation caractérise la mobilité des chaînes d'un polymère : un temps de relaxation faible est caractéristique de chaînes mobiles, qui reviennent donc rapidement à leur conformation d'équilibre. Un polymère plus concentré possède plus de chaînes, qui ont donc moins d'espace disponible et sont moins mobiles, et nécessitent plus de temps pour revenir à leur conformation d'équilibre. C'est la raison pour laquelle le SLG100-4% présente un temps de relaxation plus élevé : la présence d'un nombre plus élevé de chaînes réduit leur mobilité et le temps de relaxation du polymère, et par conséquent, le cisaillement critique à partir duquel les chaînes se réarrangent dans le sens du flux intervient plus tôt.

L'alginate de référence SLG100 est donc un polymère **non Newtonien rhéofluidifiant**, dont le caractère rhéofluidifiant augmente légèrement avec la concentration, et dont le temps de relaxation augmente également avec la concentration.

2.1.1.2 Comparaison entre les différents alginates

Par la suite, il a été décidé de comparer les comportements rhéologiques entre l’alginate de référence SLG100 et les différents alginates PEGylés. Ces mesures ont donc été effectuées sur de l’alginate de référence SLG100 à 2,5% massique, sur un autre alginate de référence SLM100 à 2,5% massique, ainsi que sur le Système A, Système C et Alginate-Ketoprofen (à 4% chacun).

Le choix des concentrations des polymères étudiés a été effectué en fonction des conditions expérimentales : ce sont les concentrations fixées pour les applications de formations de capsules et d’encapsulation d’îlots de Langerhans (car les paramètres de fonctionnement microfluidique avaient été fixé pour l’alginate de référence à cette concentration au préalable de la thèse, et les premiers essais de formation de capsules avec l’alginate Système A ont montré qu’une utilisation à une concentration de 4% donnait de meilleurs résultats).

La Figure 61 rassemble les courbes des logarithmes des contraintes de cisaillement en fonction des logarithmes du taux de cisaillement pour les différentes concentrations d’alginate SLG100, ainsi que les régressions linéaires ayant permis d’obtenir les indices d’écoulement n et de consistance k (calculé à partir de $\log(k)$) de la loi d’Ostwald de Waele, qui sont rassemblés dans le Tableau 13.

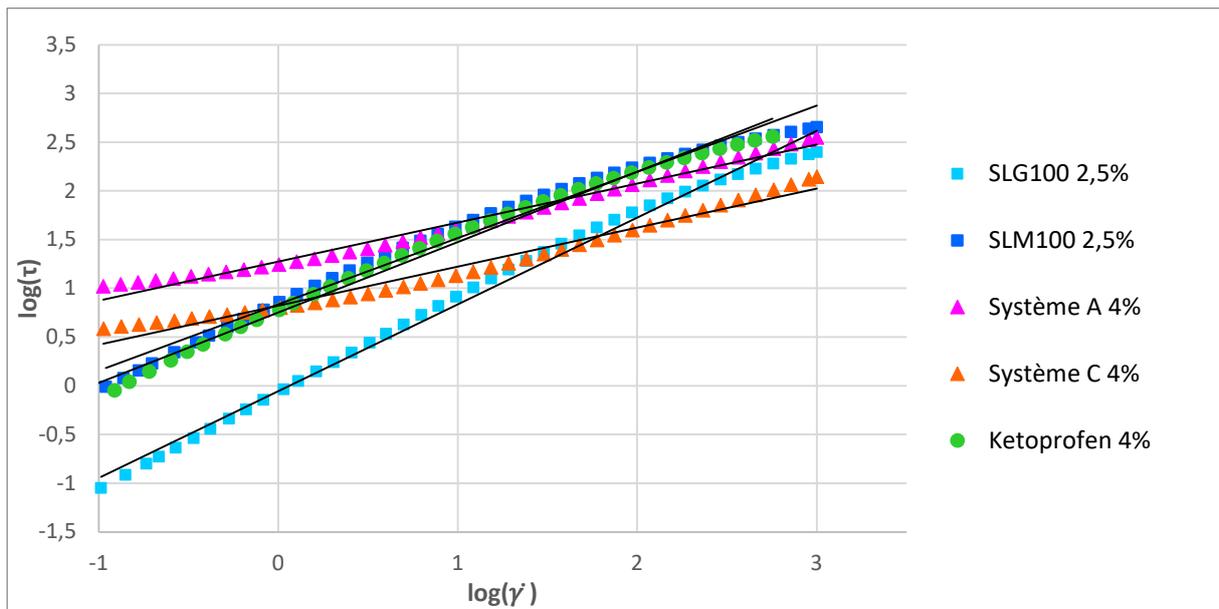


Figure 61 : Etude comparative des comportements rhéologiques des différents polymères à l'aide de la loi d'Ostwald-de-Waele

Polymère	n	log(k)	k	r ²
SLG100-2,5%	0,891	-0,054	0,884	0,993
SLM100-2,5%	0,681	0,837	6,869	0,982
Système A-4%	0,400	1,276	18,863	0,986
Système C-4%	0,401	0,823	6,645	0,976
Ketoprofen-4%	0,723	0,755	5,689	0,989

Tableau 13 : Valeurs obtenues avec la loi d'Ostwald-de-Waele pour les indices de consistance k et d'écoulement n des différents alginates

La Figure 62 présente les courbes de viscosité dynamique en fonction du taux de cisaillement, en échelle logarithmique, ajustées par le modèle de Carreau-Yasuda. Les valeurs des paramètres obtenues sont rassemblées dans le Tableau 14.

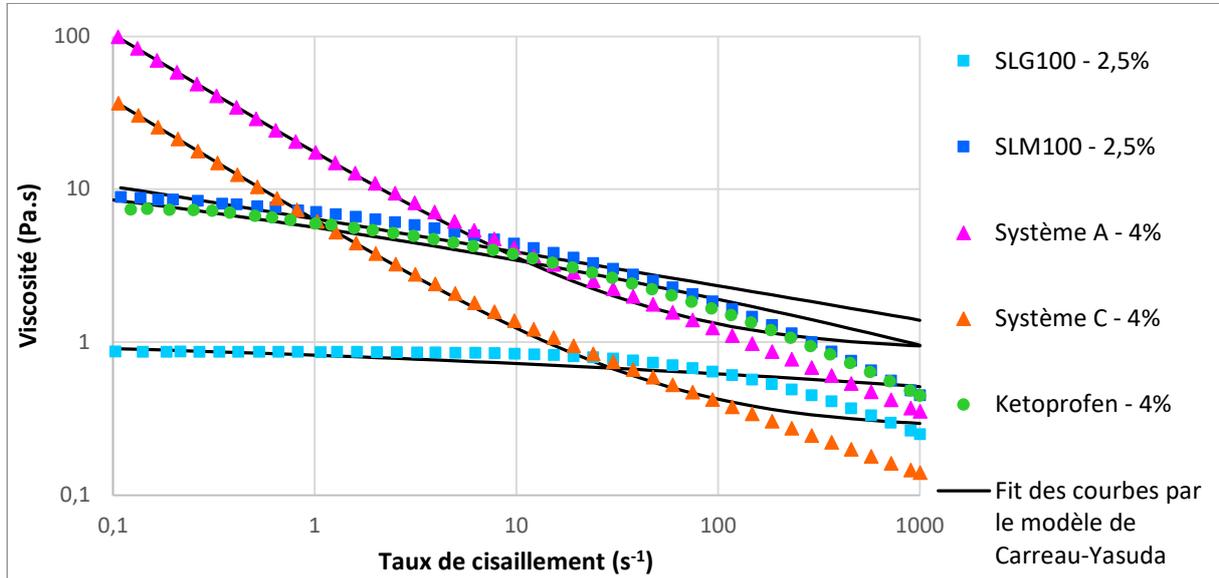


Figure 62 : Etude comparative des comportements rhéologiques des différents alginate à l'aide du modèle de Carreau-Yasuda

Polymère	n	a	η_0 (Pa.s)	η_∞ (Pa.s)	λ	$\dot{\gamma}_c$ (s ⁻¹)	Erreur
SLG100-2,5%	0,708	0,116	1,302	0	$1,018.10^{-6}$	$9,820.10^5$	$4,82.10^{-1}$
SLM100-2,5%	0,620	0,017	$1,245.10^9$	0	$7,984.10^6$	$1,253.10^{-7}$	19,6
Système A-4%	0,213	13,694	$1,908.10^4$	0,874	$7,691.10^3$	$1,3.10^{-4}$	5,93
Système C-4%	0,203	0,377	$1,175.10^{10}$	0,270	$4,546.10^{11}$	$2,200.10^{-12}$	$3,16.10^{-1}$
Ketoprofen-4%	0	0,097	53,280	0	$5,138.10^{-7}$	$1,946.10^6$	7,84

Tableau 14 : Valeurs des paramètres obtenues avec le modèle de Carreau-Yasuda pour les différents alginate

La Figure 63 rassemble les mêmes résultats, ajustés par le modèle de Cross. Les valeurs des paramètres sont rassemblées dans le Tableau 15.

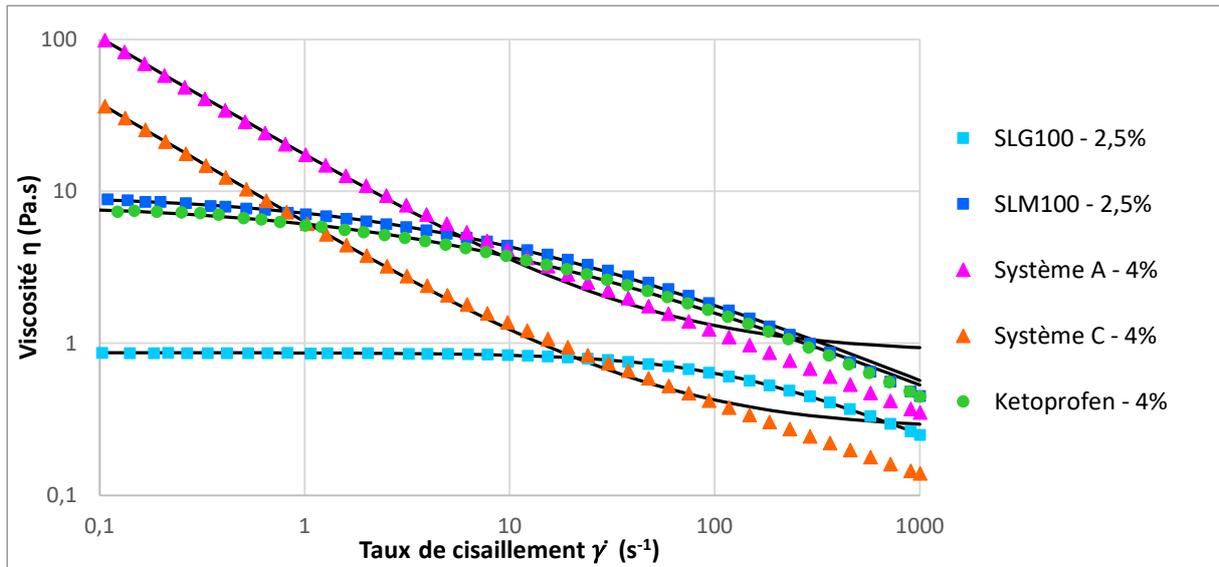


Figure 63 : Etude comparative des comportements rhéologiques des différents alginates à l'aide du modèle de Cross

Polymère	m	η_0 (Pa.s)	η_∞ (Pa.s)	α	$\dot{\gamma}_c$ (s ⁻¹)	Erreur
SLG100-2,5%	0,984	0,867	0,109	0,004	231,504	3,27.10 ⁻⁴
SLM100-2,5%	0,554	9,658	0	0,147	6,798	2,12.10 ⁻¹
Système A-4%	0,787	1,324.10 ⁶	0,864	1,688.10 ⁶	5,925.10 ⁻⁷	5,94
Système C-4%	0,797	8,264.10 ⁵	0,269	2,806.10 ⁶	3,564.10 ⁻⁷	3,16.10 ⁻¹
Ketoprofen-4%	0,533	8,351	0	0,153	6,517	3,63.10 ⁻¹

Tableau 15 : Valeurs des paramètres obtenues avec le modèle de Cross pour les différents alginates

Les Figures précédentes montrent que les polymères sont **tous non Newtoniens rhéofluidifiants**, mais présentent des comportements rhéologiques très différents. L'alginate-kétoprofène a un comportement rhéologique très proche de l'alginate de référence SLM100, mais les alginates Système A et Système C ont des comportements ne s'apparentant pas du tout aux alginates de référence dans la gamme de cisaillement étudiée. En effet, ces polymères présentent un comportement purement rhéofluidifiant, sans présence de plateau Newtonien, même à très faible cisaillement, où la viscosité augmente continuellement. Par conséquent, les ajustements des résultats expérimentaux par les modèles de Cross ou de Carreau-Yasuda ne fonctionnent pas (les modèles ajoutent un plateau en fin de gamme de cisaillement, qui n'existe pas expérimentalement). Les valeurs des paramètres obtenues avec ces modèles ne sont donc pas exploitables.

Le type de comportement des alginates Système A et Système C correspond aux fluides à seuil de type plastique, pour lesquels il est nécessaire d'appliquer une contrainte ou un cisaillement minimal avant d'obtenir un écoulement du fluide. Avant cette contrainte seuil, le polymère se comporte comme un solide et se déforme de manière élastique, et après cette contrainte, le polymère se comporte comme un fluide visqueux. Ces courbes doivent donc être modélisées par un des modèles adaptés aux fluides à seuil : le modèle de Bingham ou de Herschel-Bulkley. Ces modélisations seront présentées par la suite.

Afin d'étudier le caractère rhéofluidifiant des alginates de références et de l'Alginate-Kétoprofène dans un premier temps, les valeurs des indices d'écoulements obtenus avec le modèle d'Ostwald-de-Waele sont pris en considération. Les valeurs des coefficients de corrélation obtenus pour

chaque polymère confirment la fiabilité de la loi d'Ostwald-de-Waele (voir Tableau 13). On peut voir que les polymères ont des caractères rhéofluidifiants très différents, comme en témoignent la large gamme de valeurs obtenues pour les indices d'écoulement (allant de 0,4 à 0,9), rassemblées dans le Tableau 13

Concernant les polymères PEGylés tout d'abord, on peut voir que l'alginate-kétoprofène possède un indice d'écoulement beaucoup plus élevé que les alginates Système A et C, qui témoigne donc d'un caractère rhéofluidifiant moins prononcé. Cela peut s'expliquer par la présence de ramifications de très grandes tailles, avec les deux groupements phénol cycliques du kétoprofène, qui confèrent aux chaînes une moins grande flexibilité que pour les Systèmes A et C, dont les ramifications constituées des groupements thiol et acrylate sont beaucoup moins grandes. Ces résultats sont cohérents avec différentes publications³²¹⁻³²⁷, comme celle de Tsamopoulos *et al.*³²³, qui compare le comportement rhéologique de molécules de PEG linéaires et cycliques, et démontre que les chaînes en conformation linéaire s'alignent beaucoup plus facilement dans le flux, et résultent donc en un caractère rhéofluidifiant plus prononcé que la forme cyclique pour laquelle les chaînes présentent moins de déformabilité et une plus forte résistance à l'alignement dans le flux.

Les alginates Système A et Système C quant à eux, ont un indice d'écoulement quasiment identique. Cela s'explique certainement par le fait que les groupements thiol et acrylate sont de taille très proche, et n'ont donc que peu d'influence sur le caractère rhéofluidifiant. Cela permet également de conclure que la longueur de chaîne entre ces deux alginates doit être du même ordre de grandeur.

On constate qu'entre les alginates SLG100 et SLM100, le caractère rhéofluidifiant est plus prononcé pour le SLM100, contenant plus de groupements mannuroniques. Ces alginates sont obtenus auprès du même fournisseur (voir chapitre Matériel et Méthodes), et présentent les mêmes propriétés physico-chimiques, et particulièrement la même masse moléculaire moyenne, qui témoigne de la longueur des chaînes. Par conséquent, cette différence de caractère rhéofluidifiant semble être principalement due à la différence de conformation des chaînes : en effet, les chaînes de poly-mannuronate se lient au niveau d'un carbone équatorial et forment ainsi des structures étendues, alors que les chaînes de poly-guluronate se lient au niveau d'un carbone axial et forment des structures en « zig-zag » (voir chapitre Etat de l'Art). Par conséquent, les chaînes de poly-mannuronate auront tendance à se réarranger plus facilement que les chaînes de poly-guluronate, donnant un caractère rhéofluidifiant plus prononcé au SLM100 qu'au SLG100.

Concernant la comparaison entre les alginates PEGylés et les alginates de référence, les résultats montrent que les alginates de référence ont un caractère rhéofluidifiant moins prononcé que les alginates Système A et Système C, et proche de celui de l'alginate-Kétoprofène. Or ces alginates de référence n'ont aucune ramification, et devraient donc se réarranger plus facilement et présenter un caractère rhéofluidifiant plus prononcé.

Ces résultats peuvent donc s'expliquer par le deuxième paramètre influençant le réarrangement des chaînes : leurs longueurs. Le fait que les chaînes des polymères PEGylés se réarrangent plus facilement que celles des alginates de référence peut donc signifier qu'elles sont plus courtes que ces dernières (de par les protocoles de synthèse qui peuvent dégrader les chaînes et réduire leurs longueurs). Dans le cas de l'alginate-kétoprofène, il y a donc certainement compétition entre la longueur des chaînes (plus courtes que les alginates de référence), qui a tendance à faciliter le réarrangement, et la taille des ramifications, qui a tendance à empêcher le réarrangement, donnant au final une valeur d'indice d'écoulement proche de celles des alginates de référence.

Ces analyses sont cohérentes avec la littérature, qui établit que la rhéofluidification peut être définie comme le réarrangement des chaînes de polymère qui s'alignent dans le sens du flux sous l'effet d'une contrainte, réduisant ainsi la viscosité, et que le caractère rhéofluidifiant d'un polymère dépend donc de différents paramètres, selon le type de polymère :

- Pour un polymère non ramifié, le caractère rhéofluidifiant dépend principalement du rayon de giration, d'après la théorie de Rouse³²⁸⁻³³⁰
- Pour un polymère ramifié, le caractère rhéofluidifiant dépend principalement de la présence des ramifications tout d'abord (en comparaison avec un polymère non ramifié), de la longueur effective des chaînes du polymère, du nombre de ramification et de leurs tailles (d'après Jabbarzadeh *et al.*³²¹) : tous ces différents paramètres auront pour effet de réduire la mobilité des chaînes et par conséquent de réduire le caractère rhéofluidifiant.

Concernant les paramètres obtenus avec les modèles de Cross et Carreau-Yasuda, le modèle de Cross permet d'obtenir une modélisation fiable, mais le modèle de Carreau Yasuda fournit un mauvais ajustement des résultats expérimentaux (Figure 62), qui se manifeste par des valeurs de paramètres aberrantes (valeurs notées en rouge dans le Tableau 14). Le modèle de Cross s'approche donc mieux des valeurs expérimentales obtenues, et sera donc utilisé pour la suite des analyses.

Les viscosités à cisaillement nul obtenues sont très proches pour l'alginate de référence SLM100-2,5% et l'alginate-kétoprofène-4%, et environ 10 fois moins élevée pour l'alginate de référence SLG100-2,5%. Ces grandes différences de viscosité peuvent avoir un impact important lors de la formation de gouttes en microfluidique.

Le temps de relaxation, qui caractérise la mobilité des chaînes, montre que les chaînes de l'alginate SLG100 sont beaucoup plus mobiles que celles du SLM100 et de l'alginate-Kétoprofène. Cela est dû à la présence de groupements volumineux et peu flexibles pour l'alginate-kétoprofène. Ces chaînes étant moins mobiles, le cisaillement critique pour lequel ces polymères passent en zone rhéofluidifiante est beaucoup plus faible que pour l'alginate SLG100.

Il est donc d'autant plus important pour ces alginates de connaître précisément le taux de cisaillement présent dans le système microfluidique lors de la formation de gouttes, puisque leur viscosité est variable sur une plus grande gamme de taux de cisaillement.

Pour les alginates Système A et Système C, comme expliqué précédemment, les courbes correspondent à un comportement de fluide à seuil. Après modélisation de la contrainte de cisaillement par les modèles de Bingham et de Herschel-Bulkley, ce dernier donne des résultats beaucoup plus adaptés aux courbes, c'est donc celui qui a été gardé. Les modélisations obtenues avec le modèle Herschel-Bulkley sont présentées en Figure 64.

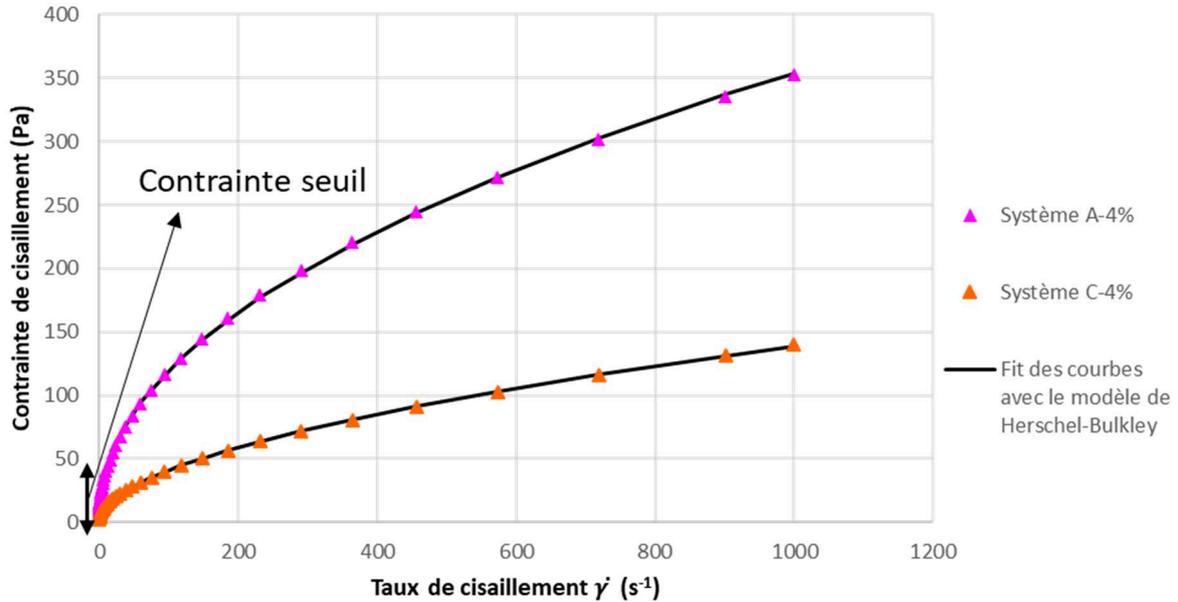


Figure 64 : Contrainte de cisaillement en fonction du taux de cisaillement pour les alginate Système A et Système C, modélisation par le modèle de Herschel Bulkley

Pour rappel, l'équation (11) définissant le modèle de Herschel Bulkley est la suivante :

$$\tau = \tau_{0H} + k_H(\dot{\gamma})^{n_H} \quad (11)$$

Ces modélisations permettent donc d'obtenir les paramètres suivants :

- L'indice de consistance k_H , sans dimension, qui témoigne de la viscosité du polymère
- L'indice d'écoulement n_H , qui est celui de la loi en puissance, et définit donc de la même manière le caractère rhéofluidifiant ou rhéoépaississant du polymère, lorsqu'il est dans la zone d'écoulement (au-dessus de la contrainte seuil)
- La contrainte seuil τ_{0H} (Pa) : c'est la valeur de contrainte qui définit la transition du polymère du comportement de type solide élastique, au comportement de type fluide visqueux, selon les équations suivantes :

Pour $\tau < \tau_{0H}$, le polymère se comporte comme un solide, et la viscosité est constante :

$$\eta = \eta_0$$

Pour $\tau > \tau_{0H}$, le polymère se comporte comme un fluide visqueux, Newtonien ou non Newtonien (en fonction de la valeur de n_H), dont la viscosité est définie par l'équation (15), obtenue en remplaçant τ par $\eta \times \dot{\gamma}$ dans l'équation de Herschel Bulkley (11), grâce à l'équation (6) :

$$\eta = \frac{\tau_{0H}}{\dot{\gamma}} + k_H(\dot{\gamma})^{n_H-1} \quad (15)$$

Grâce à la valeur de τ_{0H} déterminée par le modèle, et à la valeur de $\dot{\gamma}_0$ déterminée expérimentalement, on peut ainsi en déduire la valeur de la viscosité à cisaillement nul η_0 :

$$\eta_0 = \frac{\tau_{0H}}{\dot{\gamma}_0} + k_H(\dot{\gamma}_0)^{n_H-1}$$

Le Tableau 16 rassemble les valeurs de ces paramètres obtenues pour les deux alginates Système A et Système C :

Polymère	τ_{0H} (Pa)	k_H (m ² /s)	n_H	$\dot{\gamma}_0$ (expérimentalement)	η_0
Système A-4%	4,614	12,412	0,483	$8,34 \cdot 10^{-4}$	$6,02 \cdot 10^3$
Système C-4%	2,556	3,072	0,549	$1,667 \cdot 10^{-2}$	$1,73 \cdot 10^2$

Tableau 16 : Valeurs des paramètres du modèle de Herschel Bulkley obtenues pour les alginates Système A et Système C

On peut voir que les valeurs des indices d'écoulement sont cohérentes avec celles obtenues avec le modèle d'Ostwald-de-Waele, ces polymères présentent bien un caractère rhéofluidifiant prononcé.

La valeur de la contrainte seuil est assez proche pour les deux polymères, et elle correspond à un cisaillement très faible dans les deux cas (valeurs de $\dot{\gamma}_0$ dans le Tableau 16), ce qui signifie que dans le système microfluidique, les polymères seront bien en phase d'écoulement visqueux, car le cisaillement imposé pour déplacer les fluides est plus important (cela sera confirmé par les valeurs de cisaillement calculées dans notre système dans le paragraphe Encapsulation).

Enfin, la viscosité à cisaillement nul de l'alginate Système A-4% est plus de 60 fois plus élevée que celle de l'alginate-kétoprofène-4% et SLM100-2,5%, et celle de l'alginate Système C-4% est environ 20 fois plus élevée pour l'alginate Système C. Cela s'explique par le fait que ces polymères se comportent comme des solides lorsqu'ils ne sont soumis à aucun cisaillement.

2.1.1.3 Comparaison entre 3 lots de Système A

Enfin, on s'est intéressé à la répétabilité des valeurs obtenues pour les indices d'écoulement et de consistance d'un lot de polymère à l'autre. Pour cela, les mesures ont été effectuées sur 3 différents lots d'alginate Système A. Le premier lot est un alginate sur lequel le pourcentage de greffage de groupements PEG-SH obtenu est de 17,2 %, et le deuxième lot présente un pourcentage de greffage de 21,1 % (le pourcentage de greffage n'a pas été caractérisé pour le troisième lot). Les courbes des logarithmes de contraintes de cisaillement en fonction des logarithmes de taux de cisaillement, ainsi que les régressions linéaires, sont présentées en Figure 65, et le Tableau 17 rassemble les valeurs obtenues pour les différents paramètres.

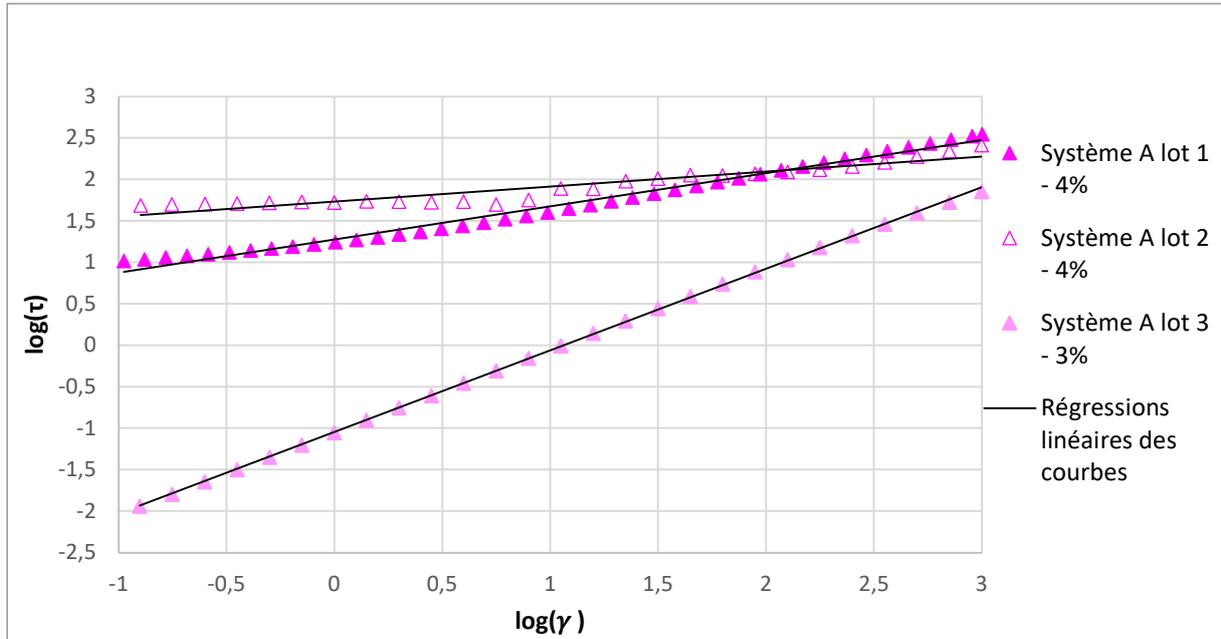


Figure 65 : Comparaison des comportements rhéologiques entre 3 lots différents d'alginate Système A, en appliquant la loi d'Ostwald-de-Waele

Polymère	n	$\log(k)$	k	R^2	% greffage
Système A lot 1 - 4%	0,400	1,276	18,880	0,986	17,2
Système A lot 2 - 4%	0,181	1,733	54,075	0,893	21,1
Système A lot 3 - 3%	0,984	-1,045	0,090	1	

Tableau 17 : Valeurs obtenues avec la loi d'Ostwald-de-Waele pour les indices de consistance k et d'écoulement n des différents lots d'alginate Système A

La Figure 66 présente les viscosités dynamiques en fonction du taux de cisaillement, en échelle logarithmique, ajustées par le modèle de Herschel Bulkley (à partir de l'équation (15)), et les valeurs des paramètres obtenus avec ce modèle sont rassemblées dans le Tableau 18.

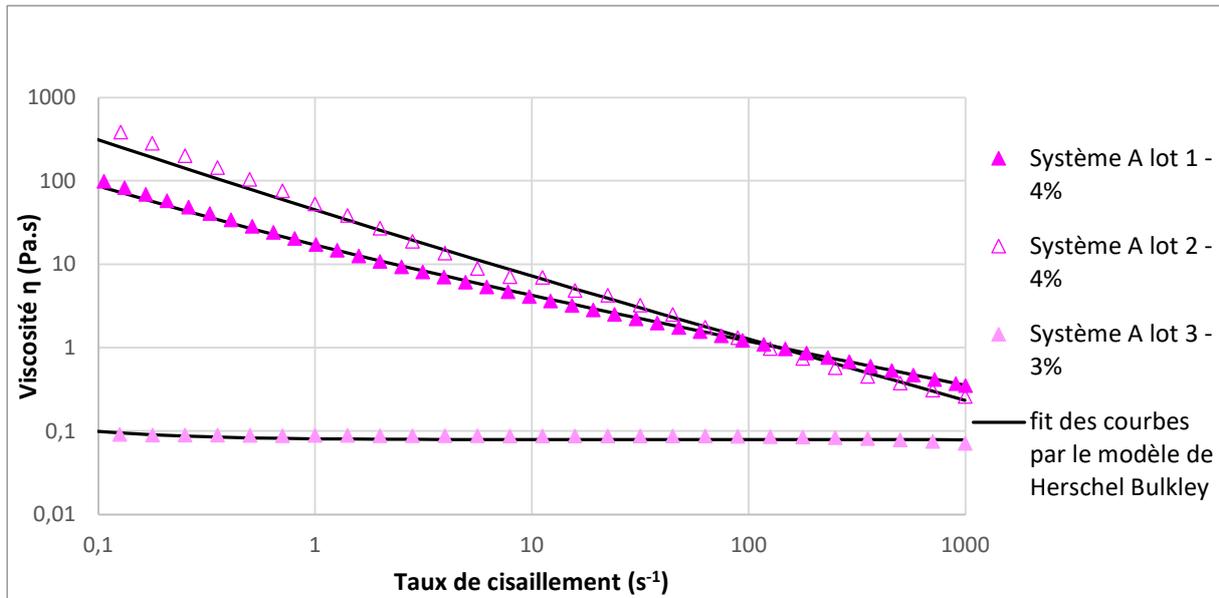


Figure 66 : Viscosité de cisaillement en fonction du taux de cisaillement pour différents lots de l'alginate Système A, modélisation par Herschel Bulkley

Polymère	τ_{0H} (Pa)	k_H	n_H	$\dot{\gamma}_0$ (expérimentalement)	η_0
Système A lot 1 - 4%	4,614	12,412	0,483	$8,34 \cdot 10^{-4}$	$6,02 \cdot 10^3$
Système A lot 2 - 4%	17,020	27,766	0,298	$1,12 \cdot 10^{-2}$	$2,18 \cdot 10^3$

Tableau 18 : Valeurs des paramètres du modèle de Herschel Bulkley obtenues pour différents lots de l'alginate Système A

Ces résultats montrent que pour un même alginate, les différents lots peuvent présenter des comportements rhéologiques très différents : les lots 1 et 2 ont un comportement de fluides plastiques à seuil, alors que le lot 3 a un comportement Newtonien sur la gamme étudiée (sa viscosité est d'environ 88 mPa.s.).

Afin d'étudier le caractère rhéofluidifiant, les valeurs de l'indice d'écoulement n obtenues avec la loi d'Ostwald-de-Waele sont considérées : elles confirment que les lots 1 et 2 sont rhéofluidifiants, alors que le lot 3 a un indice quasiment égal à un, qui témoigne d'un comportement presque Newtonien. Pour rappel, un caractère rhéofluidifiant plus prononcé témoigne de chaînes qui se réarrangent plus facilement, qui sont donc soit plus courtes, soit dont le pourcentage de greffage est plus faible.

Les chaînes du lot 3 ne se réarrangent donc quasiment plus dans la gamme de cisaillement étudiée. Concernant les lots 1 et 2, le lot 2 a un caractère rhéofluidifiant beaucoup plus prononcé que le lot 1, alors que son pourcentage de greffage est plus important (ce qui a pour effet d'empêcher le réarrangement des chaînes, et donc de réduire le caractère rhéofluidifiant). Cela signifie donc que les chaînes du Système A lot 2 doivent être plus courtes que celles du lot 1, entraînant donc un réarrangement plus facile, et un caractère rhéofluidifiant plus prononcé.

Ces résultats montrent donc que ces 2 lots du même alginate Système A, à la même concentration, présentent des caractères rhéofluidifiants très différents, et que cette différence est principalement due aux longueurs de chaînes, ainsi qu'aux différents pourcentages de greffage.,

bien que l'alginate de départ (sur lequel sont greffés les dérivés de PEG) soit le même. Par conséquent, ces différences de longueurs de chaînes viennent uniquement des différentes étapes de synthèse.

Les paramètres obtenus avec le modèle de Herschel Bulkley présentent également une variabilité importante : les valeurs de viscosité à cisaillement nul sont presque 3 fois plus élevées pour le lot 1 que pour le lot 2. Ce résultat est cohérent avec les valeurs d'indice d'écoulement obtenues précédemment, qui montraient que les chaînes du lot 2 sont plus courtes que celles du lot 1.

La valeur de la contrainte seuil est également différente : celle du lot 2 est presque 4 fois supérieure à celle obtenue pour le lot 1. Ces valeurs correspondent cependant dans les deux cas à un cisaillement très faible, ce qui signifie que dans le système microfluidique, les polymères seront bien en phase d'écoulement visqueux (cela sera confirmé par les valeurs de cisaillement calculées dans notre système dans le paragraphe Encapsulation)

On peut donc voir que les protocoles de synthèses des alginates PEGylés ne sont pas encore standardisés, et entraînent des variabilités relativement importantes entre les différents lots d'un même polymère. Comme expliqué précédemment, ces variabilités auront un impact sur la fréquence de formation de gouttes et leur taille.

2.1.2 Propriétés viscoélastiques et comparaison

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 le détachement de la goutte. Il est donc important de caractériser l'élasticité des phases dispersées utilisées.

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. Ces modules ont été déterminés à l'aide d'un test en oscillation effectué au rhéomètre, dont le fonctionnement est décrit dans le Matériel et Méthodes.

Les essais en oscillation permettent de caractériser les propriétés des solutions aqueuses, tout en gardant les conditions proches de l'état de repos (à des taux de cisaillement très faibles) et sans détruire la structure interne du polymère. Cela permet d'étudier le comportement viscoélastique d'un polymère, en s'intéressant aux structures responsables de ces comportements.

Pour rappel, ces tests consistent à appliquer un taux de déformation constant (allant de 0,8 à 10 %), en oscillation avec balayage en fréquence. Le taux de cisaillement pouvant être défini comme la vitesse de déformation, divisée par la distance entre les deux plaques, lorsque la fréquence augmente, la déformation est donc effectuée sur un temps plus court, et le taux de cisaillement augmente. L'oscillation avec balayage en fréquence correspond donc à une oscillation avec balayage en taux de cisaillement (à des taux de cisaillement très faibles).

Ces mesures ont été effectuées à différentes concentrations (de 1 à 4 %), sur les alginates Système C, Alginate-kétoprofène, et alginate de référence SLG100 (l'alginate Système A n'a pas pu être testé, car nous ne disposions pas de suffisamment de polymère au moment des tests).

Les résultats obtenus pour les différents alginates, aux différentes concentrations étudiées, sont présentés en Figure 67 (SLG100), Figure 68 (Alginat-Kétoprofène), et Figure 69 (Système C).

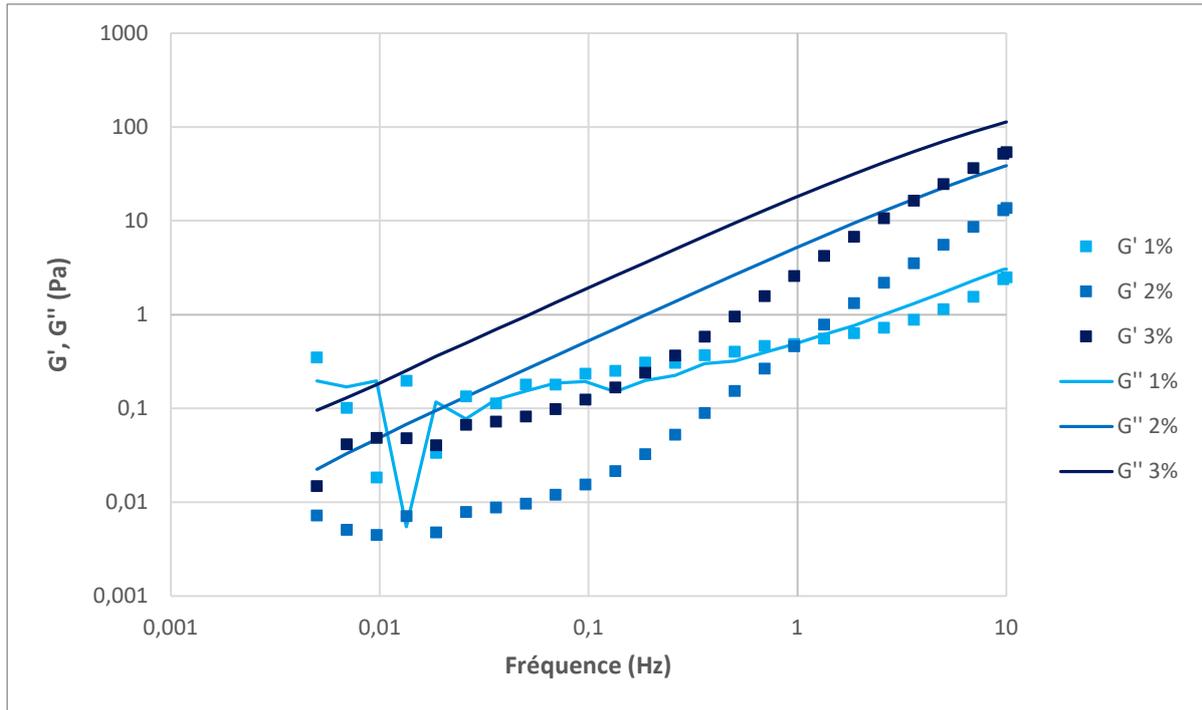


Figure 67 : Modules élastiques G' et visqueux G'' pour les différentes concentrations d'alginate de référence SLG100

Pour l'alginate de référence SLG100, la mesure à une concentration de 1 % ne semble pas stable, mais pour les autres mesures, on peut voir que le module visqueux est supérieur au module élastique aux différentes concentrations étudiées : ce polymère a donc un comportement de type liquide visqueux. La fréquence de sollicitation est telle que les chaînes de polymère ont suffisamment le temps de relaxer, et la majorité de l'énergie est dissipée par énergie visqueuse. Lorsque la fréquence augmente, les deux modules G' et G'' augmentent et leurs valeurs se rapprochent. Sur des gammes de fréquence plus larges, les deux courbes peuvent se croiser et le point de croisement de ces courbes correspond au temps de relaxation du polymère, mais dans la gamme de fréquence étudiée, les courbes ne se croisent pas et ne permettent donc pas de déterminer le temps de relaxation du polymère.

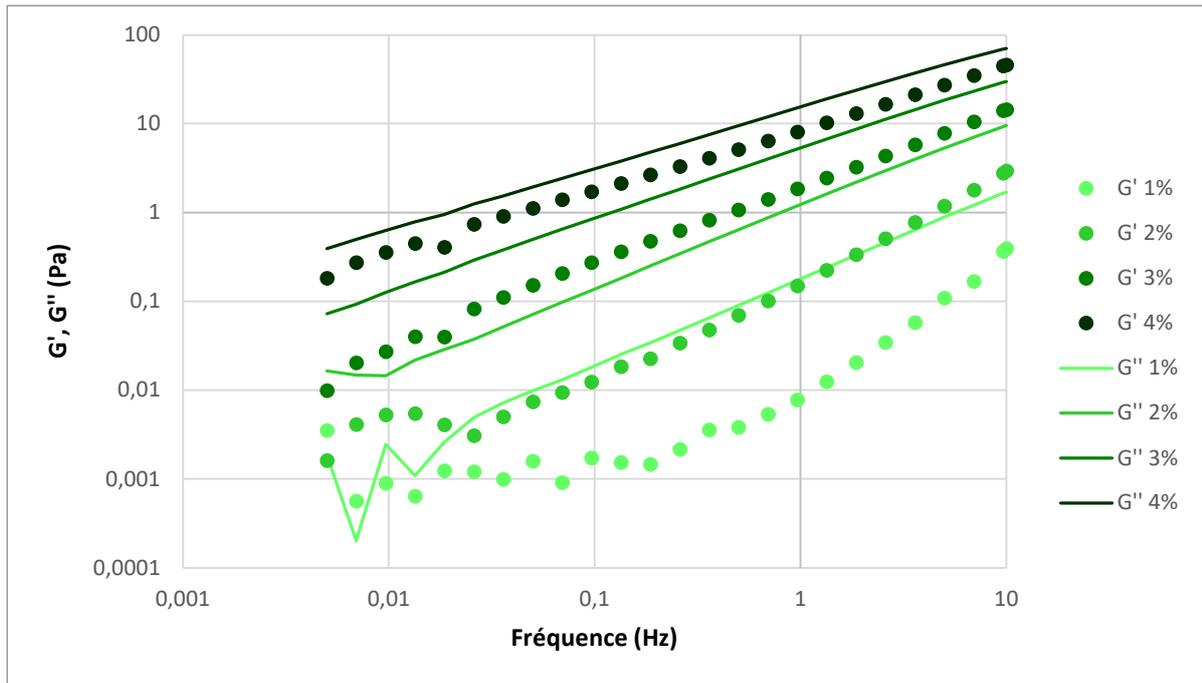


Figure 68 : Modules élastiques G' et visqueux G'' pour les différentes concentrations d'alginate-kétoprofène

L'alginate-kétoprofène présente des résultats similaires à l'alginate SLG100 : le module visqueux est supérieur au module élastique pour toutes les concentrations étudiées, ce qui témoigne également d'un comportement de type liquide visqueux. Les valeurs semblent cependant moins se rapprocher que pour l'alginate de référence SLG100. On peut supposer que si les courbes de G' et G'' se croisent, c'est donc pour des fréquences plus élevées, et le temps de relaxation de l'alginate-kétoprofène doit donc être inférieur à celui de l'alginate de référence.

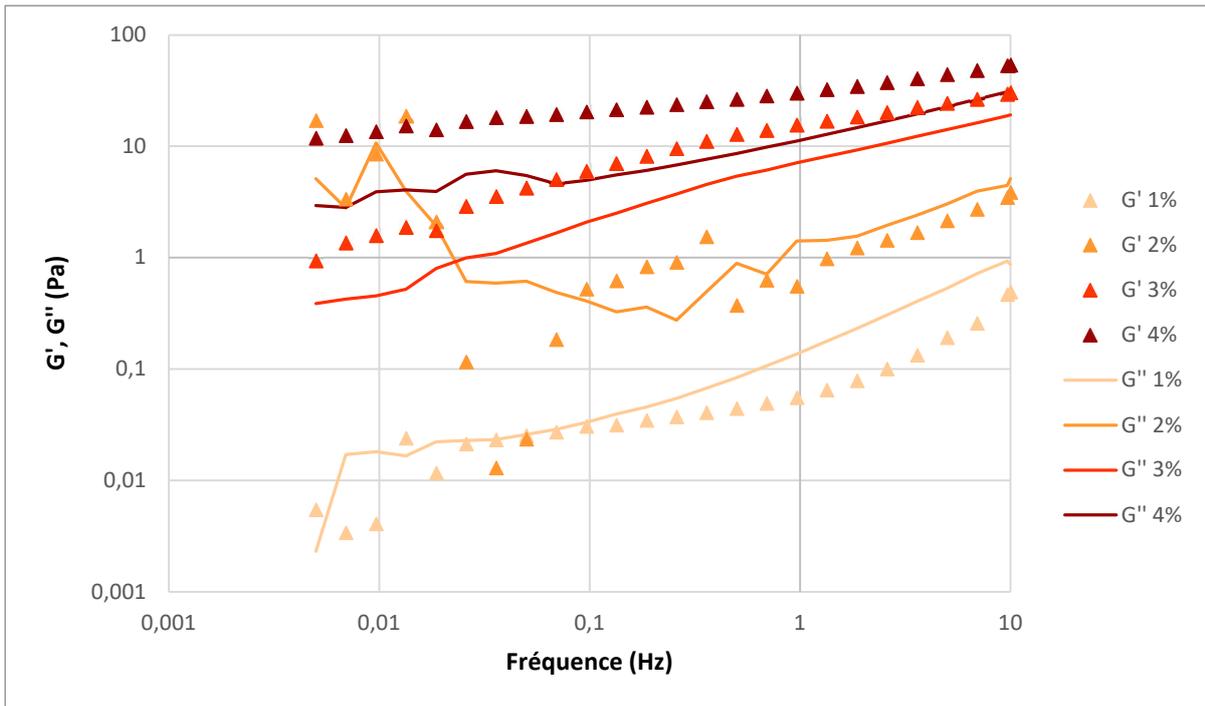


Figure 69 : Modules élastiques G' et visqueux G'' pour les différentes concentrations d'alginate Système C

Pour l'alginate Système C, les résultats obtenus sont différents en fonction des concentrations : ici, pour les concentrations de 1 % et 2 %, les valeurs des modules visqueux semblent être supérieures aux valeurs des modules élastiques, ce qui correspond, comme pour les alginates de référence et Kétoprofène, à un comportement de type liquide visqueux, mais les courbes à ces concentrations ne semblent pas stables et précises donc ces résultats sont à prendre avec précaution. Pour les concentrations de 3 et 4 % cependant, on obtient des modules élastiques supérieurs aux modules visqueux, ce qui correspond à un comportement de type solide élastique : aux fréquences étudiées, les enchevêtrements n'ont pas le temps de se défaire (les chaînes n'ont pas le temps de se réarranger), et la capacité du réseau à stocker l'énergie imposée augmente.

Les résultats obtenus pour les concentrations de 3 et 4 % sont cohérents avec les résultats obtenus en rhéologie statique avec balayage en taux de cisaillement, qui ont montré que le Système C se comporte comme un fluide plastique à seuil, et donc comme un solide élastique sous une contrainte seuil.

Afin de comparer les différents alginates entre eux, les modules élastiques et visqueux obtenus à une concentration de 3 % pour chaque alginate sont rassemblés en Figure 70.

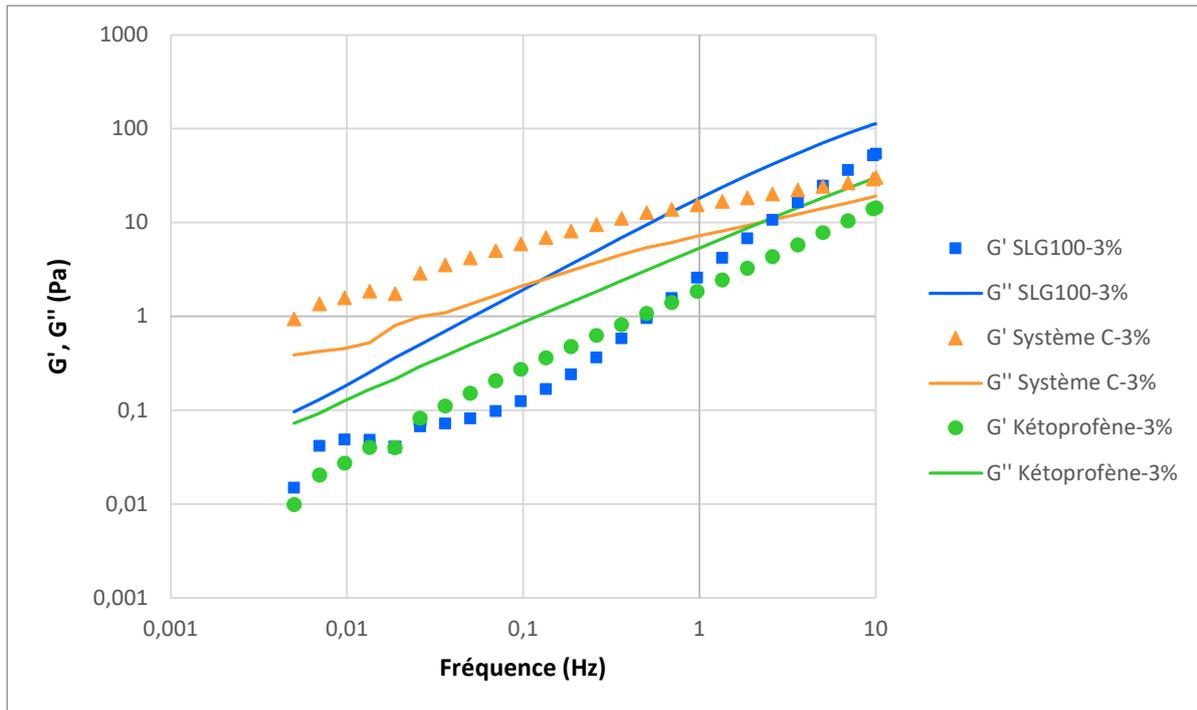


Figure 70 : Modules élastiques G' et visqueux G'' pour les différents alginates, à une concentration de 3 %

On peut voir que les valeurs du module élastique sont beaucoup plus élevées pour l'alginate Système C, alors que les valeurs des modules visqueux sont dans les mêmes ordres de grandeur pour les trois polymères. Le Système C est donc plus élastique que les deux autres alginates. Ces différences d'élasticité ont un impact sur la formation de gouttes en microfluidique, qui sera étudiée dans le chapitre Encapsulation.

2.2 Structure et pureté des polymères

Les différentes étapes de synthèse des polymères peuvent avoir un impact sur la pureté du produit obtenu (à cause de potentiels résidus de solvants organiques utilisés pendant les synthèses), sur la longueur des chaînes du polymère (s'il y a dégradation des chaînes du polymère de départ, de par des conditions acides ou basiques pendant les étapes de synthèse), et sur le pourcentage de greffage obtenu. Ces paramètres doivent donc être caractérisés au mieux, et les résultats obtenus sont présentés ici.

2.2.1 Pureté et pourcentage de greffage

Concernant la pureté, les caractérisations ont été effectuées par les équipes de l'EPFL. Pour cela, après chaque synthèse, des mesures de résonance magnétique nucléaire du proton ont été effectuées sur les produits obtenus. Ces mesures permettent également de déterminer la structure chimique des produits. Des exemples de spectres obtenus sont présentés en Figure 71 pour le Système A, Figure 72 pour l'alginate-PEG-SH préparé pour le Système C, Figure 73 pour l'alginate-PEG-acrylate préparé pour le système C, et Figure 74 pour l'alginate-kétoprofène.

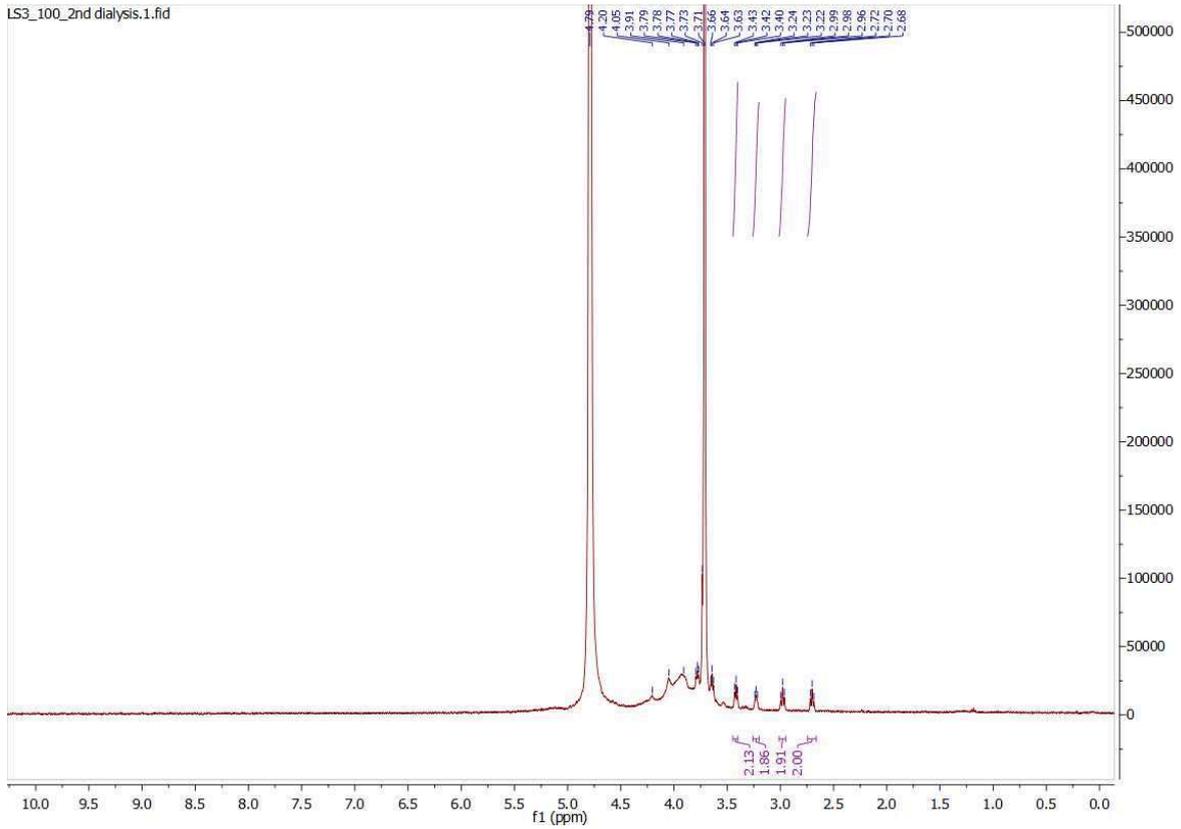


Figure 71 : Exemple de spectre RMN obtenu pour le Système A

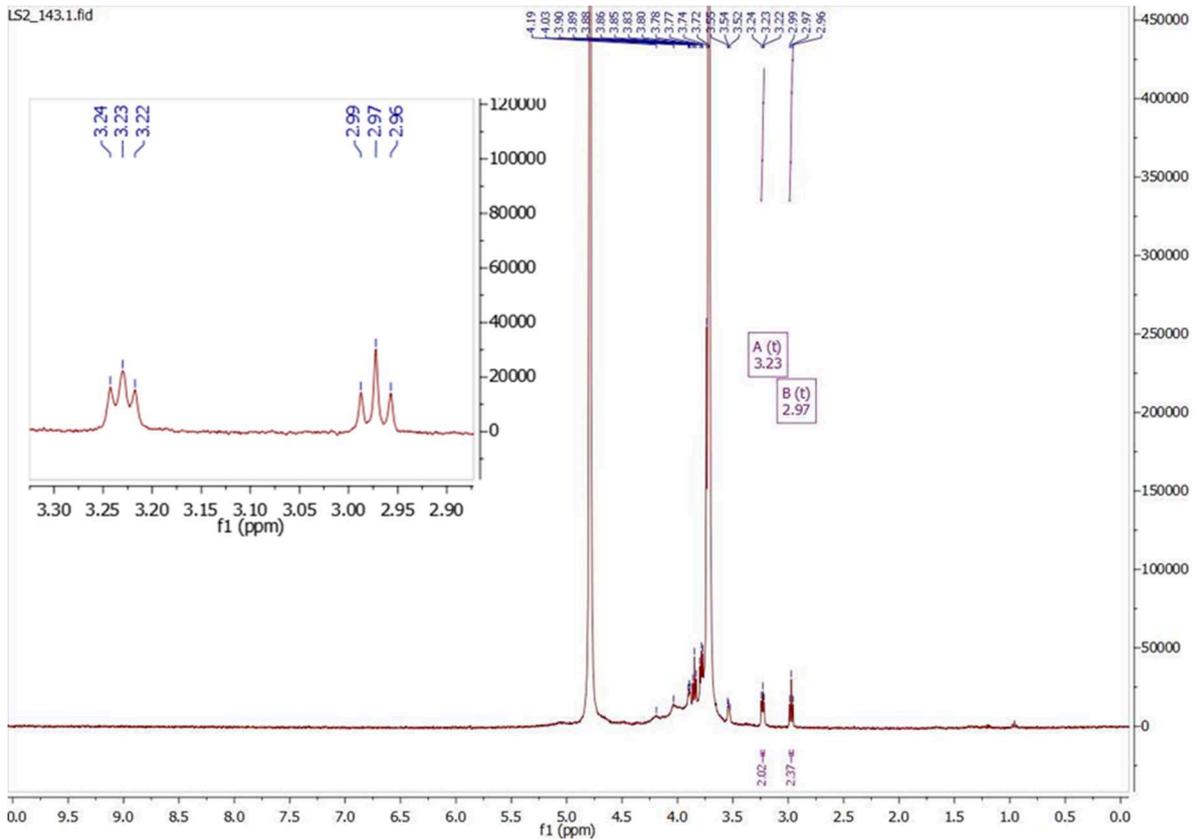


Figure 72 : Exemple de spectre RMN obtenu pour l'alginate-PEG-SH utilisé pour préparer le Système C

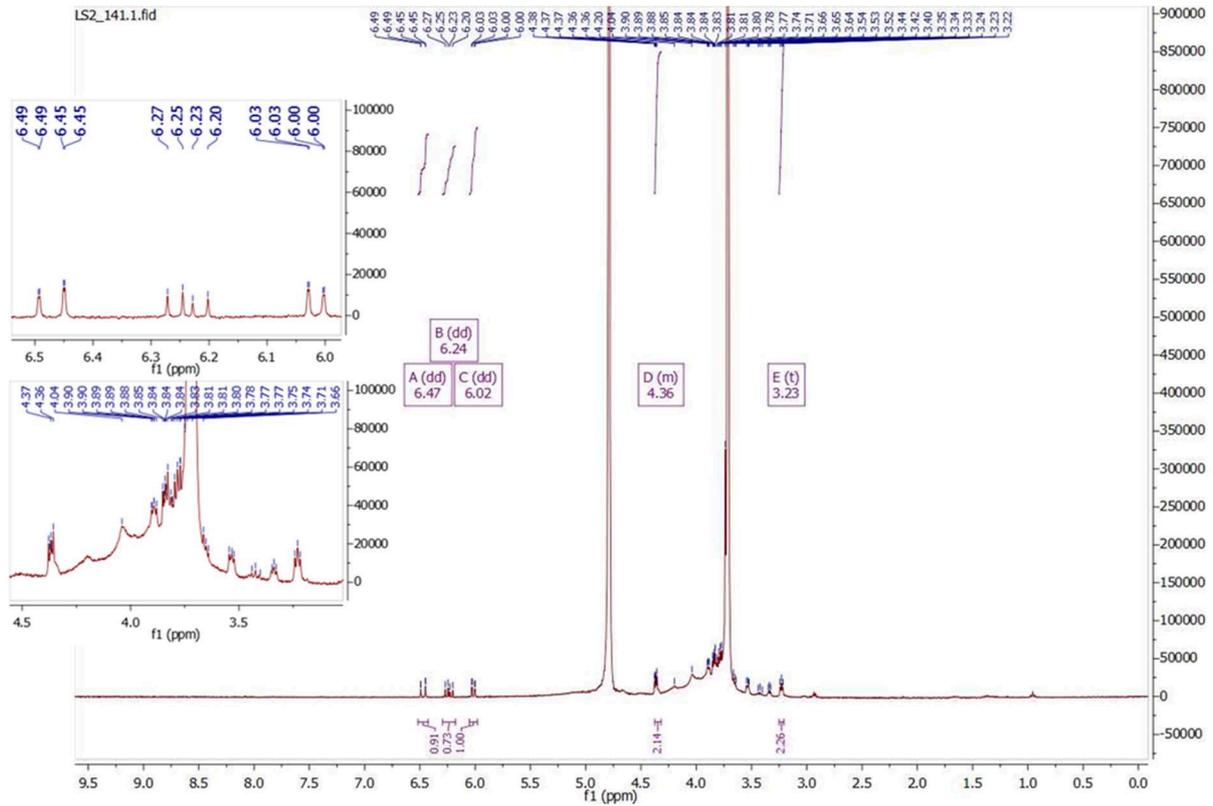


Figure 73 : Exemple de spectre RMN obtenu pour l'alginate-PEG-acrylate utilisé pour préparer le Système C

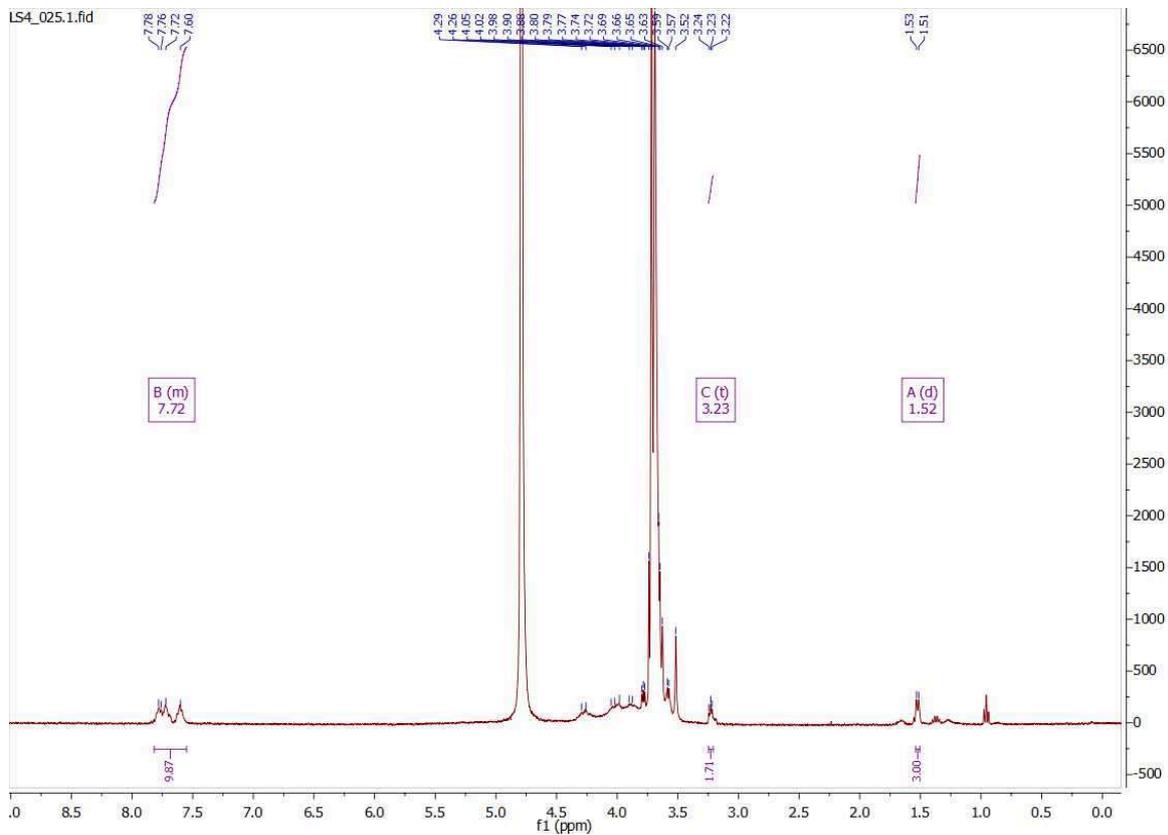


Figure 74 : Exemple de spectre RMN obtenu pour l'alginate-kétoprofène

L'identification des différents pics présents sur les spectres permet de déterminer les types de groupements présents dans la molécule, et ainsi de vérifier sa pureté. L'intégration des pics permet de déterminer le nombre de groupements présents, et donc le pourcentage de greffage des différents groupements. Le Tableau 19 rassemble les identifications des pics et groupements chimiques correspondants, pour les 4 spectres présentés précédemment.

Alginate	Déplacement chimique δ	Type de pic	Constante de couplage	Intégration	Groupement correspondant
Système A (Figure 71)	4,20-3,79	multiplet			CH-Alginate
	3,78-3,63	multiplet			CH ₂ -O-CH ₂
	3,42	triplet	J=5,0 Hz	2H	CH ₂ -NH-C(O)-O
	3,23	triplet	J=5,0 Hz	2H	CH ₂ -NH-C(O)-CH ₂
	2,98	triplet	J=6,7 Hz	2H	CH ₂ -C(O)-NH
	2,70	triplet	J=6,7 Hz	2H	CH ₂ -SH
Alginate-PEG-SH pour Système C (Figure 72)	4,19-3,52	multiplet	-		CH-Alginate + CH ₂ -CH ₂ -O
	3,23	triplet	J=5,0 Hz	2H	CH ₂ -SH
	2,97	triplet	J=6,1 Hz	2H	CH ₂ -NH-C(O)-O
Alginate-PEG-acrylate pour Système C (Figure 73)	6,47	Dd	J=17,3 ; 1 Hz	1H	CH ₂ =CH-O
	6,24	dd	J=17,3 ; 10,5 Hz	1H	CH ₂ =CH-O
	6,02	dd	J=10,7 ; 0,9 Hz	1H	CH ₂ =CH-O
	4,37-4,36	multiplet		2H	CH ₂ -O-C(O)
	4,20-3,33	multiplet			CH-Alginate + CH ₂ -CH ₂ -O
	3,23	triplet	J=4,9 Hz	2H	CH ₂ -NH
Alginate-Kétoprofène (Figure 74)	7,78-7,60	multiplet			Ar.
	4,29-3,57	multiplet			CH-Alginate + CH ₂ -CH ₂ -O
	3,23	multiplet			CH ₂ -NHC(O)
	1,52	doublet	J=7,1 Hz		CH ₃

Tableau 19 : Identification et affectation des pics présents sur les différents spectres : les déplacements chimiques correspondent à l'emplacement des pics sur l'axe des abscisses ; les types de pics donnent une information sur le nombre d'Hydrogènes voisins, dd=doublet de doublet ; les constantes de couplage permettent d'identifier les protons couplés ; et l'intégration permet de déterminer combien d'Hydrogènes sont concernés

Ces spectres permettent donc à la fois de confirmer l'obtention des molécules souhaitées en identifiant chaque groupement chimique de ces molécules, grâce aux pics correspondants sur les spectres, et également de confirmer la pureté du produit obtenu, de par l'absence de pics supplémentaires sur les spectres.

Concernant le pourcentage de greffage, celui-ci est obtenu en comparant l'intégration des résonances des hydrogènes pour le fragment de PEG et pour le groupement alginate. Cependant, comme les pics se superposent, la séparation des résonances est effectuée par déconvolution (voir Figure 75). Ces spectres de déconvolution sont obtenus par superposition des spectres de RMN du proton enregistrés pour les différents Alginate-PEG, avec des simulations de spectres obtenus par la somme de fonctions Lorentziennes.

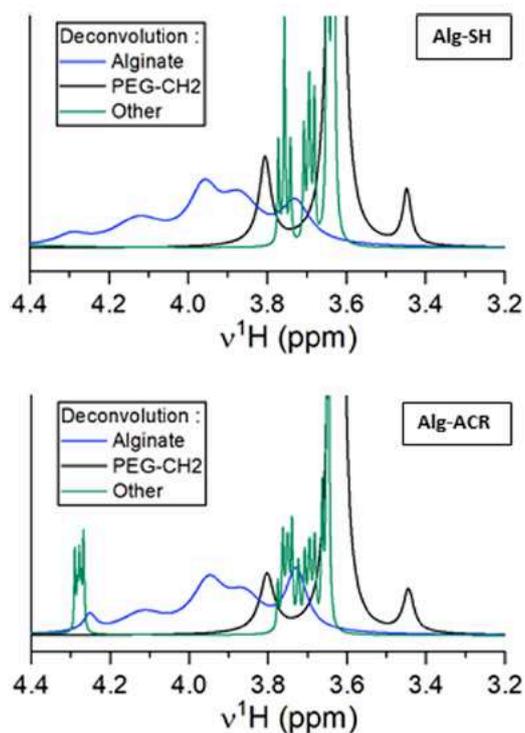


Figure 75 : Exemple de spectre de déconvolution pour l'alginate-PEG-SH (Alg-SH) et l'alginate-PEG-acrylate (Alg-ACR) utilisés pour le Système C : les spectres se décomposent en une région correspondant à la contribution du signal d'alginate (en bleu) ; le pic aliphatique du PEG, comprenant les ^{13}C satellites (en noir) ; et d'autres groupes fonctionnels correspondants à différents composés (en vert), qui doivent être soustraits de la contribution de l'alginate³⁰⁷.

Pour plus de détails concernant les caractérisations en RMN, et l'exploitation des spectres obtenus, il est possible de se référer aux différents articles publiés par les équipes de l'EPFL.³⁰⁵⁻³⁰⁸

2.2.1 Longueur des chaînes

Un autre élément de structure des polymères pouvant varier en fonction des étapes de synthèse est la longueur des chaînes, comme expliqué précédemment. Cependant, ce paramètre n'est pas directement caractérisé par les équipes de l'EPFL après les synthèses des alginates, un autre paramètre lié à la longueur des chaînes est caractérisé à la place : la viscosité. Après chaque synthèse, les équipes de l'EPFL mesurent donc la viscosité du polymère obtenu, à l'aide d'un viscosimètre à bille roulante Anton Paar. A partir de la viscosité mesurée, ils en déduisent une longueur de chaînes comparative entre les polymères (plus la viscosité est élevée, plus les chaînes sont longues). Le Tableau 20 rassemble les différentes valeurs fournies par l'EPFL pour une partie des lots étudiés, ainsi que les pourcentages de greffages lorsque ceux-ci étaient fournis.

Polymère	Concentration	Lot	% de greffage	Viscosité (mPa.s)	Viscosité mesurée au CEA à 4% (mPa.s)
Système A	3	2	21,1	628	1496
	3		32,9	728,9	
	-		28,3		
	2	1	17,2	827,8	1347

	2	13	506,0
Système C SH	2,5	37,3	808,1
	2,5		477,7
	3		70,41
	3		77,57
	3		303,4
% de greffage plus faible	2		473,8
Système C acrylate	2		305
	3		431,7
	2,5		277,3
	2		440,5
	2,5		491,2
% de greffage plus faible	2		301,6
Kétoprofène	3		359,2
	1		311,1
	2,5		Trop élevée
	2,5		516,4
	3		264,4

Tableau 20 : Valeurs de viscosité et pourcentage de greffage obtenues par l'EPFL pour différents lots des différents alginates étudiés

Deux des lots d'alginate Système A présentés dans le Tableau 20 ont pu être caractérisés en rhéologie au sein du laboratoire (lot 1 et 2 présentés plus tôt). Pour ces deux alginates, la valeur de viscosité a donc été calculée avec le modèle de Herschel Bulkley et les paramètres trouvés précédemment, pour la valeur de taux de cisaillement appliquée par l'appareil utilisé par l'EPFL ($79,916 \text{ s}^{-1}$). Les valeurs de viscosité obtenues sont indiquées dans le Tableau 20. Ces résultats montrent qu'on obtient une tendance inverse à celle des valeurs de caractérisation effectuées par l'EPFL.

Ces résultats ne permettent donc pas d'en déduire des informations précises sur les longueurs de chaîne des polymères, car la viscosité ne dépend pas uniquement de la longueur des chaînes, mais également du caractère rhéofluidifiant et du pourcentage de greffage. Ils permettent cependant de souligner le fait que les viscosités obtenues varient grandement. De plus, on peut isoler deux valeurs intéressantes à comparer, qui sont rassemblées dans le Tableau 21 :

Polymère	Concentration (%)	% de greffage	Viscosité (mPa.s)
Système A	2	17,2	827,8
	3	32,9	728,9

Tableau 21 : Valeurs de viscosité et pourcentage de greffage obtenues par l'EPFL pour deux lots différents d'alginate Système A

Sur ces deux exemples, on peut voir que le lot étudié à une concentration de 3 % présente à la fois une concentration et un pourcentage de greffage plus élevés que celui étudié à une concentration de 2 %. Par conséquent, si l'influence de la concentration et du pourcentage de greffage sont considérés, ce polymère devrait être plus visqueux que celui à 2 %. Or les mesures de viscosité indiquent le contraire. Ces résultats confirment que les longueurs de chaînes d'un lot à l'autre peuvent être très différentes, donnant lieu ici à une valeur de viscosité à l'inverse de ce qu'on attendait. Cela peut être expliqué par un caractère rhéofluidifiant différent

Malgré le fait que les longueurs de chaînes n'ont pas pu être précisément déterminées, ces résultats illustrent le fait qu'elles peuvent grandement varier d'un lot à l'autre. Cela souligne la difficulté que pourront présenter ces polymères lors de leur utilisation en microfluidique, de par la variabilité des lots et la difficulté de caractériser tous les paramètres ayant un impact sur la formation de gouttes et de capsules en microfluidique.

3. Impact des fluides sur la viabilité

Suite à ces différentes caractérisations effectuées sur les polymères, il a été décidé de vérifier l'impact de ces derniers sur les cellules. Pour cela, un test a été effectué sur des cellules mélangées dans différents lots d'alginate (non gélifié), pour différents temps de contact (voir Matériel et Méthodes). Ces tests ont été menés pour les différents types d'alginate (Système A, Système C, Alginate-Kétoprofène et alginate de référence SLG100), à différentes concentrations (2, 3 et 4 %), et pour des temps de contact (durée pendant laquelle les cellules sont laissées dans l'alginate avant d'effectuer les mesures de viabilité) variant de 10 à 40 minutes.

De plus, ces tests ont été effectués en parallèle sur des lots d'alginate dont les chaînes sont théoriquement plus longues (car un équivalent d'acide est ajouté lors de l'utilisation du CDI, voir partie 1.1.2), et sur des alginate dont les chaînes sont théoriquement plus courtes (sans ajout d'acide). La comparaison des résultats obtenus pour les polymères à chaînes longues et chaînes courtes est présentée en Figure 76 (où lc signifie longues chaînes et cc chaînes courtes), et la Figure 77 présente les résultats pour les polymères à chaînes longues en parallèle des résultats pour l'alginate de référence.

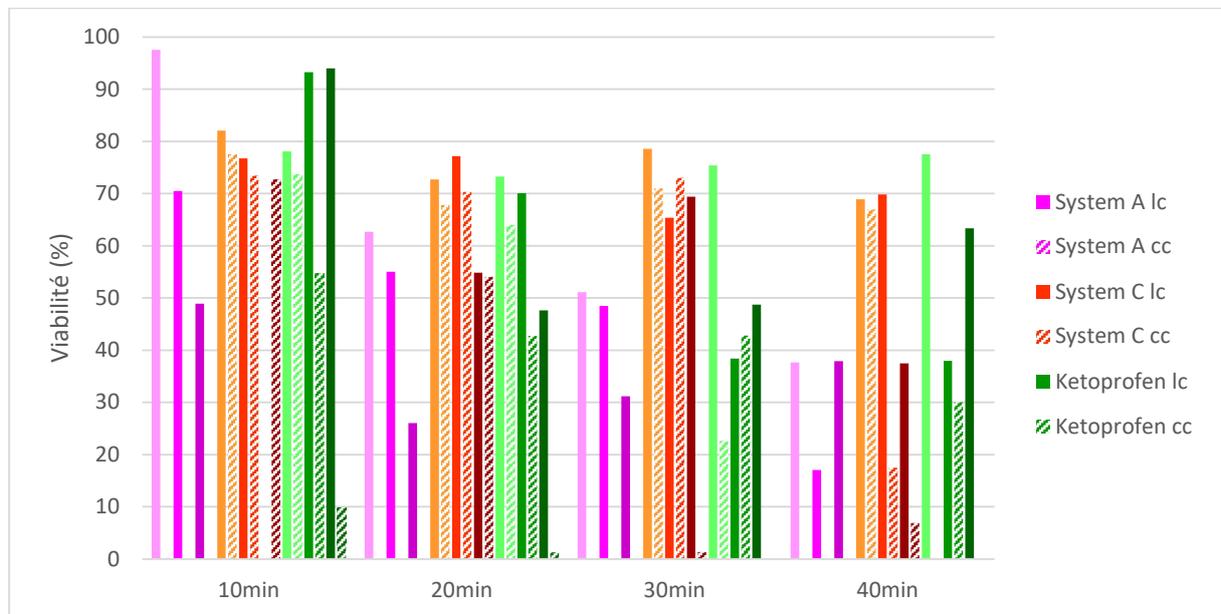


Figure 76 : Résultats de viabilités obtenus sur des cellules mélangées avec les différents alginate à chaînes longues et chaînes courtes, à différentes concentrations, et pour différents temps de contact

Nb : pour le Système C chaînes longues 4% à un temps de contact de 10min, il y a eu un problème de mesure et la viabilité n'a pas pu être calculée (valable pour la Figure 77 également). Pour tous les autres résultats, lorsque la viabilité n'apparaît pas, cela signifie qu'elle est nulle ou très faible.

La Figure 76 montre que les viabilités sont largement supérieures pour les alginates à chaînes longues que pour les alginates à chaînes courtes. En effet, pour les alginates à chaînes courtes, les cellules en Système A sont toutes mortes, et celles en Système C et Alginate-Kétoprofène présentent des viabilités qui décroissent très rapidement avec la concentration en alginate et le temps de contact, la seule condition présentant une viabilité qui reste bonne (passe de 77 % à 67 %) est le Système C-2%.

Concernant les alginates à chaînes longues, les viabilités sont bien meilleures, mais on peut voir malgré tout une tendance à la baisse plus prononcée que pour l'alginate de référence lorsque la concentration en alginate et le temps de contact augmentent, en particulier avec le Système A (Figure 77).

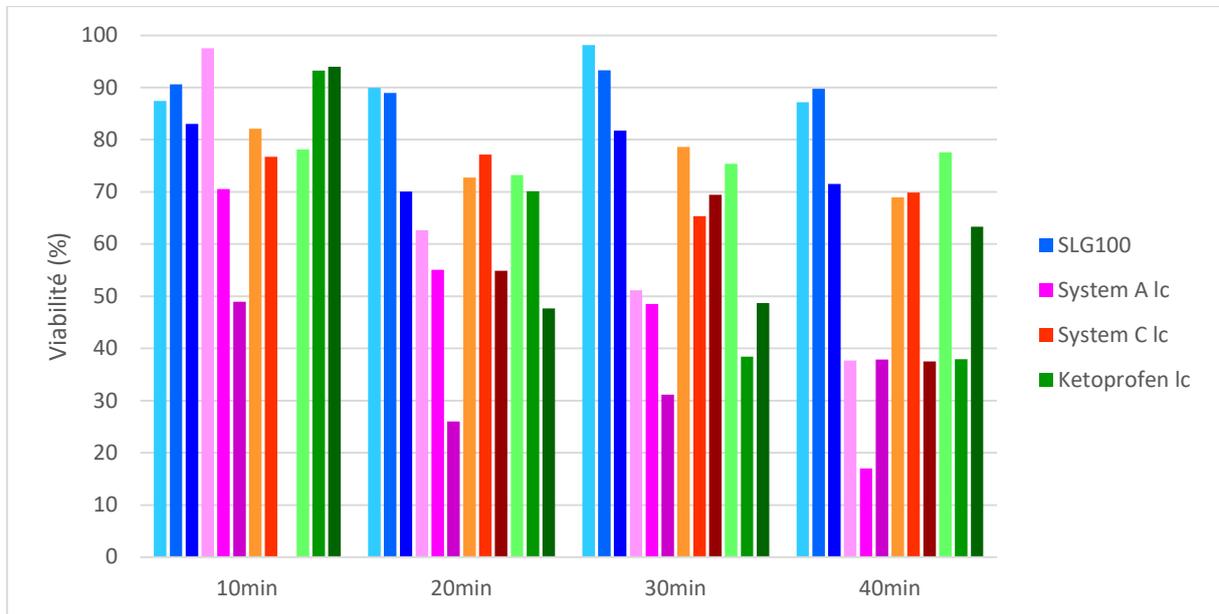


Figure 77 : Résultats de viabilités obtenus sur des cellules mélangées avec les différents alginates à chaînes longues, à différentes concentrations, et pour différents temps de contact

La Figure 77 montre que malgré de meilleurs résultats pour les alginates à chaînes longues que les alginates à chaînes courtes, les alginates modifiés chimiquement semblent plus impacter la viabilité des cellules que l'alginate de référence, en particulier le Système A, pour lequel la concentration et le temps de contact ont tous deux un effet négatif :

- Pour un temps de contact de 10 minutes, l'alginate Système A-2% entraîne une viabilité de 98 %, alors que celui à 4% entraîne une viabilité de 49 %, soit une baisse d'environ 50 %.
- Pour le Système A-2% à 40 minutes de temps de contact, la viabilité chute à 38 % (contre 98 % à 10 minutes), soit une baisse de 60 %.

Ces résultats ont permis de déterminer que parmi les alginates synthétisés par l'EPFL, ceux à utiliser pour l'encapsulation de cellules sont plutôt ceux à chaînes longues (pour lesquels un équivalent d'acide est ajouté lors de l'utilisation du CDI, voir partie 1.1.2), et soulignent le fait que

l'encapsulation doit également être optimisée afin d'être le plus courte possible, car le temps de contact des cellules avec les alginates a un impact sur leur viabilité.

4. Bilan

Ce chapitre a permis de déterminer les propriétés rhéologiques des alginates étudiés, et d'identifier les modèles théoriques permettant de représenter au mieux les résultats expérimentaux. L'identification de ces modèles est utile pour déterminer la valeur de viscosité théorique à n'importe quel taux de cisaillement, ce qui sera nécessaire dans le chapitre Encapsulation. De plus, les résultats obtenus ont démontré la variabilité des différents lots d'alginates, soulignant la difficulté que ces polymères risquent de présenter lors de leur utilisation en microfluidique.

Enfin, les résultats de viabilité obtenus sur des cellules mises en contact avec les différents polymères ont permis d'identifier le type de polymère à utiliser pour la suite de la thèse. Ainsi, dans les chapitres suivants, lorsque ce n'est pas précisé, les polymères utilisés sont des polymères à chaînes longues. Ces résultats ont également permis de montrer que malgré une pureté de polymère qui semble être suffisante (au vu des spectres RMN présentés en partie 2.2.1), les viabilités des cellules sont plus impactées par le contact avec les alginates PEGylés qu'avec l'alginate de référence. Par conséquent, les expériences d'encapsulations de cellules devront être optimisées afin de minimiser le temps de contact des cellules avec les polymères avant gélification.

Les chapitres suivants vont donc se concentrer sur la formation de gouttes et de capsules vides, et les caractérisations nécessaires pour y parvenir (Chapitre 5) ; puis sur la caractérisation des capsules obtenues, afin de déterminer si leur utilisation pour des applications biologiques est possible, et les résultats obtenus lors d'encapsulation de cellules et d'îlots (Chapitre 6).

Chapitre 5 : Encapsulation

Table des matières

1. Formation de gouttes, gélification, passage de l'interface.....	150
1.1 Formation de gouttes	151
1.2 Gélification.....	155
1.3 Passage de l'interface	155
2. Caractérisation de l'interaction système microfluidique - fluide	158
2.1 Angle de contact	159
2.1.1 Sur silicium silanisé.....	159
2.1.2 Sur COC silanisé	160
2.2 Tension interfaciale.....	161
3. Formation de gouttes	162
3.1 Mesures de micro-P.I.V.	162
3.1.1 Etude du taux de cisaillement lors de la formation de goutte.....	164
3.1.2 Etude du taux de cisaillement en fonction des pressions appliquées et des alginates	167
3.1.3 Temps de formation des gouttes	169
3.1.4 Corrélation taux de cisaillement-viabilité cellulaire	173
4. Gélification.....	174
5. Passage de l'interface huile-solution aqueuse de calcium.....	178
5.1 Observations expérimentales.....	178
5.2 Optimisation des propriétés du polymère	179
6. Bilan et production de capsules (choix du système microfluidique).....	181

1. Formation de gouttes, gélification, passage de l'interface

Après avoir préparé et caractérisé les solutions utilisées pour la phase dispersée, les capsules sont formées. Pour cela, un des 3 systèmes microfluidiques décrits dans le Matériel et Méthodes est utilisé (Système simplifié **MFFD200**, **MFFD550**, ou Système automatisé **GEL200**), dans lequel les fluides sont actionnés par un contrôleur en pression.

Dans ces différents systèmes microfluidiques, la phase dispersée d'alginate (alginate de référence SLG100, ou alginates PEGylés Système A, Système C et Alginate-Kétoprofène) est cisailée par la phase continue d'huile de soja, formant ainsi des gouttes. Ces gouttes sont pré-gélifiées à l'aide de la phase continue pré-gélifiante (huile de soja contenant des cristaux d'acétate de calcium), et enfin gélifiées complètement dans une solution aqueuse de calcium, soit dans la carte pour le système automatisé, soit à l'extérieur pour le système simplifié.

Au cours de cette thèse, le but était donc tout d'abord de réussir à produire des capsules vides avec ces alginates modifiés chimiquement, dans les différents systèmes microfluidiques développés au sein du laboratoire.

Afin de trouver les conditions optimales à utiliser, il est nécessaire de s'intéresser aux différents paramètres ayant une influence sur la formation de gouttes en microfluidique. Les propriétés des capsules obtenues dépendent de trois étapes critiques lors de leur formation, représentées Figure 78, qui sont les suivantes :

- La **formation des gouttes**, qui s'effectue dans la carte microfluidique (dans le module MFFD)
- La **pré-gélification des gouttes**, qui s'effectue également dans la carte microfluidique (dans le module pré-gel)
- Le **passage des gouttes à travers l'interface** huile-solution aqueuse de calcium (pour finir la gélification), qui s'effectue soit dans le système microfluidique (pour le système automatisé GEL200), soit en dehors (pour les systèmes simplifiés).

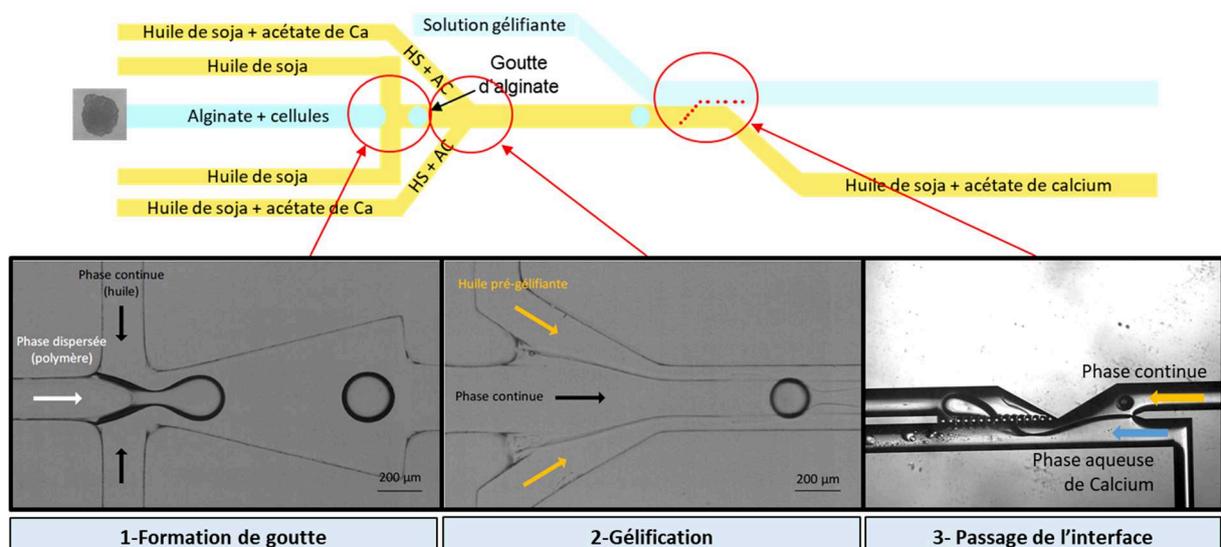


Figure 78 : Etapes critiques lors de la formation des capsules

Ces trois étapes sont gouvernées par différents paramètres, propriétés des fluides, et propriétés d'interaction entre les fluides et le système microfluidique (comme les paramètres géométriques, les propriétés de surfaces des canaux du MFFD, les débits de chaque phase, et les propriétés rhéologiques des fluides). Les différentes expériences de formation de capsules ayant tout d'abord été faites en MFFD550, et à des pressions d'huile de 300 mbar et d'huile pré-gélifiante de 350 mbar, les paramètres géométriques et les débits d'huile sont identiques. Le reste de ce chapitre s'intéressera donc uniquement aux propriétés de surface du système, et aux propriétés des fluides. Le Tableau 22 représente les étapes de formation de capsules sur lesquelles ces différents paramètres ont un impact (par des croix) :

	Viscosité	Elasticité	Tension interfaciale	Angle de contact
Formation de gouttes	X	X	X	X
Gélification	X			
Passage de l'interface	X		X	

Tableau 22 : Influence des propriétés des fluides et des interactions système microfluidique – fluides sur les différentes étapes de formation de capsules. Lorsqu'une croix est indiquée, la propriété a un impact sur l'étape de formation de capsule.

Les différentes théories entrant en jeu lors des phases critiques de la formation de capsules sont présentées plus en détail par la suite.

1.1 Formation de gouttes

Les différents régimes de formation de gouttes en MFFD sont rappelés en Figure 79. Ils ont précédemment été présentés dans l'Etat de l'Art, auquel il est donc possible de se référer pour plus de détails.

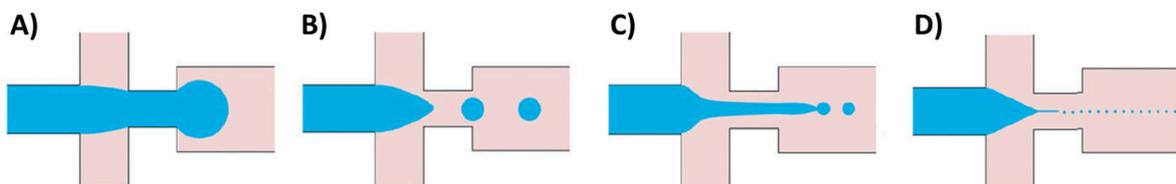


Figure 79 : Régimes de formation de goutte en géométries à focalisation d'écoulement : A) Pincement ; B) Goutte à goutte ; C) Régime de jet ; D) Tip-streaming

- Le régime de pincement ou squeezing forme des gouttes dont la taille est proche ou supérieure à celle de l'orifice
- Le régime de goutte à goutte (ou dripping) forme des gouttes monodisperses, de diamètre approximativement égal à la largeur de l'orifice
- Le régime de jet (ou jetting) forme des gouttes de taille beaucoup moins contrôlée, qui sont donc beaucoup moins monodisperses qu'en goutte à goutte, et généralement plus grosses
- Le régime de tip-streaming forme des gouttes de diamètre beaucoup plus petit que la largeur de l'orifice, mais uniquement en présence de tensioactif

Dans le cadre de l'encapsulation de cellules pancréatiques pour le diabète de type 1, deux paramètres sont importants :

- Contrôler précisément la taille des gouttes afin de fabriquer un produit reproductible : nous nous concentrons donc sur le régime de goutte à goutte (dripping).
- Maximiser la viabilité des cellules : l'utilisation des tensioactifs pouvant être néfaste pour les cellules, nous avons fait le choix de ne pas les utiliser.

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 comme les systèmes de génération de gouttes, les forces interfaciales s'ajoutent. Les forces élastiques interviennent également dans le cas d'écoulement de fluides viscoélastiques. Ces différentes forces sont définies comme suit :

- **Force d'inertie** : dans le cas d'un écoulement stationnaire, elle suit l'équation (16), où ρ est la densité (kg/m^3), et U la vitesse caractéristique du fluide (m/s).

$$F_{iner} = \rho U^2 \quad (16)$$

- **Forces visqueuses** : les forces de cisaillement visqueux s'exerçant sur la surface S à l'interface des deux phases sont définies par l'équation (17), où η est la viscosité dynamique du fluide (Pa.s), $\dot{\gamma}$ est le taux de cisaillement (s^{-1}), qui peut s'exprimer aussi par le rapport de la vitesse caractéristique du fluide U (m/s) sur la longueur caractéristique de l'écoulement L (m).

$$F_{visq} \sim \eta \dot{\gamma} S \sim \frac{\eta U}{L} S \quad (17)$$

Lors de la formation des gouttes, cette force a tendance à déformer l'interface entre les deux fluides. Par ailleurs, le fluide de phase dispersée étant entraîné par la phase continue, l'écoulement est également de type élongationnel. Les contraintes élongationnelles sont définies par l'équation (18), où μ est la viscosité élongationnelle et $\dot{\epsilon}$ est le taux d'élongation :

$$\sigma_{elong} = \mu \dot{\epsilon} \quad (18)$$

- **Force de tension interfaciale** ou capillaire : elle est présente dans le cas d'une interface entre deux fluides non miscibles, s'applique sur une surface S et est décrite par l'équation (19), où σ est la tension interfaciale entre les deux fluides (N.m^{-1}), S est la surface de l'interface (m^2), et κ est la courbure de l'interface (m^{-1}).

$$F_{cap} \sim \sigma \kappa S \quad (19)$$

Dans le cas d'une goutte sphérique de rayon R , $\kappa = \frac{1}{R}$. Dans le cas d'une goutte confinée dans un canal rectangulaire, $\kappa = \frac{2}{h} + \frac{2}{w}$ où h et w sont respectivement la profondeur et la largeur du canal. La tension interfaciale est quant à elle caractéristique des fluides, donc constante lors de la formation des gouttes.

La formation d'une interface entre deux fluides non miscibles représente un coût énergétique. Le système tend à minimiser l'énergie, et donc à minimiser l'interface entre les deux fluides.

Les écoulements étant déterminés par la compétition entre les forces présentées, plusieurs nombres adimensionnés ont été définis pour décrire ces écoulements :

- Le **nombre de Reynolds Re** (présenté dans l'Etat de l'Art) : il est défini par l'équation (20), où ρ est la masse volumique du fluide (kg/m^3) ; u est la vitesse du fluide (m.s^{-1}) ; l est une longueur caractéristique du système ; et η est la viscosité dynamique du fluide (Pa.s).

$$Re = \frac{F_{iner}}{F_{visq}} = \frac{\rho ul}{\eta} \quad (20)$$

Il compare les forces d'inertie aux forces visqueuses. Dans notre cas, le nombre de Reynolds de la phase continue est :

$$Re = \frac{\rho ul}{\eta} = \frac{0,92 \times 2,5 \times 0,8}{50,7} \approx 0,04$$

(Où la vitesse est exprimée en mm.s^{-1} et la viscosité en mPa.s). Les forces d'inertie sont donc négligeables et les écoulements résultent de l'équilibre entre les forces visqueuses et interfaciales.

- Le **nombre Capillaire Ca**, défini par l'équation (21) (pour la phase continue ou dispersée), où η est la viscosité dynamique du fluide (Pa.s), u est la vitesse du fluide (m.s^{-1}), Q est le débit de la phase considérée ($\text{m}^3.\text{s}^{-1}$), σ est la tension interfaciale (N.m^{-1}), et S est la section du canal.

$$Ca = \frac{F_{visq}}{F_{cap}} = \frac{\eta u}{\sigma} = \frac{\eta Q}{\sigma S} \quad (21)$$

En microfluidique, les effets inertiels étant négligeables, le nombre Capillaire est 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 $10^{331,332}$ signifiant que les forces capillaires peuvent être soit dominantes, comparables, ou négligeables devant les forces visqueuses.

Dans notre configuration, pour la phase continue, on a :

$$Ca = \frac{\eta u}{\sigma} = \frac{50,7 \times 2,5}{25,1} \approx 5$$

Les effets visqueux et capillaires sont donc importants dans notre système.

- Le **nombre de Weber We**, défini par l'équation (22), où ρ est la masse volumique du fluide (kg/m^3) ; u est la vitesse du fluide (m.s^{-1}) ; l est une longueur caractéristique du système, et σ est la tension interfaciale (N.m^{-1}).

$$We = \frac{F_{iner}}{F_{cap}} = \frac{\rho lu^2}{\sigma} = Re \times Ca \quad (22)$$

Il compare les effets inertiels à la tension interfaciale, et est généralement défini pour la phase dispersée. Il est égal au produit du nombre de Reynolds et du nombre Capillaire, et vaut 0,2 dans notre configuration. Les effets capillaires dominent donc les effets inertiels dans notre système.

Dans le régime de dripping, les contraintes visqueuses jouent 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. Les gouttes formées ont alors un diamètre inférieur à la taille de l'orifice.

Les différentes études expérimentales ont montré que pour un rapport de débits fixe, le volume V des gouttes est relié au nombre Capillaire de la phase continue par la relation (23), où $\beta \leq 1$ ³³³⁻³³⁵:

$$V \propto Ca_c^{-\beta} \quad (23)$$

Le nombre Capillaire étant le nombre qui compare les effets visqueux aux effets capillaires, cela signifie que la formation de gouttes en dripping est contrôlée par un équilibre entre les forces visqueuses et les forces interfaciales (capillaires).

Différentes études numériques se sont intéressées à la modélisation du mécanisme de formation de goutte en géométrie MFFD. Une simulation en 3D avec des canaux rectangulaires a été proposée par Wu *et al.*³³⁶ Leur modèle, validé par des résultats expérimentaux, présente la rupture de jet et formation de goutte comme étant déterminée par une compétition entre :

- La force de tension interfaciale qui s'oppose à l'élongation du jet de phase dispersée et au détachement de la goutte
- La force de trainée visqueuse, exercée par la phase continue sur la phase dispersée, qui est la principale force favorisant la rupture
- La force d'inertie de la phase dispersée, qui contribue également au détachement de la goutte

Ainsi, lorsque les forces de trainée visqueuse et d'inertie deviennent supérieures à la force de tension interfaciale, le jet de phase dispersée se rompt, et la goutte se détache. La goutte reprend ensuite sa forme sphérique grâce à la tension interfaciale.

A ces trois forces entrant en jeu s'ajoutent les forces élastiques du polymère. En effet, une augmentation de l'élasticité de la phase dispersée augmente le temps nécessaire au détachement de la goutte et par conséquent diminue la fréquence de production⁸

D'après les équilibres des forces entrant en jeu lors de la formation de gouttes décrits précédemment, on peut donc voir que les propriétés des fluides ayant un impact sur la formation de goutte sont les propriétés rhéologiques (la viscosité et la viscoélasticité) ; et la tension interfaciale.

Ces propriétés ont donc été caractérisées (voir chapitre IV et partie 2.2 de ce chapitre), et les résultats obtenus et leur impact sur la formation de gouttes sont présentés par la suite. Les paramètres impactés qui nous intéressent particulièrement dans cette partie sont :

- Le temps nécessaire au détachement d'une goutte de phase dispersée, qui influe logiquement sur la fréquence de production des gouttes. En effet, un polymère pour lequel un détachement de gouttes est très long engendrera une durée d'encapsulation beaucoup plus longue qu'un polymère pour lequel le détachement est rapide, pour le même nombre d'îlots à encapsuler. Or le nombre d'îlots nécessaires pour une transplantation est important (voir Etat de l'Art), et si la durée d'encapsulation est trop longue, les cellules n'ayant pas d'oxygène et de nutriments pendant la production, survivent moins bien.
- La production de gouttes satellites et la monodispersité des gouttes obtenues. En effet, la présence de gouttes satellites peut influencer sur le risque de protrusion d'îlots dans ces gouttes (dont le diamètre n'est pas adapté à la taille des îlots), et par conséquent de reconnaissance du système immunitaire dans le cadre d'une implantation *in vivo*. Cela peut également affecter la monodispersité des capsules produites et donc la reproductibilité du produit thérapeutique formé.

1.2 Gélification

La gélification des gouttes formées dans le système microfluidique a lieu en deux étapes :

- La pré-gélification dans le module de pré-gel, à l'intérieur de la carte microfluidique
- La gélification totale dans la phase aqueuse de calcium, qui a lieu soit dans la carte microfluidique pour le système automatisé GEL200, soit en extérieur de cartes pour les systèmes simplifiés.

Dans cette partie, nous nous intéressons à la phase de pré-gélification, car c'est elle qui détermine l'état des gouttes lorsqu'elles passent l'interface huile-solution aqueuse gélifiante : les gouttes doivent être suffisamment gélifiées pour que leur forme sphérique soit maintenue lors du passage de l'interface.

Cette étape de pré-gélification consiste en un apport de l'huile pré-gélifiante (huile de soja contenant de l'acétate de calcium) en co-écoulement au-dessus et en-dessous de la phase continue d'huile portant les gouttes. Ces gouttes sont ainsi gélifiées par diffusion des ions calcium, tout en étant continuellement cisailées par les huiles.

Il a été établi que la vitesse de gélification de l'alginate est régie par la diffusion des ions calcium³⁰⁹, et le coefficient de diffusion d'un soluté dans un solvant est défini par la loi de Stokes-Einstein (équation (24)), où k est la constante de Boltzmann, T est la température, r est le rayon équivalent de la particule, et μ est la viscosité dynamique du solvant.

$$D = \frac{kT}{6\pi r\mu} \quad (24)$$

La viscosité de l'alginate a donc un effet direct sur la diffusion, et sur la cinétique de gélification.

1.3 Passage de l'interface

Les gouttes une fois pré-gélifiées doivent passer l'interface huile-solution aqueuse de calcium, afin de finir leur gélification et être récupérées dans la solution gélifiante. Dans le cas de l'utilisation du dispositif microfluidique simplifié, cette interface se situe dans un tube-falcon en sortie de carte dans lequel sont récupérées les capsules pré-gélifiées (la phase continue étant de l'huile, en réceptionnant les gouttes pré-gélifiées, on obtient donc dans le falcon de sortie une phase aqueuse gélifiante, au-dessus de laquelle s'accumule la phase continue d'huile). Dans le cas de l'utilisation du dispositif automatisé GEL200, l'interface se situe au niveau du 1^{er} transfert de phase (voir Matériel et Méthodes), et la coalescence des capsules avec la phase aqueuse est facilitée par l'application de pressions.

Différentes études se sont intéressées au passage de billes solides ou de gouttes liquides au travers d'une interface liquide-liquide³³⁷⁻³⁵¹. La revue de Kamp *et al.*³⁵² présente de manière détaillée les mécanismes entrant en jeu pour la coalescence de deux gouttes de phase dispersée dans une phase continue. La coalescence d'une goutte sur une interface plate n'est alors autre que la condition limite de la coalescence de deux gouttes (la deuxième goutte ayant un rayon infini). Dans notre cas, la phase continue est alors l'huile, et les phases dispersées sont la goutte aqueuse d'alginate, et la solution aqueuse gélifiante. Les mécanismes de coalescence sont les suivants :

- Approche de la goutte vers l'interface

- Contact et déformation : formation d'un film de phase continue (huile) entre les deux interfaces
- Drainage du film de phase continue, dû à une baisse de pression entre le milieu du film et la périphérie de la goutte, elle-même causée par la pression capillaire et les interactions de Van-der-Waals³⁵². Le temps nécessaire entre le contact de la goutte et la fin du drainage du film est défini par t_{drainage} .
- Coalescence : elle a lieu lorsque la distance h entre les deux surfaces passe en-dessous d'une distance critique h_{crit} . En dessous de cette distance critique, les deux surfaces fusionnent spontanément, suivant le mécanisme suivant : Des ondes de surface³⁴¹ provoquent des petits trous dans le film, puis la tension interfaciale agrandit ces trous jusqu'à expulser complètement le film. Le temps nécessaire à la rupture du film est défini par t_{rupture} .

Dans le cas de deux gouttes, si le temps de contact des gouttes est inférieur au temps nécessaire au drainage du film, il y a alors répulsion des gouttes ; et si la distance h entre les deux surfaces ne passe jamais en-dessous de h_{crit} , alors il y a agglomération des gouttes. Les différentes configurations possibles sont représentées en Figure 80. Nous nous intéresserons ici uniquement au cas de figure où les gouttes coalescent, dont la condition limite (un des deux rayons de goutte est de longueur infinie) modélise le passage d'une goutte à l'interface huile-phase aqueuse.

Dans cette configuration, on obtient alors le temps de coalescence par :

$$t_{\text{coalescence}} = t_{\text{drainage}} + t_{\text{rupture}}$$

Le temps de drainage est largement supérieur à celui de rupture, c'est donc lui qui détermine principalement le temps de coalescence, et c'est la raison pour laquelle de nombreux auteurs choisissent de modéliser le temps de drainage afin de déterminer le temps de coalescence.

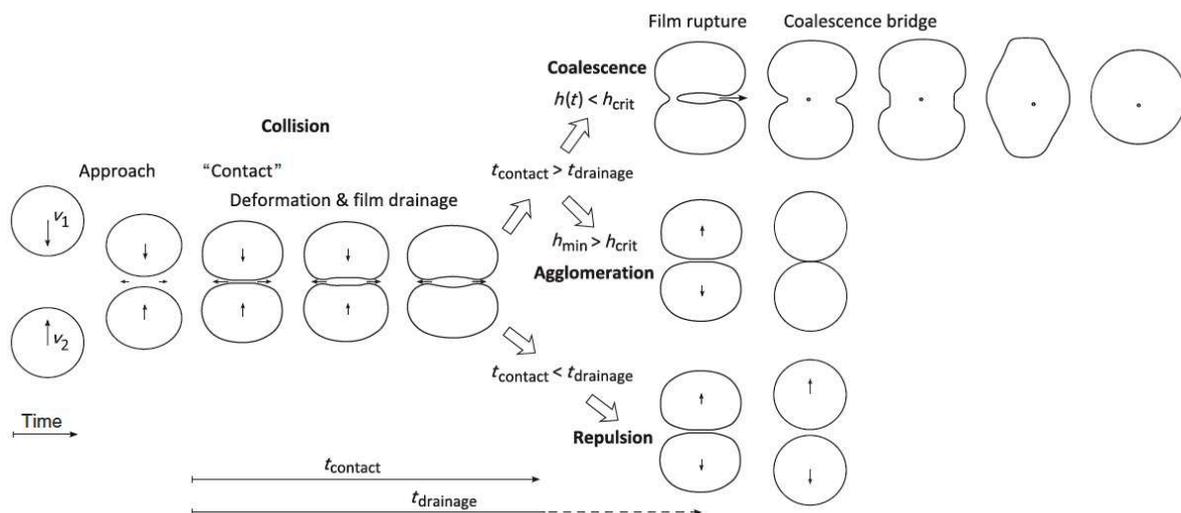


Figure 80 : Schémas représentant les différentes configurations possibles lors du contact de deux gouttes, et leurs mécanismes³⁵².

Les forces entrant en jeu lors de la coalescence sont complexes, et de nombreux paramètres influencent le temps de drainage et de rupture. Ils peuvent être classés en trois catégories : les paramètres de la phase continue, de l'interface, et de la phase dispersée. Dans notre cas, la phase continue est toujours identique, donc nous nous intéresserons uniquement aux paramètres de l'interface et de la phase dispersée, qui sont les suivants :

- **Interface** : tension interfaciale, potentiel de surface, composants actifs à la surface (tensioactif, ions...), transfert de masse.
- **Phase dispersée** : viscosité, densité, diamètre de goutte, force ionique et pH.

Dans le cadre de notre étude, l'interface ne possède aucun composant actif, et il n'y a pas de transfert de masse. Concernant le potentiel de surface, les forces électrostatiques en jeu sont fortement influencées par la présence d'ions et le pH de la phase aqueuse, qui déterminent s'il y a des effets électrostatiques répulsifs, mais aucune tendance générale n'a pu être observée concernant leur influence sur la coalescence³⁵². Le paramètre prépondérant est donc la tension interfaciale.

Une augmentation de la tension interfaciale entraîne deux phénomènes opposés en termes de temps de coalescence :

- Une réduction de la déformation des gouttes, et donc de l'aire du film de phase continue et du temps de drainage, ce qui entraîne une réduction du temps de coalescence.
- Une diminution de la mobilité de surface, ce qui tend à bloquer le flux de drainage du film et donc à augmenter le temps de drainage et de coalescence.

Cependant, l'effet de l'aire de drainage est plus important, et lorsque la tension interfaciale augmente, la probabilité de coalescence augmente et le temps de coalescence diminue³⁵².

Concernant les paramètres de la phase dispersée, l'influence de la taille de la goutte n'a pas été clairement définie. Certaines équipes témoignent d'une augmentation du temps de coalescence lorsque le diamètre de goutte augmente^{338,341,344,346}, d'autres témoignent d'une réduction³⁴⁸⁻³⁵¹. La revue de Kamp *et al.*³⁵² résume l'influence du diamètre de goutte comme suit : si la goutte est de l'ordre de quelques micromètres, elle reste sous forme sphérique, ce qui donne lieu à un régime équivalent à une sphère solide approchant l'interface, et sans film de phase continue. Dans ce régime, le temps de coalescence diminue lorsque le diamètre de la goutte augmente. Lorsque la goutte atteint une certaine taille et devient déformable, le film de drainage se forme. Dans ce régime, une augmentation du diamètre de goutte entraîne une augmentation de l'aire du film, et donc du temps nécessaire à son drainage, ainsi que du temps de coalescence. Dans notre cas, les tailles des gouttes sont quasiment constantes donc n'ont que très peu d'effet sur la coalescence. Leur influence n'a donc pas été étudiée.

Concernant la densité de la phase dispersée par rapport à celle de la phase continue, si la différence entre les deux diminue (dans notre cas, la densité de la phase continue d'huile est constante et inférieure à celle de la phase dispersée d'alginate, donc une diminution de la différence entre les deux correspond à une diminution de la densité de l'alginate), le temps de drainage du film augmente, et le temps de coalescence aussi. Quant à la viscosité, il est plus pertinent de s'intéresser au rapport de viscosités entre celle de la phase dispersée (μ_1) et celle de la phase continue (μ_2) : quand $\frac{\mu_1}{\mu_2}$ augmente, le temps de coalescence diminue³⁵³. Dans notre cas, la viscosité de la phase continue reste constante, donc quand la viscosité de l'alginate augmente, le temps de coalescence diminue.

La Figure 81 rassemble les différents paramètres ayant une influence sur la coalescence.

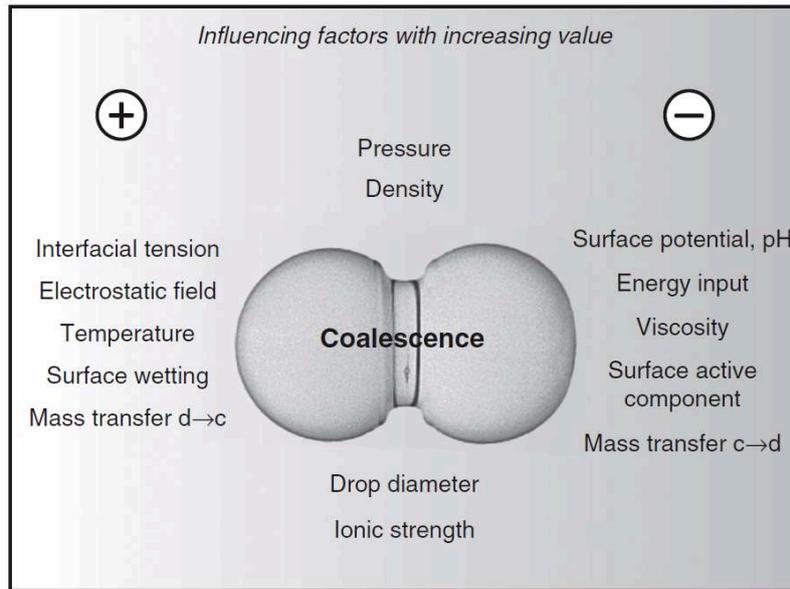


Figure 81 : Facteurs influençant la probabilité de coalescence de deux gouttes, classés en 2 parties : ⊕ favorisent la coalescence, ⊖ inhibent la coalescence, pour une augmentation des grandeurs considérées. Les paramètres dont l'influence est neutre, n'a pas été clairement identifiée, ou peut aller dans les deux sens, sont situés au milieu ³⁵²

Les paramètres à retenir par rapport à la coalescence de goutte dans notre application sont donc la tension interfaciale, la viscosité, et la densité des alginate, et pour conclure, leur impact est le suivant :

- Une augmentation de la tension interfaciale entraîne une augmentation de la probabilité de coalescence et une diminution du temps de coalescence
- Une augmentation de la densité de l'alginate entraîne une réduction du temps de coalescence
- Une augmentation de la viscosité de l'alginate entraîne une diminution du temps de coalescence

Parmi ces paramètres, celui ayant un impact prépondérant est malgré tout la tension interfaciale, puisque la coalescence est un phénomène dicté par la minimisation de l'aire et de l'énergie interfaciale³⁵².

2. Caractérisation de l'interaction système microfluidique - fluide

Les caractérisations de l'interaction entre le système microfluidique et les fluides utilisés effectuées au cours de cette thèse sont les suivantes :

- Caractérisation de l'hydrophobicité de la surface des canaux
- Mesure de la tension interfaciale entre la phase dispersée (alginate) et la phase continue (huile de soja)

L'hydrophobicité, ou plus précisément la mouillabilité d'un liquide sur une surface solide se caractérise à l'aide de la mesure de l'angle de contact par la méthode de la goutte sessile : une goutte du liquide étudié est déposée sur la surface étudiée, et l'angle formé par l'intersection de

l'interface liquide/solide et de l'interface liquide/air est mesuré. Un angle de contact inférieur à 90° indique une affinité chimique élevée entre le liquide et la surface, et donc une mouillabilité élevée. Un angle de contact supérieur à 90° indique une faible affinité chimique, et donc un faible degré de mouillabilité. Les différents types de matériau en fonction de l'angle de contact obtenu sont rassemblées dans la Figure 82 :

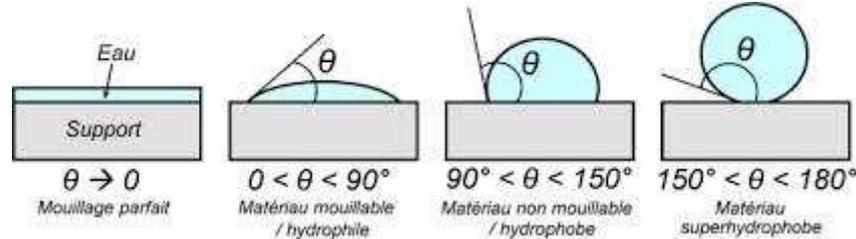


Figure 82 : Schéma représentant les différentes catégories d'angle de contact, et le type de matériau correspondant³⁵⁴

Dans le cadre de la formation de gouttes d'alginate en microfluidique, les canaux doivent être le plus hydrophobe possible, afin que l'huile s'écoule facilement, et que les gouttes de solution aqueuse n'accrochent pas. Afin de caractériser l'affinité des alginates avec la surface des canaux, l'angle de contact entre les différents alginates et les différentes surfaces utilisées a donc été mesuré, en huile de soja. Les résultats obtenus sont présentés dans la suite de cette partie.

2.1 Angle de contact

Les mesures d'angle de contact ont été faites en respectant le protocole décrit dans le Matériel et Méthodes. Comme expliqué précédemment, deux différents types de systèmes microfluidiques ont été utilisés, et selon le type de système, le matériau utilisé pour former les canaux des modules de MFFD, pré-gélification et transfert de phase n'est pas le même :

- Dans le système microfluidique simplifié : la totalité de la carte microfluidique est en COC, y compris les modules de MFFD et pré-gélification
- Dans le système microfluidique automatisé : les modules de MFFD, pré-gélification, et transferts de phase sont contenus dans une puce en silicium, et le reste (canaux de pré-gélification et gélification) est contenu dans la partie en COC de la carte.

Comme expliqué précédemment, ces canaux doivent être le plus hydrophobes possible afin que l'huile s'écoule facilement, et que les gouttes d'alginate ne s'accrochent pas. Pour cela, un traitement de surface, greffant des groupements silanes (hydrophobes), est appliqué sur les surfaces des canaux (voir Matériel et Méthodes). Ce traitement peut être appelé également silanisation.

Les mesures d'angle de contact entre les alginates et ces surfaces permettent donc tout d'abord de vérifier l'hydrophobicité des surfaces obtenue, et de comparer l'affinité entre les alginates et les surfaces, en fonction des alginates.

2.1.1 Sur silicium silanisé

La Figure 83 rassemble les résultats obtenus pour l'alginate de référence, à deux concentrations différentes, ainsi que pour le Système A, pour deux lots différents, sur du silicium silanisé.

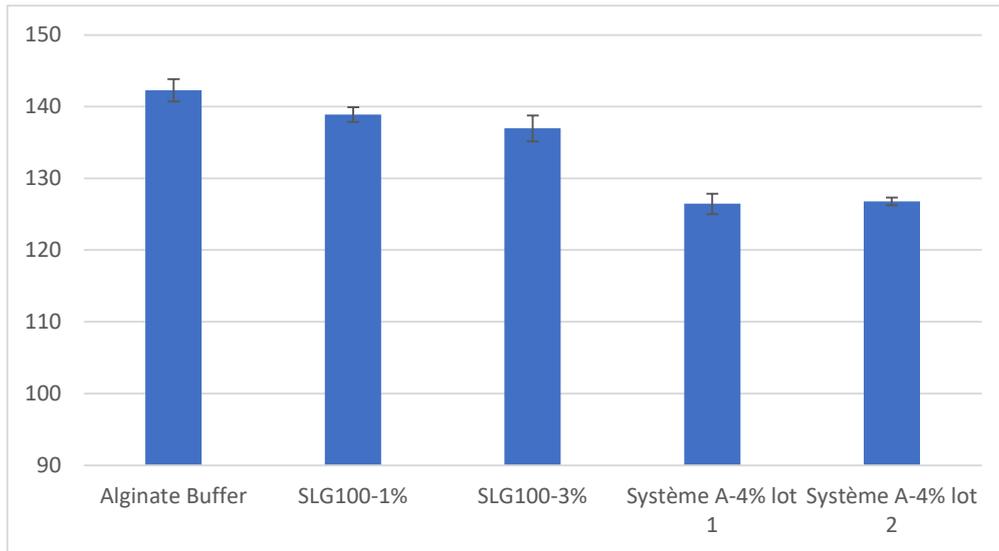


Figure 83 : Résultats obtenus pour les mesures d'angles de contact des différents alginates sur une surface de silicium silanisé

Les valeurs obtenues sont toutes largement supérieures à 90°, on a donc bien une surface hydrophobe. Cependant, on peut voir que l'angle de contact est plus faible pour l'alginate Système A que pour l'alginate de référence. Le Système A présente donc plus de mouillabilité avec la couche de silanisation que l'alginate de référence.

On peut voir également que la concentration en alginate pour l'alginate de référence ne semble pas influencer la valeur d'angle de contact obtenu. Par ailleurs, les résultats semblent également reproductibles entre 2 lots différents d'alginate Système A.

Cela peut avoir un impact lors de la formation de gouttes : l'alginate peut accrocher aux canaux, et la goutte peut se détacher plus difficilement. Cependant, ces problèmes n'ont pas été observés lors des expériences de production de capsules. On peut donc en déduire que les différences de valeurs observées ne sont pas problématiques pour une utilisation en système microfluidique automatisé, les surfaces des canaux de silicium sont suffisamment hydrophobes pour les différents alginates.

2.1.2 Sur COC silanisé

La Figure 84 rassemble les résultats d'angles de contact obtenus pour l'alginate de référence et les différents alginates PEGylés, sur du COC silanisé.

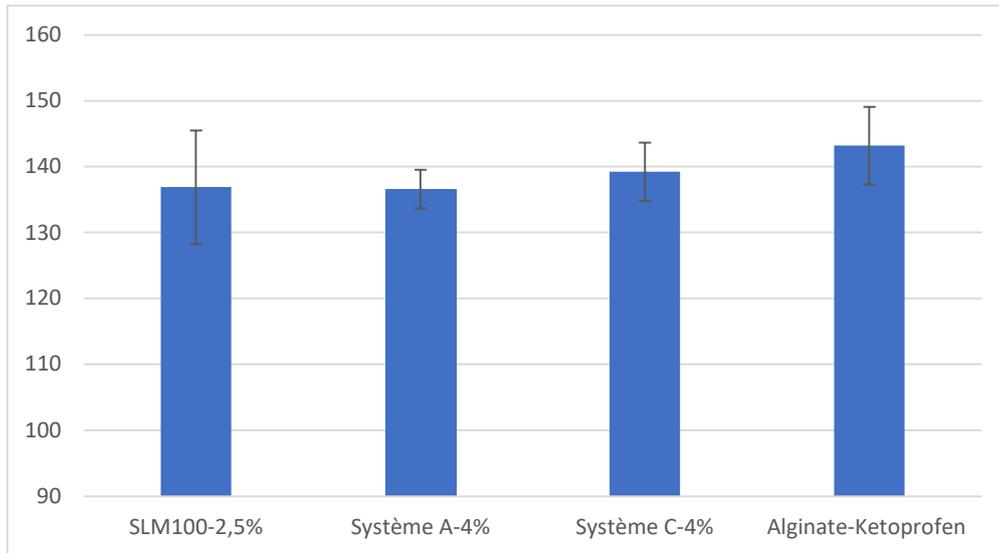


Figure 84 : Résultats obtenus pour les mesures d'angles de contact des différents alginates sur une surface de COC silanisé

On peut voir que les valeurs des angles de contact des différents alginates sur COC silanisé sont quasiment identiques. Il est important de noter cependant que le Système A mesuré sur COC silanisé n'est pas le même lot que les deux Système A mesurés sur silicium silanisé.

En conclusion, quel que soit le **type et lot d'alginate**, la **surface silanisée des canaux de COC est suffisamment hydrophobe pour éviter des problèmes d'accroche d'alginate** lors de la formation de gouttes.

2.2 Tension interfaciale

Dans de nombreuses études, la tension interfaciale est étudiée afin de déterminer son influence sur le détachement des gouttes et leur taille. Dans notre cas, la taille des gouttes n'est pas étudiée, mais il est intéressant d'avoir des informations sur la facilité de détachement de goutte, et donc sur la fréquence de production. Comme vu dans la partie 1.1, pour un polymère présentant une tension interfaciale plus élevée, les forces de traînée visqueuses et inertielles devront être d'autant plus importantes afin de détacher une goutte en formation et le temps de formation de gouttes peut donc être réduit.

La tension interfaciale a également un impact sur le passage de l'interface huile-solution aqueuse des capsules pré-gélifiées : une augmentation de la tension interfaciale entraîne une diminution du temps de coalescence (partie 1.3)

Cette grandeur a donc été caractérisée pour les différents alginates, en huile de soja, et les résultats obtenus sont présentés en Figure 85.

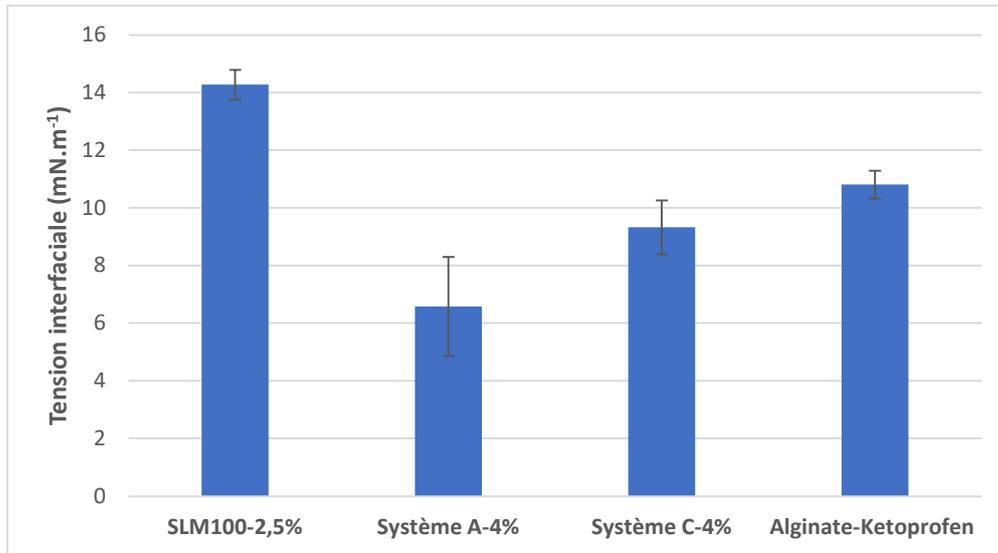


Figure 85 : Tensions interfaciales pour les différents polymères en huile de soja

On peut voir que ces valeurs sont plus faibles pour les alginates modifiés chimiquement que pour l'alginate de référence, et en particulier pour le Système A. Nous verrons en partie 3.1.3 que ces propriétés ont effectivement une influence sur la production des capsules.

3. Formation de gouttes

La formation de goutte est étudiée suivant différents aspects :

- Des mesures de micro-PIV ont permis de déterminer les taux de cisaillement (et d'en déduire les contraintes de cisaillement) présents au sein du MFFD lors de la formation d'une goutte
- Le temps de formation de goutte a été étudié
- Les valeurs de contraintes de cisaillement obtenues ont été comparées avec la littérature, afin de déterminer si le système microfluidique peut avoir un impact négatif sur la viabilité des cellules

3.1 Mesures de micro-P.I.V.

Les mesures de Micro-Particle Image Velocimetry (μ P.I.V.) permettent de caractériser les écoulements, par la mesure du taux de cisaillement appliqué aux différents alginates lors de la formation de gouttes. Ces mesures ont été effectuées selon le protocole défini dans le Matériel et Méthodes a été utilisé.

Ces analyses ont deux principaux objectifs :

- Connaître la viscosité des alginates lors de la formation de goutte, car comme expliqué dans le chapitre Pré-Encapsulation, les alginates étant non Newtonien, leur viscosité dépend du taux de cisaillement. Or il est important de connaître la viscosité des alginates, car elle a une influence sur la formation des gouttes, comme cela sera vu dans la partie 1.1.

- Connaître le taux de cisaillement maximal appliqué aux alginate. En effet, le but étant d'encapsuler des cellules afin de les greffer, les alginate contiennent à terme ces cellules, et l'étape de formation de gouttes (qui est celle où le cisaillement est le plus important) ne doit pas affecter leur viabilité.

La méthodologie adoptée pour interpréter les champs de cisaillement obtenus a été la suivante :

Tout d'abord, nous avons comparé les taux de cisaillement obtenus en différents points de la goutte d'alginate (bordure, intérieur). Cette première étape a permis de déterminer que le taux de cisaillement est de 10 s^{-1} maximum à l'intérieur de la goutte, et de plusieurs dizaines à plusieurs centaines (en fonction des pressions d'huile et d'alginate) en bordure de goutte (Figure 86 D).

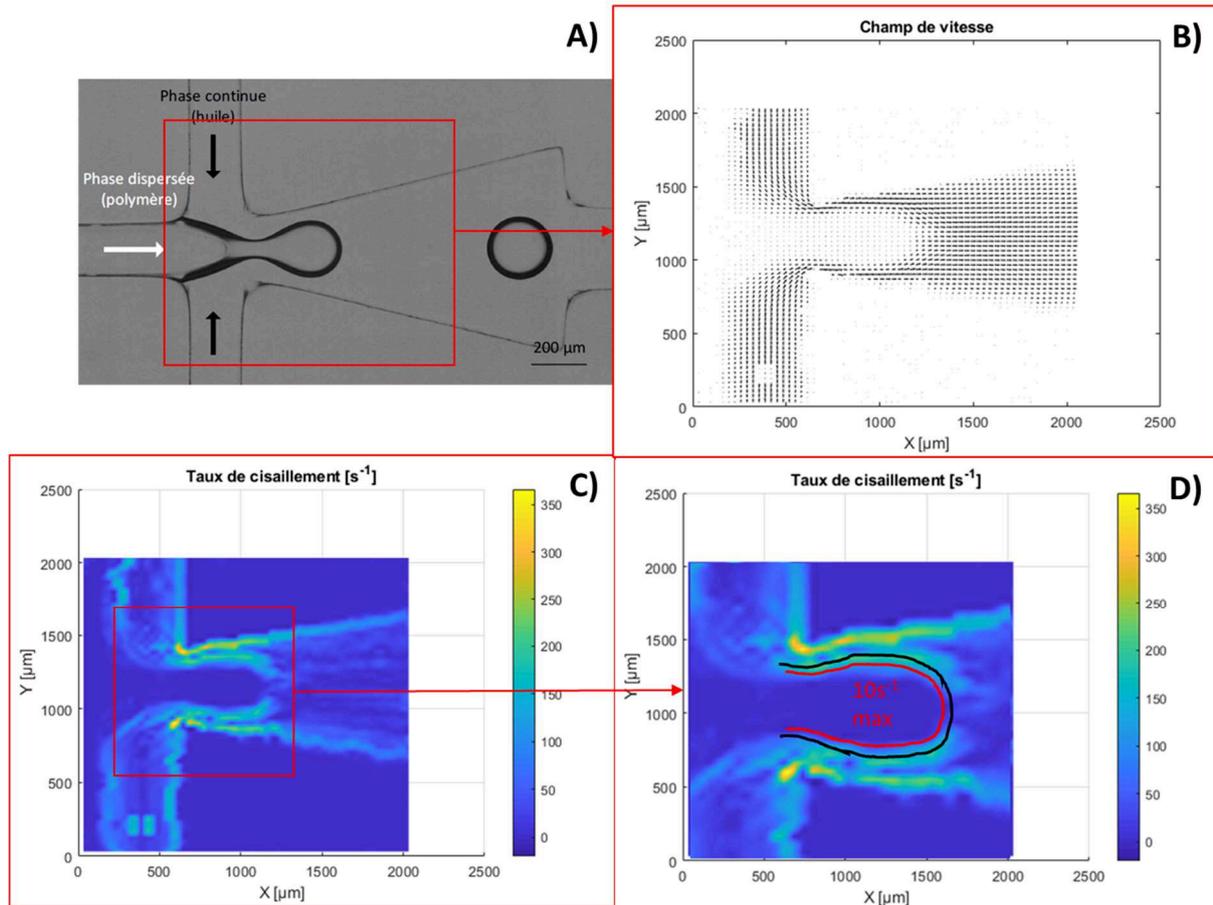


Figure 86 : Exemple de champs de cisaillement obtenu grâce aux analyses de $\mu\text{P.I.V.}$ lors de la formation de la goutte dans le canal microfluidique au niveau du MFFD. A) exemple d'une image de formation de goutte en lumière blanche ; B) Exemple d'un champ de vitesse obtenu par analyse $\mu\text{P.I.V.}$. Ce champ de vitesse ne correspond pas à l'image A) ; C) Champ de cisaillement obtenu à partir du champ de vitesse B) ; D) Zoom du champ de cisaillement : la ligne noire représente le contour de la goutte, et la ligne rouge représente la zone de cisaillement maximal

Le taux de cisaillement est donc maximal en bordure de goutte, comme le montre la Figure 86 D, où la ligne noire représente la délimitation de la goutte, la ligne rouge représente la zone de cisaillement maximale au sein de l'alginate, et les cisaillements présents à l'intérieur de la goutte d'alginate sont d'environ 10 s^{-1} maximum.

Le taux de cisaillement n'est donc pas homogène au sein de la goutte, et les polymères étant non Newtoniens rhéofluidifiants, cela signifie que la viscosité n'est pas non plus homogène au sein de la goutte, et la contrainte de cisaillement en résultant également. Cela peut avoir un impact sur la formation de goutte, mais également sur la viabilité des cellules (cet aspect sera étudié dans la partie 3.1.4), et sur la gélification des gouttes (cet aspect sera vu dans la partie 4).

Suite à cette observation, les différents champs de cisaillement ont été étudiés individuellement, afin de déterminer s'il y a, au sein même de cette zone de bordure de l'alginate (ligne rouge sur la Figure 86), une zone plus spécifique où le cisaillement est maximal. On a ainsi pu observer que sur chaque champ de cisaillement, le cisaillement est maximal plus précisément au niveau du pincement de l'alginate, comme le montrent les cercles rouges sur la Figure 87. Il y a également un fort cisaillement au niveau des parois du canal dans la zone de rétrécissement. Il est dû à l'écoulement de l'huile entre la goutte et la paroi. Comme à la paroi la vitesse est nulle, le cisaillement est fort.

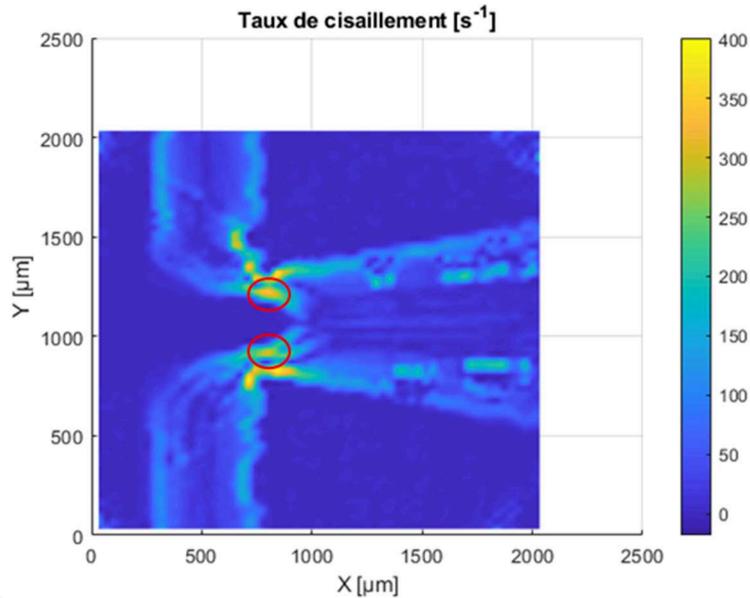


Figure 87 : Exemple de champs de cisaillement obtenu grâce aux analyses de P.I.V. Les cercles rouges représentent les zones de cisaillement maximal

Dans le cadre de cette étude, le but étant de déterminer les conditions de cisaillement expérimentées par les cellules dans l'alginate, afin de vérifier que même le cisaillement maximal n'est pas néfaste pour ces dernières ; nous nous sommes donc intéressés par la suite uniquement aux valeurs de cisaillement au niveau du pincement pour chaque champ de cisaillement. Ceci a donc permis de déterminer l'évolution du taux de cisaillement maximal au cours de la formation d'une goutte. Les résultats sont présentés dans la partie suivante.

3.1.1 Etude du taux de cisaillement lors de la formation de goutte

Comme expliqué précédemment, le but de cette première partie est de déterminer l'évolution du taux de cisaillement au cours de la formation de goutte, pour chaque polymère. Cette étude peut ainsi permettre de déterminer s'il y a un schéma récurrent, et en fonction de ces résultats, quelle méthodologie choisir pour comparer les polymères entre eux.

Etant donné que le cisaillement maximal est situé au niveau du pincement de l'alginate par l'orifice du MFFD, pour la suite des analyses, une moyenne du cisaillement sur cette zone est calculée, pour chaque champ de cisaillement, et chaque alginate. On peut ainsi tracer l'évolution de cette valeur moyenne de cisaillement maximal en fonction du temps, pour chaque vidéo de formation de

goutte. Ceci a donc été effectué pour chaque polymère, à différentes pressions d'huile de soja (100 mbar, 200 mbar, 300 mbar et 400 mbar).

Un exemple de courbes obtenues, accompagné des images des champs de cisaillement des points critiques, est donné pour chaque polymère, en Figure 88 (SLG100), Figure 89 (Système A), Figure 90 (Système C), et Figure 91 (Alginate-Kétoprofène).

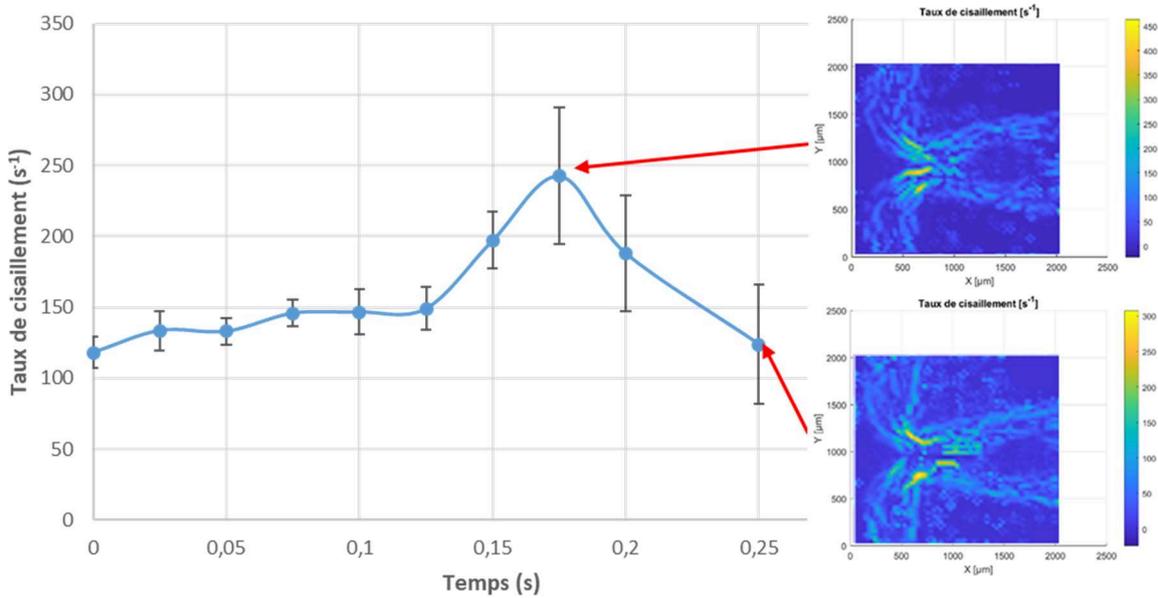


Figure 88 : Evolution du cisaillement au cours de la formation d'une goutte pour l'alginate SLG100 - 2,5%, et pour $P(\text{huile})=100$ mbar

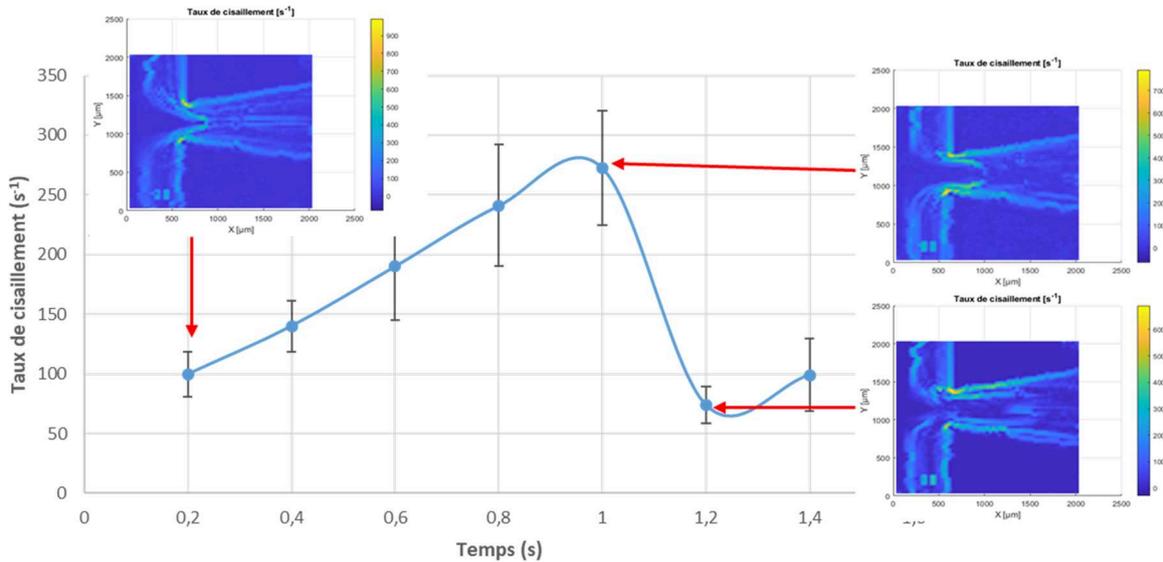


Figure 89 : Evolution du cisaillement au cours de la formation d'une goutte pour le Système A - 4%, et pour $P(\text{huile})=200$ mbar

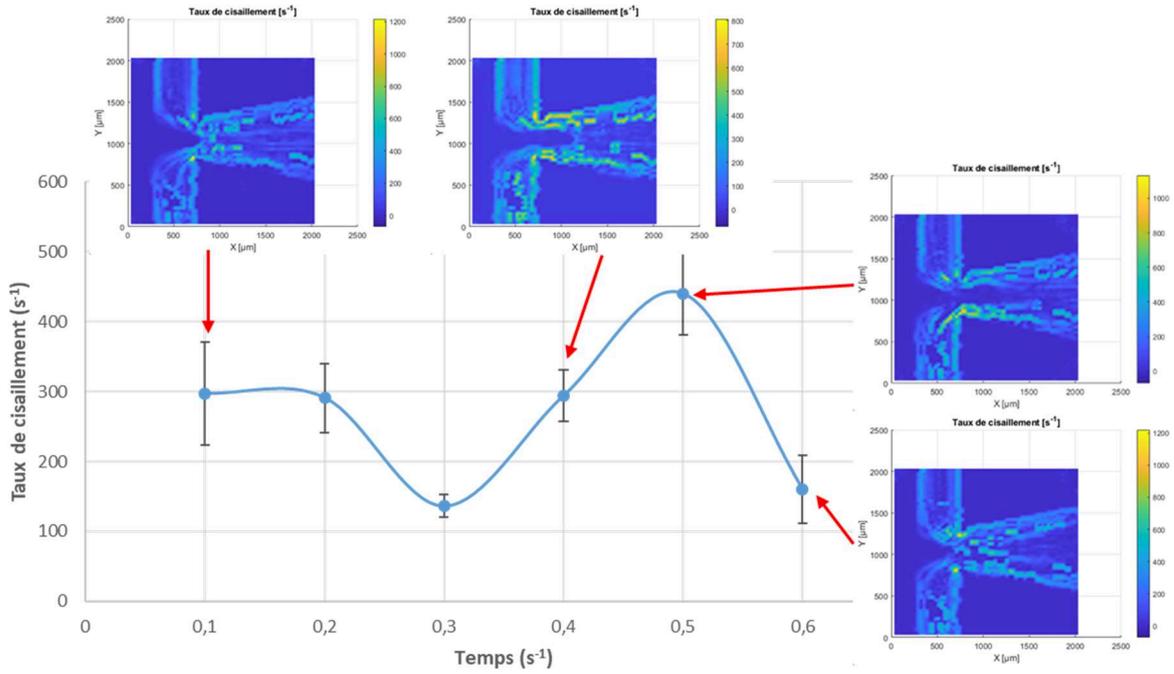


Figure 90 : Evolution du cisaillement au cours de la formation d'une goutte pour le Système C - 4%, et pour $P(\text{huile})=300 \text{ mbar}$

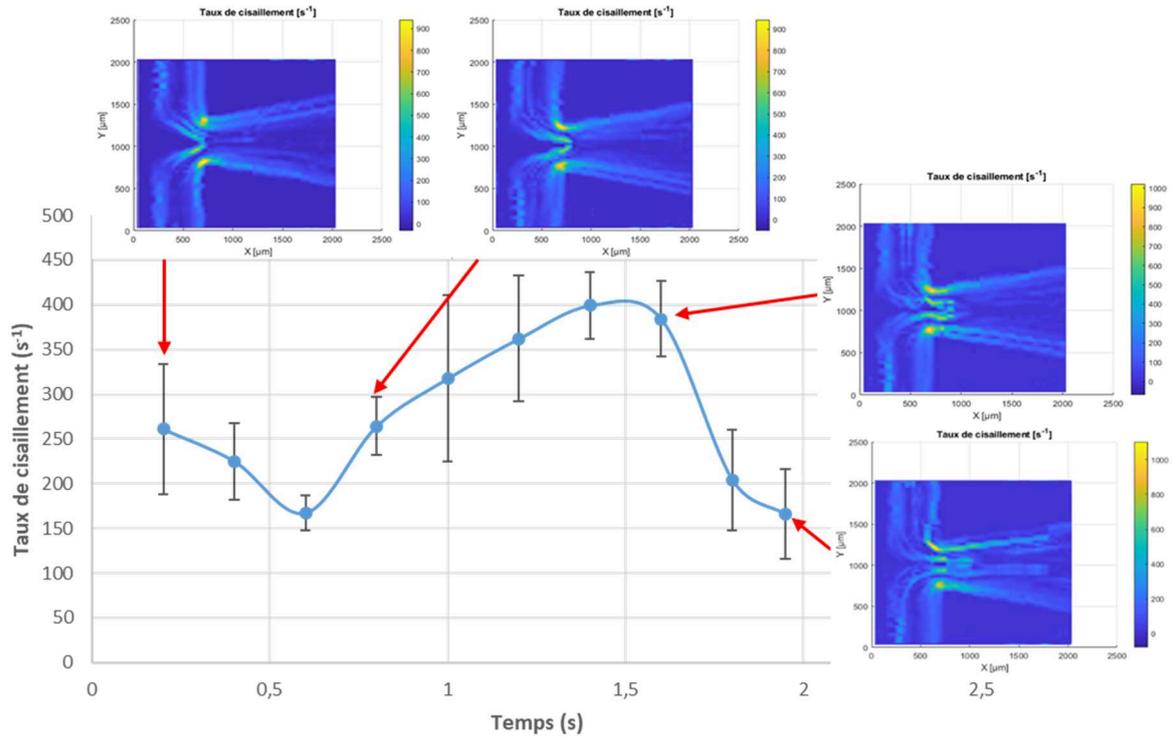
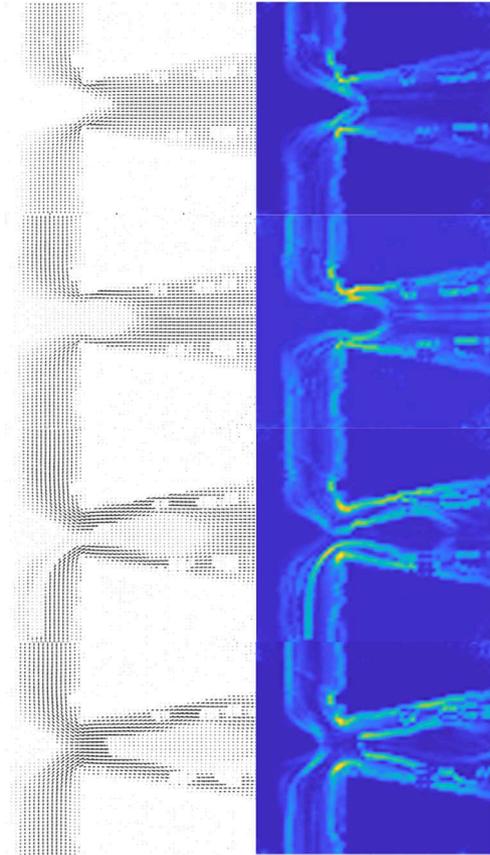


Figure 91 : Evolution du cisaillement au cours de la formation d'une goutte pour l'alginate-Kétoprofène - 4% pour $P(\text{huile})=200 \text{ mbar}$

Ces différents graphiques montrent que le profil de courbes est similaire quels que soient l'alginate et les pressions : les courbes montrent le cycle de formation de la goutte depuis le début

de pincement de la phase dispersée jusqu'au détachement de la goutte. Les différentes étapes sont représentées ci-dessous :



- Le taux de cisaillement est constant ou légèrement fluctuant au début de la formation de goutte, lorsque l'alginate commence tout juste à s'avancer dans la jonction MFFD.
- Le taux de cisaillement commence à augmenter lorsque l'alginate est au niveau de l'orifice du MFFD, et subit donc un pincement et un cisaillement plus important.
- Cette augmentation continue, jusqu'à atteindre le maximum juste avant le détachement de la goutte d'alginate.
- Après le détachement de la goutte d'alginate, le taux de cisaillement chute pour retomber à la valeur obtenue avant que l'alginate ne soit au niveau de l'orifice du MFFD.

Le temps nécessaire pour effectuer les différentes étapes et l'allure précise de la courbe varient selon l'alginate.

Ces observations permettent d'établir une méthodologie pour la suite des analyses. Comme expliqué précédemment, le but de ces mesures est de déterminer le cisaillement maximal subi par les cellules. Au vu de ces premières analyses, pour comparer le taux de cisaillement maximal appliqué sur chaque type d'alginate, en fonction des pressions d'huile appliquées, il a été décidé que la valeur mesurée et comparée pour chaque condition serait la moyenne du taux de cisaillement en bordure d'alginate, au niveau de la zone de pincement, et pour le champ de cisaillement obtenu juste avant le détachement de goutte.

La partie suivante rassemble les valeurs obtenues pour les différents alginates et les différentes pressions.

3.1.2 Etude du taux de cisaillement en fonction des pressions appliquées et des alginates

Comme évoqué précédemment, l'étude de μ P.I.V. a été effectuée sur une gamme de pression d'huile de soja allant de 100 mbar à 400 mbar. Pour chaque pression d'huile de soja, la pression d'alginate est adaptée pour pouvoir former des gouttes, à une fréquence moyenne, permettant d'enregistrer la formation sans difficulté. Pour chaque formation de goutte, et sa série de champ de cisaillement correspondante, la valeur de cisaillement maximal est donc calculée à partir du

taux de cisaillement présent dans le système juste avant détachement de la goutte. Les valeurs obtenues sont représentées dans la Figure 92, et rassemblées dans le Tableau 23.

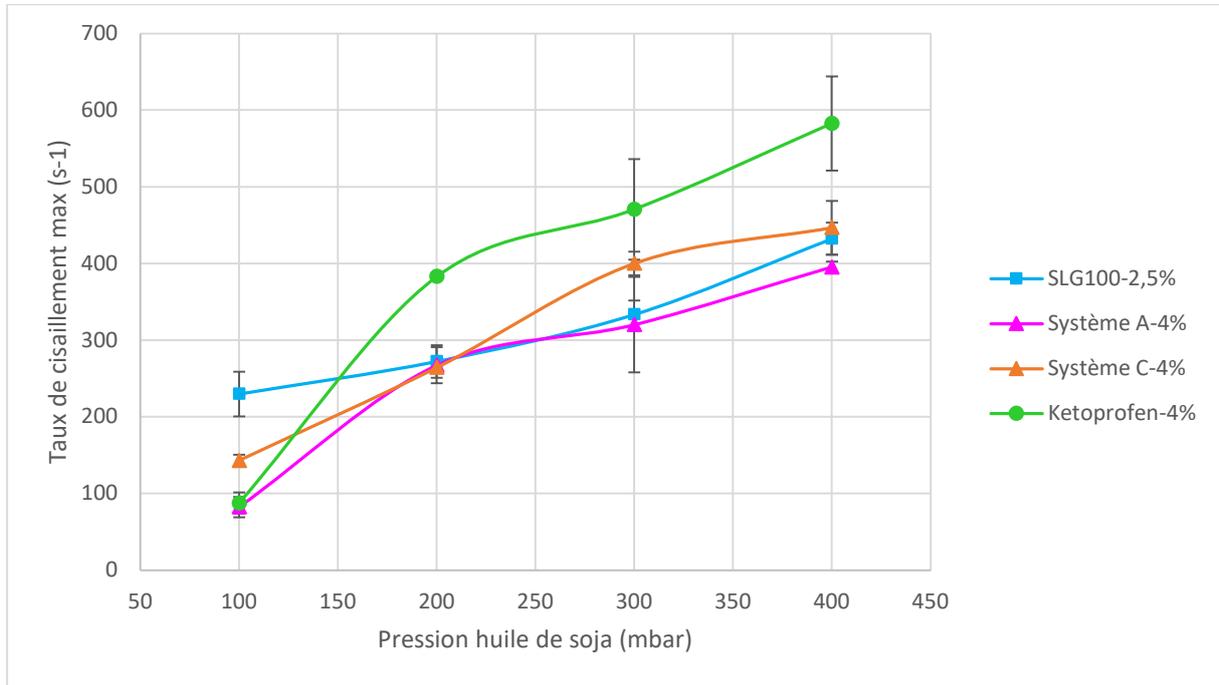


Figure 92 : Evolution du taux de cisaillement en fonction des pressions d'huile, pour les différents polymères

Pression appliquée sur la phase continue	Taux de cisaillement maximum (s^{-1})			
	SLG100	Système A	Système C	Kétoprofène
$P_h=100$ mbar	229,75	82,41	143,10	87,66
$P_h=200$ mbar	272,32	267,33	264,38	383,16
$P_h=300$ mbar	333,48	320,25	400,20	470,67
$P_h=400$ mbar	432,24	395,43	446,77	582,74

Tableau 23 : Valeurs de taux de cisaillement maximal obtenues pour les différentes pressions d'huile et les différents alginates

Ces caractérisations montrent que les cisaillements obtenus pour les différents alginates sont du même ordre de grandeur, et que le taux de cisaillement augmente avec la pression appliquée sur la phase d'huile de soja (puisque l'augmentation de la pression entraîne une augmentation de la vitesse de l'écoulement de l'huile).

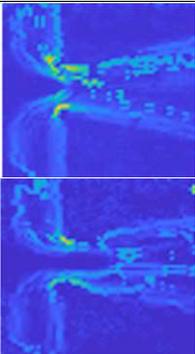
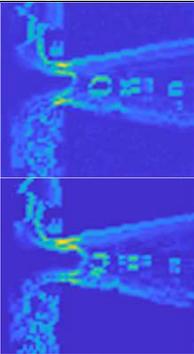
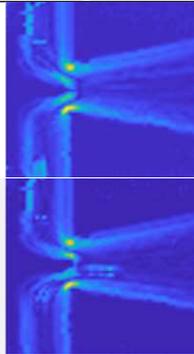
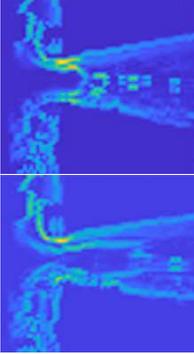
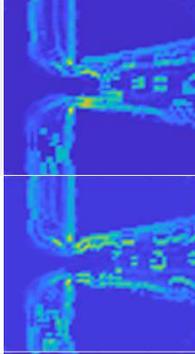
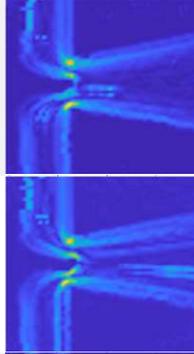
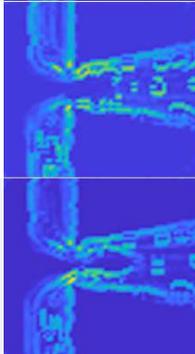
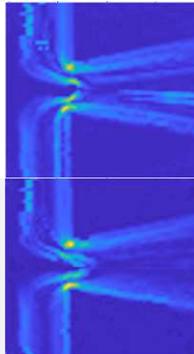
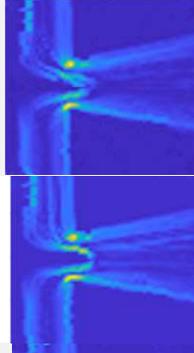
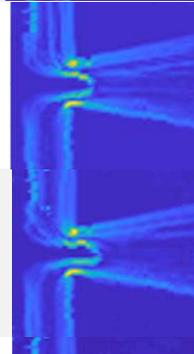
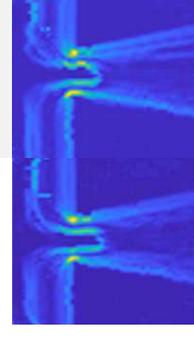
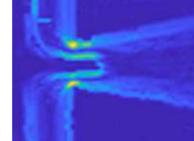
Il est intéressant de noter que dans le cas du Kétoprofène, le cisaillement a tendance à être plus important que pour les autres alginates, sauf à faible pression (100 mbar). Nous verrons dans la partie 3.1.3 que cela peut s'expliquer par les différences de propriétés rhéologiques entre les alginates.

Dans le cadre de cette thèse, toutes les expériences d'encapsulation d'îlots et de production de capsules vides sont effectuées pour une pression en huile de soja de 300 mbar. Par conséquent, d'après ces résultats, le cisaillement maximal subi par les cellules lors de ces expériences varie de 300 à 500 s^{-1} en moyenne, en fonction des alginates.

3.1.3 Temps de formation des gouttes

Le temps nécessaire à la formation d'une goutte est un paramètre critique dans le cadre d'une encapsulation de cellules, car une fréquence de production faible entraîne une augmentation considérable de la durée requise pour encapsuler le nombre d'îlots nécessaires à une greffe chez un patient diabétique. Or pendant l'encapsulation, les îlots n'ont ni oxygène ni nutriments, par conséquent, une durée d'encapsulation trop importante entraîne une baisse de viabilité des îlots.

Le temps de formation de gouttes a donc été caractérisé pour les différents alginates, et le Tableau 24 présente les résultats obtenus, à travers l'évolution des champs de cisaillement en fonction du temps, au cours de la formation d'une goutte, à la pression d'huile utilisée (300 mbar), et à des pressions d'alginate très proches (SLG100 : 85 ; Système A : 90 ; Système C : 93 ; Alginate-Ketoprofen : 80).

	Champs de cisaillement			
	SLG100	Système A	Système C	Kétoprofène
t_0 (sec)				
$t_0+0,2$ (sec)				
$t_0+0,4$ (sec)	Goutte détachée à $t_0+0,325$ sec			
$t_0+0,6$ (sec)		Goutte détachée à $t_0+0,5$ sec		
$t_0+0,8$ (sec)			Goutte détachée à $t_0+0,8$ sec	
t_0+1 (sec)				
$t_0+1,2$ (sec)				

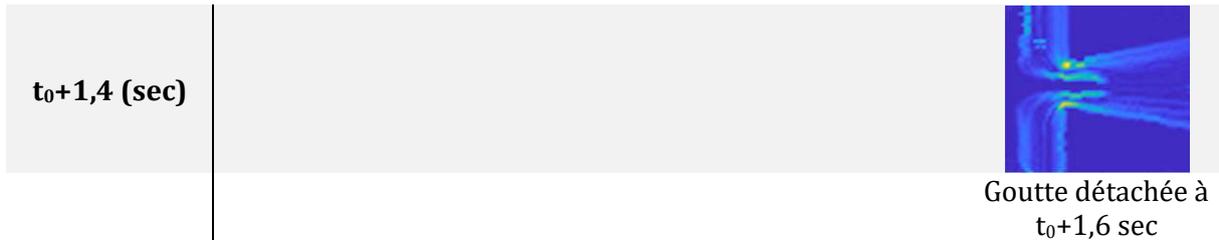


Tableau 24 : Evolution des champs de cisaillement au cours de la formation de goutte, en fonction du temps, et pour les différents alginates, et pour une pression d'huile de 100 mbar

On peut voir que l’alginate de référence est celui pour lequel le temps de formation de goutte est le plus court. Le temps de formation de gouttes est environ 1,5 fois plus long pour l’alginate Système A, 2,5 fois plus long pour l’alginate Système C, et 5 fois plus long pour l’alginate Kétoprofène. Ces résultats peuvent s’expliquer par les différences entre les alginates au niveau des propriétés rhéologiques (viscosité et élasticité), ainsi qu’au niveau de leur tension interfaciale.

Comme présenté dans le Chapitre IV, les alginates utilisés sont non Newtoniens, et leur caractère rhéofluidifiant, ainsi que leur viscosité ont été caractérisés en fonction du taux de cisaillement. Le taux de cisaillement appliquée sur la phase dispersée dans le système microfluidique a également été caractérisé, permettant d’en déduire la viscosité effective de la phase dispersée.

Les valeurs de cisaillement maximal obtenues dans la partie 3.1.2 sont rappelées dans le Tableau 25, avec les valeurs de viscosités correspondantes ajoutées. Ces viscosités sont calculées à l’aide des modèles établis dans le Chapitre Pré-Encapsulation (modèle de Cross pour l’alginate de référence et l’alginate Kétoprofène, et modèle de Herschel Bulkley pour les alginates Système A et Système C). Cependant, il est important de souligner que les lots de polymère avec lesquels les caractérisations rhéologiques ont été effectués ne sont pas les mêmes que ceux avec lesquels les caractérisations de Micro-P.I.V. ont été effectués, car nous ne possédions pas suffisamment de polymère pour faire ces expériences sur les mêmes lots. Nous avons malgré tout choisi d’utiliser les résultats du chapitre précédent, afin d’essayer de tirer des conclusions, tout en gardant à l’esprit que cela peut biaiser les interprétations.

		SLG100	Système A	Système C	Kétoprofène
P_h=100 mbar	Cisaillement max (s ⁻¹)	229,75	82,41	143,10	87,66
	Viscosité (Pa.s)	0,489	1,325	0,345	1,67
P_h=200 mbar	Cisaillement max (s ⁻¹)	272,32	267,33	264,38	383,16
	Viscosité (Pa.s)	0,458	0,708	0,258	0,853
P_h=300 mbar	Cisaillement max (s ⁻¹)	333,48	320,25	400,20	470,67
	Viscosité (Pa.s)	0,421	0,644	0,212	0,773
P_h=400 mbar	Cisaillement max (s ⁻¹)	432,24	395,43	446,77	582,74
	Viscosité (Pa.s)	0,375	0,576	0,202	0,697

Tableau 25 : Valeurs de taux de cisaillement maximal obtenues pour les différentes pressions d'huile et les différents alginates, et viscosités correspondantes, calculées à l'aide des modèles établis dans le chapitre Pré-Encapsulation

Les expériences de productions de capsules et encapsulation d’îlots sont effectuées à une pression en huile de soja de 300 mbar. Ainsi, en gardant uniquement les valeurs de viscosité obtenues à partir des taux de cisaillement calculés pour ces pressions, on obtient les résultats rassemblés dans la Figure 93 :

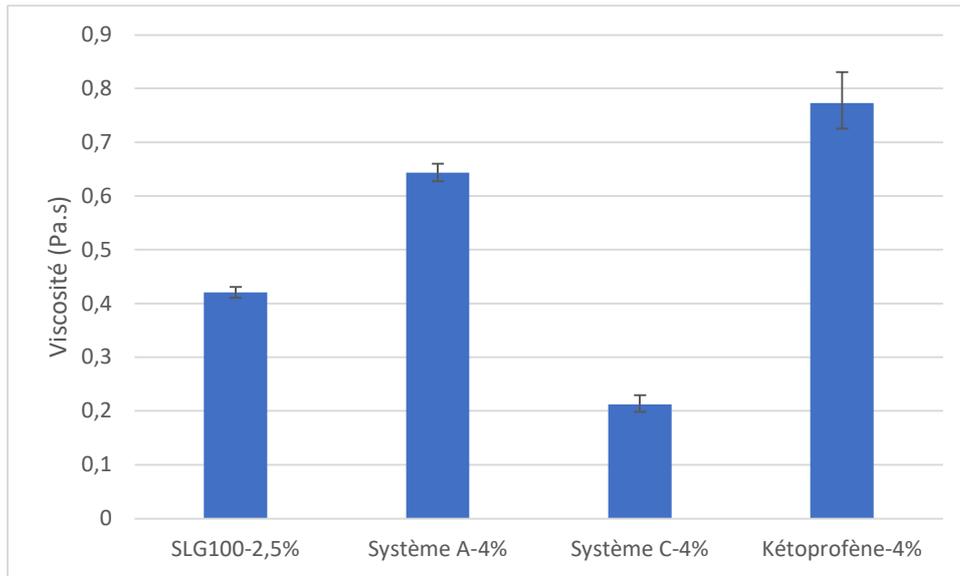


Figure 93 : Valeurs de viscosités obtenues pour les différents alginates, au cisaillement maximal présent dans le système lors de la formation de goutte

Les barres d'erreur sont obtenues à partir des barres d'erreur du taux de cisaillement calculé grâce à la Micro-P.I.V. On a donc un taux de cisaillement minimum et maximum pour chaque polymère. Ces taux de cisaillement minimum et maximum donnent lieu, toujours à l'aide des modèles établis dans le chapitre Pré-Encapsulation, à des valeurs de viscosité minimale et maximale pour chaque polymère.

Ces résultats montrent qu'aux taux de cisaillement appliqués lors de la formation des gouttes, l'alginate-kétoprofène est beaucoup plus visqueux que les autres alginates étudiés, ce qui explique le temps de formation de goutte beaucoup plus long. En effet, différentes études s'intéressant à l'influence de la viscosité de la phase dispersée sur la taille des gouttes formées, leur monodispersité, ainsi que la fréquence de production^{8,334,355-357} ont conclu qu'une **augmentation de la viscosité augmente la monodispersité, et diminue la fréquence de production**^{8,334,355-357}. L'impact sur la monodispersité sera étudié dans le Chapitre VI.

Bien que les résultats présentés en Figure 93 montrent que la viscosité de l'alginate Système C est la plus faible (au cisaillement maximal), le temps de formation de gouttes reste élevé par rapport à l'alginate de référence (facteur 2,5). Ce résultat peut s'expliquer par les caractérisations de viscoélasticité : l'alginate Système C est beaucoup plus élastique que l'alginate de référence et l'alginate-kétoprofène.

Certaines études ont montré que lorsque l'élasticité augmente, la longueur du filament augmente, son amincissement avant rupture est plus lent, et le nombre de gouttes satellites augmente^{314,358-360}. Cela est dû à la capacité d'étirement des chaînes du polymère, de par ses propriétés élastiques.^{311,313,314,316} Ainsi, **lorsque l'élasticité augmente, le temps de formation de goutte augmente** (et la fréquence de production diminue). Cela semble donc également s'appliquer pour le Système C.

Le Système A présente un temps de formation de goutte plus long que l'alginate de référence SLG100. Cela peut s'expliquer par sa viscosité qui est 1,5 fois plus importante. Il est également intéressant de noter qu'une compétition doit avoir lieu entre la viscosité, qui a tendance à rallonger le temps de formation des gouttes, et la tension interfaciale (plus faible que tous les autres alginates, voir partie 2.2), qui a tendance à raccourcir le temps de formation des gouttes. Cela peut expliquer le fait que son temps de formation de gouttes est seulement légèrement

supérieur à celui de l’alginate de référence SLG100, alors que sa viscosité est bien plus élevée. (Les mesures de viscoélasticité n’ont pas été faites sur le Système A, et ce paramètre ne peut donc pas être pris en compte pour ce polymère).

Concernant la monodispersité et la présence de gouttes satellites, on a donc vu qu’une augmentation de la viscosité améliore la monodispersité, et qu’une augmentation de l’élasticité augmente le nombre de gouttes satellites produites. La monodispersité et le pourcentage de gouttes satellites seront étudiés dans le Chapitre VI.

Le paramètre dans notre système microfluidique permettant de jouer sur la fréquence de formation de gouttes est la pression appliquée à l’alginate. Ces résultats permettent donc de mettre en évidence le fait que pour les alginates PEGylés, et en particulier pour l’alginate-kétoprofène, il est nécessaire d’augmenter la pression d’alginate afin d’obtenir les mêmes fréquences de génération de goutte que l’alginate de référence.

Ces analyses sont cependant à prendre avec précaution, tout d’abord car les lots de polymères sur lesquels ont été effectués les caractérisations de micro-PIV ne sont pas les mêmes que ceux sur lesquels ont été effectués les caractérisations rhéologiques.

De plus, comme cela a été expliqué dans la partie 3.1, le taux de cisaillement n’est pas le même à l’intérieur des gouttes qu’en bordure, et l’analyse effectuée précédemment est basée sur des valeurs obtenues pour un taux de cisaillement maximal en périphérie de gouttes.

Le taux de cisaillement mesuré à l’intérieur des gouttes est d’environ une dizaine de s^{-1} , pour tous les alginates et toutes les pressions étudiées. Ainsi, en calculant les viscosités correspondantes à un taux de cisaillement de $10 s^{-1}$ pour chaque alginate, à partir des modèles établis dans le Chapitre IV, on obtient les valeurs rassemblées dans le Tableau 26 :

	Viscosité maximale (Pa.s)
SLG100	0,834
Système A	4,237
Système C	1,343
Kétoprofène	3,701

Tableau 26 : Valeurs de viscosités pour les différents alginates, calculées à l’aide des modèles établis dans le chapitre Pré-Encapsulation pour un taux de cisaillement de $10 s^{-1}$

On peut voir qu’à ce taux de cisaillement, le Système A est l’alginate le plus visqueux, et le Système C est plus visqueux que l’alginate de référence SLG100 (facteur 1,6). En se basant sur ces résultats pour l’analyse des temps de formation de gouttes, les temps obtenus pour l’alginate de référence SLG100, pour le Système C et pour l’alginate-Kétoprofène sont toujours cohérents, mais le temps de formation de gouttes du Système A devrait être beaucoup plus élevé. De nouveau, ce résultat peut s’expliquer par la valeur de tension interfaciale qui a tendance à réduire le temps de formation de goutte.

Ces analyses soulignent la complexité de l’étude, de par la non homogénéité des taux de cisaillement au sein des gouttes, et le caractère rhéofluidifiant plus ou moins prononcé des alginates. Il serait intéressant d’effectuer une étude plus poussée pour bien comprendre les phénomènes et les compétitions de paramètres en jeu.

3.1.4 Corrélation taux de cisaillement-viabilité cellulaire

Suite aux résultats présentés en partie 3.1.2, les valeurs obtenues ont été comparées par rapport à la littérature, afin de vérifier si des taux de cisaillement compris entre 300 et 500 mbar peuvent être néfastes pour les cellules ou non.

De nombreuses études s'intéressent à l'impact du cisaillement sur la viabilité des cellules. Le cisaillement dans ces études est généralement exprimé en contrainte de cisaillement (en Pa ou dyn/cm³), et non pas en taux de cisaillement. Par conséquent, afin de comparer nos résultats avec la littérature, il est tout d'abord nécessaire de les exprimer en valeurs de contraintes de cisaillement.

Pour cela, la relation entre la contrainte et le taux de cisaillement, rappelée dans l'équation (25), est utilisée :

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \text{ soit } \tau = \eta \times \dot{\gamma} \quad (25)$$

Ainsi, à partir du Tableau 23, on obtient les valeurs rassemblées dans le Tableau 27 :

Pression appliquée sur la phase continue	Contrainte de cisaillement maximum (Pa)			
	SLG100	Système A	Système C	Kétoprofène
P_h=100 mbar	112,43	109,21	49,44	146,41
P_h=200 mbar	124,64	189,30	68,23	327,02
P_h=300 mbar	140,25	206,13	85,01	363,82
P_h=400 mbar	162,08	227,75	90,15	406,00

Tableau 27 : Valeurs de contraintes de cisaillement maximales obtenues pour les différentes pressions d'huile et les différents alginates

On peut voir que la contrainte maximale subie par les cellules en bordure de gouttes est d'environ 400 Pa. Cependant, cette contrainte n'est appliquée qu'aux cellules étant en bordure de goutte, ce qui représente une infime partie des cellules. En effet, étant donné que le taux de cisaillement décroît très rapidement en s'éloignant de la bordure de goutte (comme expliqué dans ce début de paragraphe), la majorité des cellules subissent un taux de cisaillement de quelques s⁻¹ seulement.

Par conséquent, les contraintes de cisaillement correspondant au taux de cisaillement à l'intérieur de la goutte sont également calculées. Les taux de cisaillement à l'intérieur des gouttes étant très faibles (une dizaine de s⁻¹ maximum) et très proches pour n'importe quel alginate et pression d'huile, les contraintes correspondantes ont donc été calculées pour le même taux de cisaillement pour toutes les conditions : 10 s⁻¹. On obtient les résultats rassemblés dans le Tableau 28 :

	Contrainte de cisaillement maximum (Pa)
SLG100	8,34
Système A	42,37
Système C	13,43
Kétoprofène	37,01

Tableau 28 : Valeurs des contraintes de cisaillement à l'intérieur des gouttes, pour les différents alginates

On peut donc voir que la majorité des cellules subissent un cisaillement d'environ 50 Pa maximum, et les cellules en bordure de goutte subissent un cisaillement de l'ordre de 400 Pa maximum pour le Kétoprofène. Différentes études^{361,362} ont mesuré la viabilité de cellules (cellules souches humaines, cellules de souris RSC96, et myoblastes L8) ayant subi des contraintes de cisaillement élevée de différentes valeurs, lors de procédés de bioprinting. Ces études ont montré

que la viabilité des cellules est affectée lorsque les contraintes de cisaillement appliquées sont supérieures à 5kPa.

Bien que les types cellulaires étudiés soient différents des nôtres (INS-1 et îlots pancréatiques), il est raisonnable de conclure que les cisaillements appliqués sur les cellules lors de la formation de gouttes en microfluidique n'ont aucun impact négatif sur leur viabilité.

Pour conclure sur cette partie étudiant l'étape de formation de goutte, le Tableau 29 présente un bilan de comparaison des résultats obtenus en termes de temps de formation de goutte et de contraintes de cisaillement à l'intérieur et en périphérie de goutte, pour les différents alginates. L'alginate présentant les meilleures propriétés (temps de formation de goutte le plus court et contrainte de cisaillement la plus faible) est indiqué par ++, et l'alginate présentant les moins bons résultats est indiqué par --.

	SLG100	Système A	Système C	Kétoprofène
Temps de formation de goutte	++	+	-	--
Contrainte de cisaillement intérieur gouttes	++	--	+	-
Contrainte de cisaillement périphérie de goutte	+	-	++	--

Tableau 29 : Classement pour les différents polymères des résultats obtenus pour les différents paramètres de formation de goutte étudiés ; ++ signifie que le polymère présente les meilleurs résultats, et -- les moins bons résultats

On peut voir que l'alginate de référence SLG100 présente de meilleurs résultats en termes de temps de formation de goutte et de contrainte de cisaillement à l'intérieur de la goutte. Concernant la contrainte de cisaillement en périphérie de goutte, le Système C présente de meilleurs résultats, de par son caractère rhéofluidifiant. Il est difficile de trouver le bon compromis entre les différents paramètres, d'autant plus que la contrainte de cisaillement est directement reliée à la viscosité, dont une valeur élevée peut présenter un avantage (pour une meilleure résistance dans une optique d'implantation).

4. Gélification

Afin de déterminer la vitesse de gélification de l'alginate Système A par rapport à l'alginate de référence, l'expérience décrite dans le Matériel et Méthodes a été suivie. Elle consiste en une formation de goutte d'alginate entre deux lamelles de verre, et un apport de solution aqueuse de calcium par capillarité, entre les deux lamelles. On peut alors détecter l'avancée du front de gélification, comme le montre la Figure 94, qui est filmé à l'aide d'une caméra rapide. Les images sont ensuite analysées afin de mesurer la distance gélifiée en fonction du temps. Cette expérience est inspirée des résultats publiés par Bjørnøy *et al.*³⁰⁹

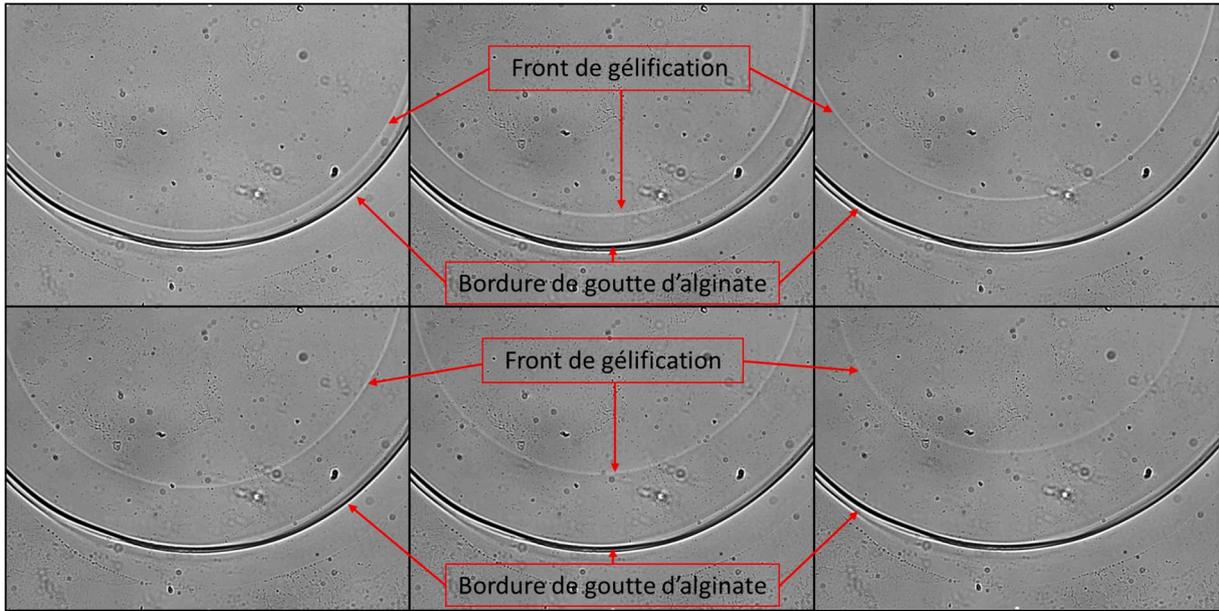


Figure 94 : Avancée du front de gélification pour l'alginate de référence SLG100-3%, et pour une concentration en calcium de solution gélifiante de 30 mM

Dans un premier temps, la vitesse de gélification a été mesurée pour l'alginate de référence SLG100-3%, avec des solutions aqueuses gélifiantes à deux concentrations en calcium différentes : 30 mM et 100 mM. Les résultats sont présentés en Figure 95.

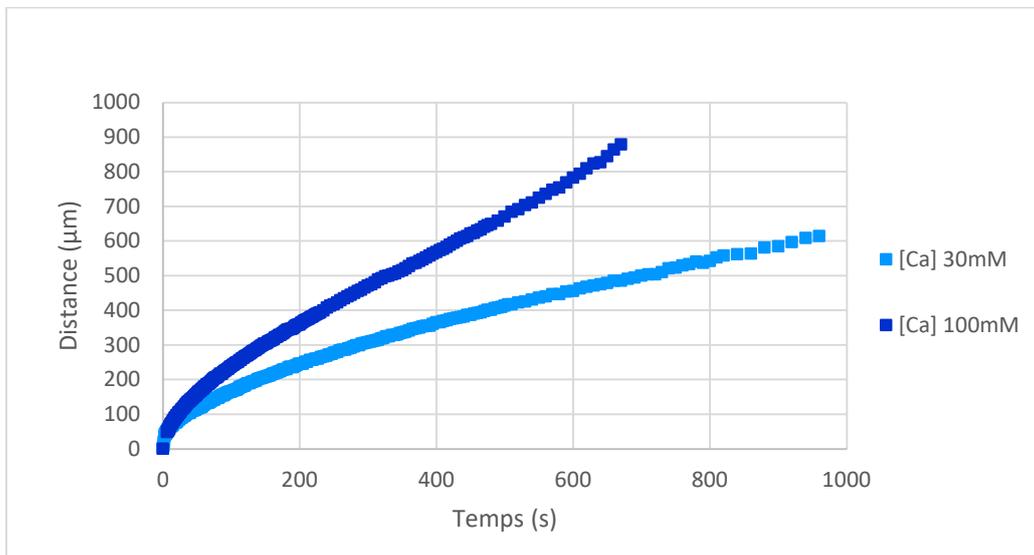


Figure 95 : Cinétique de gélification pour l'alginate de référence SLG100-3%, à 30 mM et 100 mM de Calcium

On peut voir que la pente de la courbe est plus importante au début, car les ions calcium Ca^{2+} diffusent très rapidement vers les nombreux sites de boîte à œufs disponibles dans l'alginate. La pente diminue par la suite et reste constante un moment, car la diffusion est plus lente et se stabilise, jusqu'à normalement atteindre un plateau, qui n'est pas visible sur ces courbes.

En effectuant une régression linéaire de la zone où la pente est constante (Figure 95), le coefficient directeur nous donne la vitesse. On obtient les valeurs rassemblées dans le Tableau 30 :

Concentration en calcium (mM)	Vitesse de gélification ($\mu\text{m}/\text{min}$)	Vitesse de gélification littérature ³⁰⁹ ($\mu\text{m}/\text{min}$)
30 mM	26,71	
50 mM		60
100 mM	63,99	
250 mM		160
1000 mM		270

Tableau 30 : Valeurs de vitesses obtenues par régression linéaire des courbes, pour l'alginate de référence SLG100-3%, et des concentrations molaires en Calcium de 30 mM et 100 mM ; et valeurs obtenues dans la littérature

Ces résultats montrent, comme cela est attendu, que la vitesse de gélification augmente avec la concentration en calcium, et que les valeurs obtenues se situent dans la même gamme que celles présentées dans la littérature.

Par la suite, la vitesse de gélification a donc été comparée entre l'alginate de référence SLG100-3% et l'alginate Système A-4% (voir Figure 96), pour une concentration en calcium de 100 mM. Les résultats obtenus sont présentés en Figure 97.

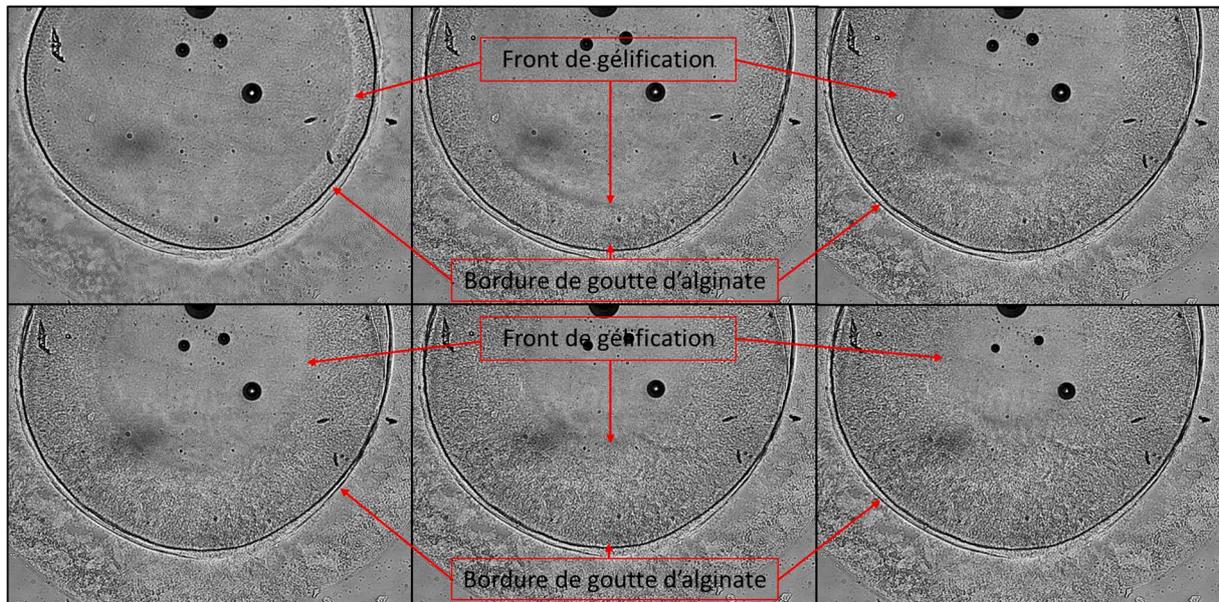


Figure 96 : Avancée du front de gélification pour l'alginate Système A-4%, et pour une concentration en calcium de solution gélifiante de 100 mM

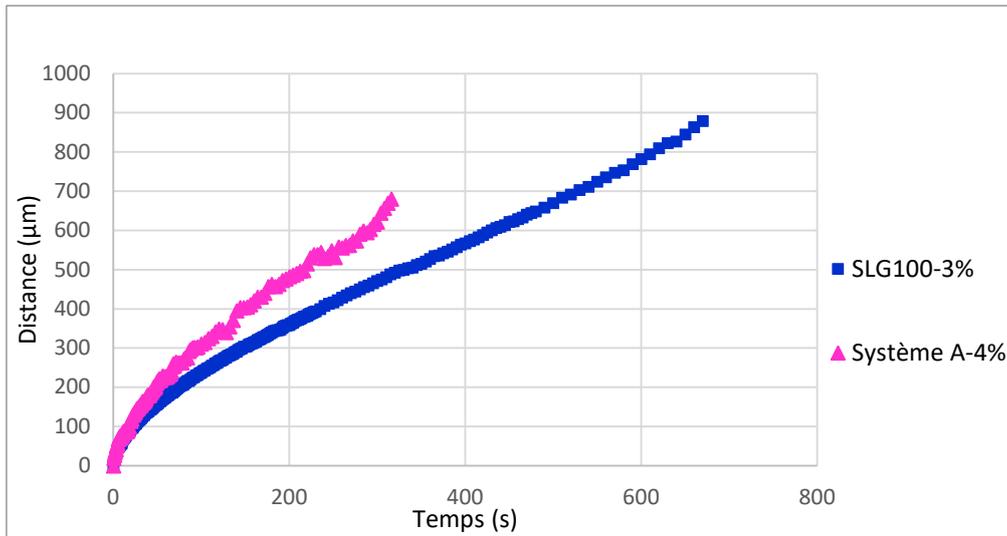


Figure 97 : Cinétique de gélification pour l'alginate de référence SLG100-3% et l'alginate Système A, pour une concentration molaire de Calcium de 100 mM

Les vitesses sont obtenues de la même manière que précédemment, et leurs valeurs sont rassemblées dans le Tableau 31 :

Polymère	Vitesse de gélification (µm/min)
SLG100-3%	63,99
Système A-4%	81,74

Tableau 31 : Valeurs de vitesses obtenues par régression linéaire des courbes, pour l'alginate de référence SLG100-3%, et l'alginate Système A

On peut donc voir que le Système A gélifie plus rapidement que l'alginate de référence SLG100. Les capsules de Système A sont donc constituées d'un gel moins homogène mécaniquement, et présentant de moins bonnes propriétés mécaniques que les capsules d'alginate SLG100.

En effet, comme cela a été présenté dans l'Etat de l'art, une gélification lente produira un gel ayant une structure plus uniforme et une plus grande intégrité mécanique qu'un gel produit par gélification rapide^{4,187}. Par exemple, dans le cadre de la gélification externe, par rapport à la gélification interne, les ions utilisés sont sous forme très soluble dans l'eau (comme le chlorure de calcium CaCl₂), et les cations Ca²⁺ diffusent et gélifient l'alginate très rapidement, de manière peu contrôlée, et le gel obtenu est donc moins homogène mécaniquement qu'un gel obtenu en gélification interne^{4,223,224}. Si la vitesse de gélification est réduite, la structure du gel d'alginate obtenu est plus ordonnée, donnant lieu à de meilleures propriétés mécaniques^{4,231}.

De plus, dans le système microfluidique, les gouttes sont soumises à un cisaillement continu, même pendant la pré-gélification. Par conséquent, la viscosité n'est pas homogène entre la bordure et l'intérieur de goutte (voir partie 3) (et les différences de viscosité sont d'autant plus importantes que l'alginate est rhéofluidifiant), ce qui engendre des différences de diffusion des ions calcium au sein de la goutte, et en fonction des alginates.

Dans le cadre de l'utilisation en microfluidique, il faut donc trouver un bon équilibre au niveau de la vitesse de gélification : ni trop lente pour que les capsules soient suffisamment pré-gélifiées pour maintenir leur forme sphérique lors du passage de l'interface et ne pas coalescer, ni trop rapide pour ne pas présenter des structures de gel hétérogènes. L'hétérogénéité des capsules est également accentuée par la différence de taux de cisaillement et de viscosité au sein de la goutte.

5. Passage de l'interface huile-solution aqueuse de calcium

5.1 Observations expérimentales

Lors des formations de capsules en système microfluidique MFFD200 et MFFD550, le passage de l'interface huile-solution aqueuse de calcium (dans le falcon de récupération des capsules) s'est avéré plus difficile pour les alginates PEGylés. En effet, les gouttes formées et pré-gélifiées ont eu tendance à rester bloquées à l'interface, nécessitant plusieurs dizaines de minutes avant de passer dans la phase aqueuse, voire ne jamais passer en phase aqueuse. Cela a été observé particulièrement avec le Système A, qui est le premier polymère à avoir été testé (dans le cadre de production de capsules vides). Le nombre d'îlots nécessaires à une greffe étant très important, si une grande partie des capsules contenant les îlots reste bloquée à l'interface huile-eau, le temps et le nombre d'îlots et d'alginate nécessaires à la production des capsules sera d'autant plus important.

Cette difficulté de passage d'interface peut être expliquée par la différence de tension interfaciale, présentée en partie 2.2 : la tension interfaciale entre l'alginate Système A et l'huile de soja étant plus faible qu'entre l'alginate de référence et l'huile de soja, les capsules coalescent plus difficilement avec la phase aqueuse pour le premier. Afin de solutionner ce problème, il a été décidé d'utiliser le système microfluidique automatisé GEL200, qui présente des modules de transferts de phase. L'idée ici était de forcer les capsules à passer en phase aqueuse à l'aide des déplacements des fluides, puisque la gravité et la tension interfaciale ne suffisaient pas à transférer les capsules de la phase huile vers la phase aqueuse.

Cependant, lors de l'utilisation du Système A en carte microfluidique automatisée, d'autres difficultés sont apparues : les capsules avaient tendance à s'écraser sur les piliers du transfert de phase et former des bouchons (voir Figure 98 B et C). Des bouchons pouvaient également se former à cause de la coalescence de capsules se rejoignant dans le canal de pré-gélification (voir Figure 98 D).

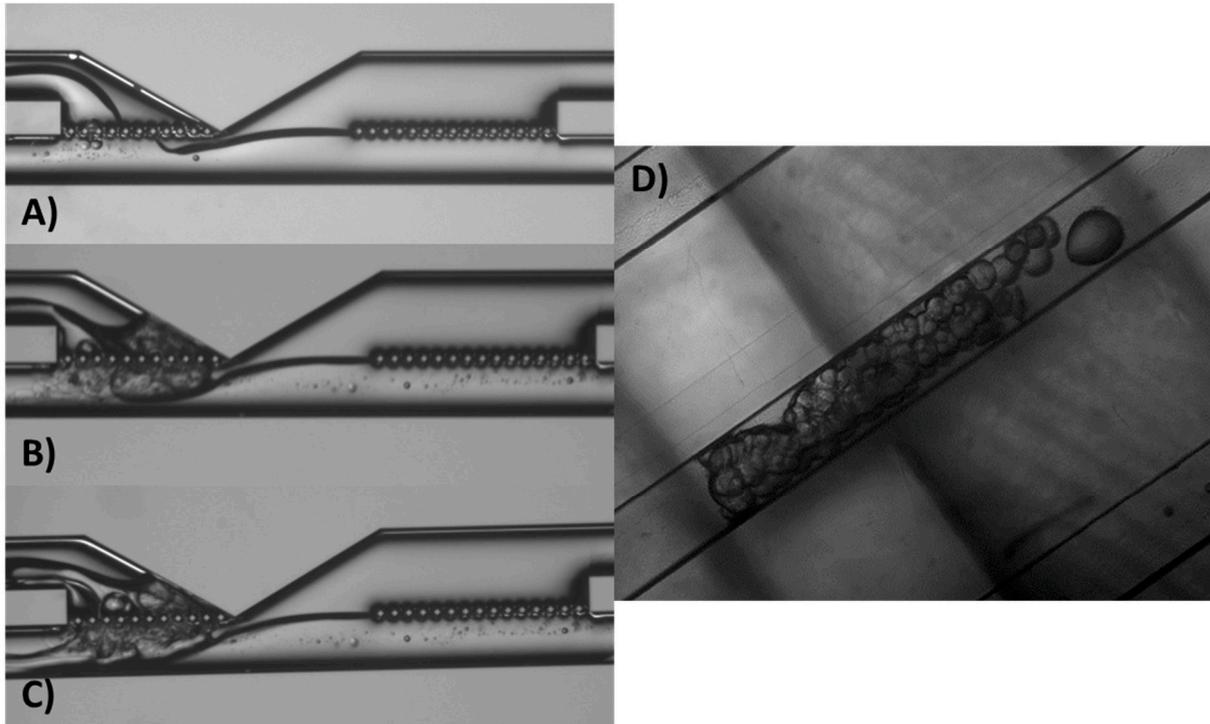


Figure 98 : Exemples de problèmes rencontrés avec l'alginate Système A en système microfluidique automatisé :
 A) Transfert de phase avant l'arrivée de capsules ; B) et C) : capsules accrochées aux piliers du premier transfert de phase, créant un bouchon ; D) capsules qui se rejoignent dans le canal de pré-gélification, coalescent, et créent un bouchon

Au vu des résultats présentés en partie 4 concernant la cinétique de gélification des alginates, et les propriétés mécaniques qui en découlent, les difficultés de bouchons rencontrées en système microfluidique automatique s'expliquent par la non homogénéité de la gélification de l'alginate, et les propriétés mécaniques moins homogènes qui en découlent.

De plus, comme expliqué précédemment, la tension interfaciale de l'alginate Système A étant faible, les capsules ont du mal à passer l'interface huile-eau. Par conséquent, lorsque ces dernières atteignent le transfert de phase (voir Figure 98 A), elles ont tendance à aller plus vers les piliers que vers l'interface. Une fois arrivées aux piliers, leur faible résistance et homogénéité mécanique provoque leur écrasement contre ces derniers, et crée un bouchon. A ces interprétations des résultats obtenus peut s'ajouter le fait que l'alginate Système A utilisé lors de ces tests était très peu visqueux, réduisant donc également la résistance des capsules.

5.2 Optimisation des propriétés du polymère

Suite à ces résultats, 2 décisions ont été prises, afin de solutionner le problème :

- Augmentation de la concentration d'alginate utilisée, de 3 à 4 % massique, afin d'augmenter la viscosité et les propriétés mécaniques
- Optimisation des procédés de synthèses des alginates, afin d'augmenter leur viscosité, et par conséquent leurs propriétés mécaniques. Cette partie a été prise en charge par les équipes de l'EPFL.

L'augmentation de la concentration utilisée pour l'alginate a présenté des difficultés de solubilisation dans un premier temps, comme le montre la Figure 99 présentant un exemple de formation de goutte pour un alginate mal solubilisé : ce dernier n'est pas bien cisailé au niveau du MFFD.

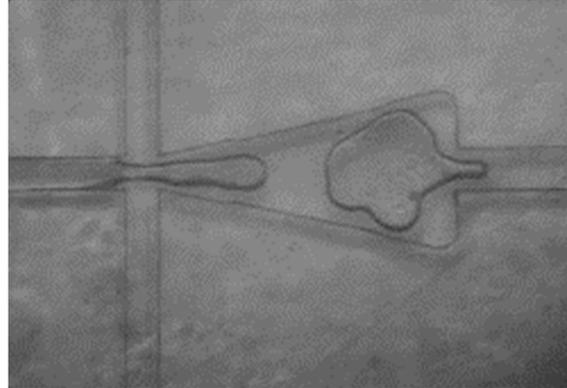


Figure 99 : Exemple de mauvais cisaillement au niveau du MFFD lors de l'utilisation d'un alginate mal solubilisé

Le protocole de solubilisation a donc été modifié, et des pipettes visqueuses ont été utilisées au lieu du vortex utilisé précédemment (voir Matériel et Méthodes). Cette méthode a permis par la suite de solubiliser les alginates, même lorsqu'ils ont une viscosité de plusieurs Pa.s.

Concernant les procédés de synthèse des alginates, les équipes de l'EPFL sont parvenues à optimiser les différentes étapes, afin d'obtenir des alginates plus visqueux (voir Chapitre IV). Suite à ces deux optimisations, de nouveaux tests ont été effectués avec la carte automatisée d'origine, GEL200 (voir Figure 100). Avec ces lots d'alginate, la production de capsules a ainsi finalement été possible avec ce système microfluidique. Par la suite, des capsules ont également pu être formées en système microfluidique simplifié MFFD200 et MFFD550.

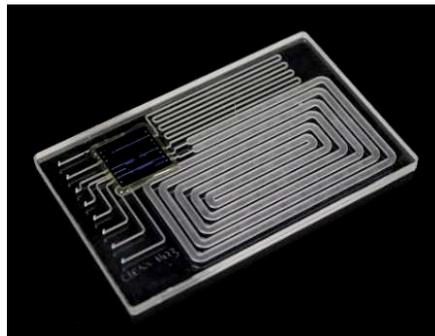


Figure 100 : Carte microfluidique GEL200v1

6. Bilan et production de capsules (choix du système microfluidique)

Suite à l'étude des paramètres régissant les différentes étapes critiques de formation de capsules (formation de goutte, gélification, et passage de l'interface), les performances des alginates étudiés sont comparées dans le Tableau 32.

		SLG100	Système A	Système C	Kétoprofène
Formation de gouttes	Temps de formation de goutte	++	+	-	--
	Contrainte de cisaillement intérieur gouttes	++	--	+	-
	Contrainte de cisaillement périphérie de goutte	+	-	++	--
Gélification		+	-		
Passage de l'interface		++	--	-	+

Tableau 32 : Comparaison des performances des différentes alginates étudiés, sur les étapes critiques de formation de capsule

L'alginate de référence présente globalement les meilleures propriétés afin d'obtenir des capsules en microfluidique. Cependant, malgré les limitations présentées par certains polymères (en particulier le Système A et l'alginate-kétoprofène), les paramètres ont pu être adaptés (pressions appliquées, concentration et viscosité des polymères), et des capsules ont ainsi pu être produites avec les différents alginates, dans différents systèmes microfluidiques : en système automatisé GEL200v1 (Figure 101), ainsi qu'en systèmes simplifiés MFFD200 (Figure 102) et MFFD550 (Figure 103).

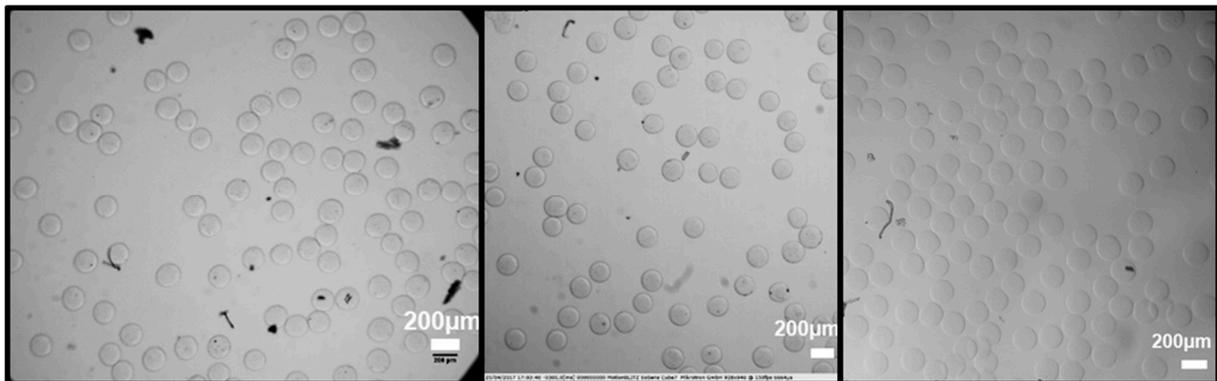


Figure 101 : Capsules d'alginate Système A obtenues avec le système microfluidique automatisé GEL200v1

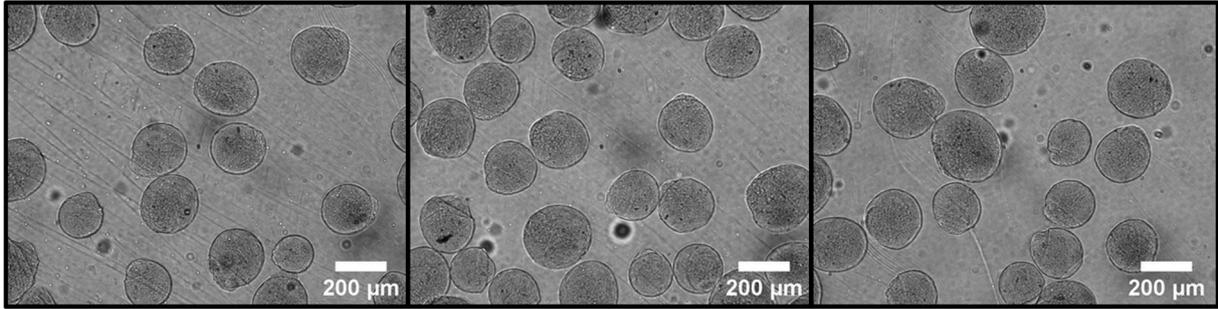


Figure 102 : Capsules d'alginate Système A obtenues avec le système microfluidique simplifié MFFD200

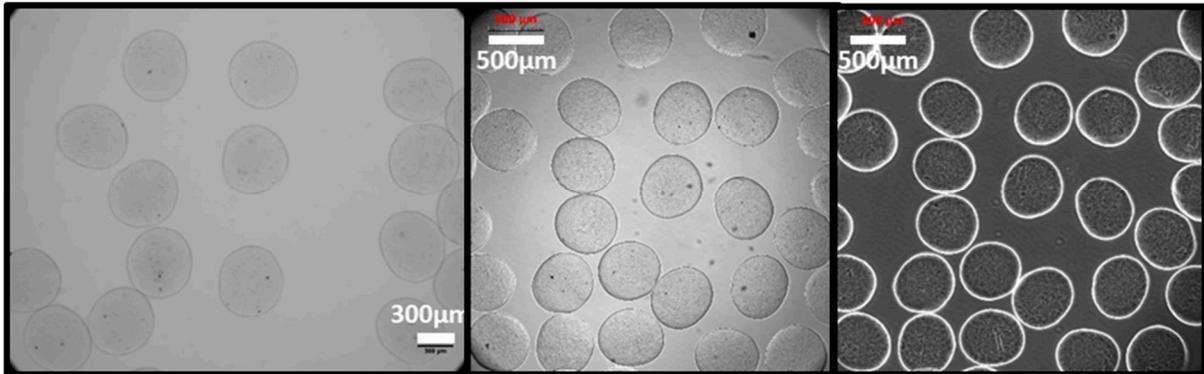


Figure 103 : Capsules d'alginate Système A obtenues avec le système microfluidique simplifié MFFD550

Moyennant une légère adaptation et optimisation de certains paramètres, les systèmes microfluidiques d'encapsulation présentés sont donc utilisables avec une gamme relativement large de polymères, ayant des propriétés physico-chimiques très différentes (viscosité variant de quelques centaines de mPa.s à plusieurs Pa.s, élasticité, tension interfaciale variant de 6 à 15 mN.m⁻¹).

Par la suite, nous nous sommes intéressés tout d'abord à la caractérisation des capsules obtenues (taille, monodispersité, perméabilité, propriétés mécaniques), afin de déterminer si leurs propriétés sont adaptées à une application biologique. Enfin, des cellules ont été encapsulées, afin de vérifier la biotolérance de ces algines, à l'aide de mesures de viabilité *in vitro*, ainsi que d'un essai *in vivo*.

Pour cela, un choix a dû être effectué quant au système microfluidique gardé pour l'encapsulation des cellules. L'objectif étant d'encapsuler des îlots, et ces derniers ayant une taille pouvant aller jusqu'à 500 μm, le choix s'est donc porté sur un système présentant des dimensions de canaux de 550 μm. Etant donné que les puces en silicium utilisées dans le système automatisé avaient été développées au sein du laboratoire uniquement pour des dimensions de 200 μm, les contraintes de temps et de budget ne nous ont pas permis de les développer pour des dimensions de 550 μm, et ont donc orienté notre choix vers le système microfluidique simplifié MFFD550. Ce système présente par ailleurs moins de risque de formation de bouchons, ce qui est un avantage dans le cadre d'expériences utilisant du matériel biologique, avec lequel le temps est un paramètre essentiel.

Chapitre 6 : Post-Encapsulation

Table des matières

1. Caractérisation des capsules	186
1.1 Taille, forme, et monodispersité	186
1.2 Perméabilité.....	195
2. Encapsulation de cellules	198
2.1 Capsules obtenues	198
2.2 Optimisation des résultats	200
3. Encapsulation d'îlots	203
3.1 Caractérisation des îlots.....	203
3.2 Caractérisation des capsules obtenues.....	205
3.3 Paramètres influençant l'encapsulation	212
3.3.1 Concentration en îlots.....	212
3.3.2 Répartition des îlots.....	213
3.3.3 Gouttes satellites.....	215
3.4 Mesures de viabilité	215
4. Test in vivo	221
4.1 Formation des capsules vides	221
4.2 Encapsulation des îlots	222
4.3 Greffe des îlots encapsulés et récupération des capsules	224
5. Discussion	229

1. Caractérisation des capsules

Dans le chapitre Encapsulation, la méthodologie suivie afin de réussir à produire des capsules avec les différents alginates en système microfluidique a été présentée, ainsi que les résultats obtenus et le système choisi pour la suite de la thèse. Ce chapitre se concentrera donc tout d'abord sur la présentation des capsules obtenues, ainsi que leur caractérisation. Puis les résultats obtenus dans le cadre d'encapsulation de cellules et d'îlots seront présentés.

1.1 Taille, forme, et monodispersité

Les capsules vides produites en système microfluidique MFFD550 avec les différents alginates ont tout d'abord été caractérisées. Comme vu dans le chapitre précédent, ces paramètres sont influencés entre autres par la viscosité et l'élasticité du polymère. En effet, d'après la littérature, une augmentation de la viscosité du polymère entraîne une augmentation de la monodispersité des gouttes produites^{8,334,355-357}, et une augmentation de l'élasticité entraîne une augmentation du nombre de gouttes satellites produites^{311,313,314,316,358-360}.

Cette partie aura donc pour but de présenter les résultats obtenus, et de les interpréter en fonction des propriétés des fluides caractérisées précédemment. Pour cela, lors de chaque expérience de production de capsules vides, ces dernières ont été caractérisées en termes de taille, forme, et monodispersité, par analyse d'image sur le logiciel ImageJ, selon le protocole présenté dans le Matériel et Méthodes.

Dans un premier temps, des tests ont été effectués sur l'alginate de référence SLG100, afin de déterminer la pression d'huile pré-gélifiante à appliquer (pour une pression d'huile de soja de 300 mbar) pour obtenir des capsules suffisamment pré-gélifiées, car si les capsules ne sont pas assez pré-gélifiées, elles peuvent :

- Coalescer, si les gouttes sont légèrement pré-gélifiées mais pas suffisamment, car la pression en huile pré-gélifiante est trop faible (Figure 104 A et B)
- Prendre une forme de larme lorsqu'elles passent l'interface huile-solution aqueuse, si les gouttes ne sont pas gélifiées du tout, car la pression en huile pré-gélifiante est trop faible, ou parce qu'il y a un problème fluide empêchant l'huile d'arriver dans la carte (Figure 104 D et E)
- Avoir des tailles très variées, si les gouttes ne sont pas gélifiées du tout, et coalescent avant le passage de l'interface, car la pression en huile pré-gélifiante est trop faible, ou parce qu'il y a un problème fluide empêchant l'huile d'arriver dans la carte (Figure 104 F)

Les résultats ont montré que pour des pressions d'huile pré-gélifiante de 250 et 300 mbar, certaines capsules coalescaient (Figure 104 A et B, capsules entourées d'un cercle rouge), alors que ce n'était pas le cas pour une pression de 350 mbar (Figure 104 C). C'est donc la pression qui a été choisie, et utilisée dans toutes les expériences de ce chapitre.

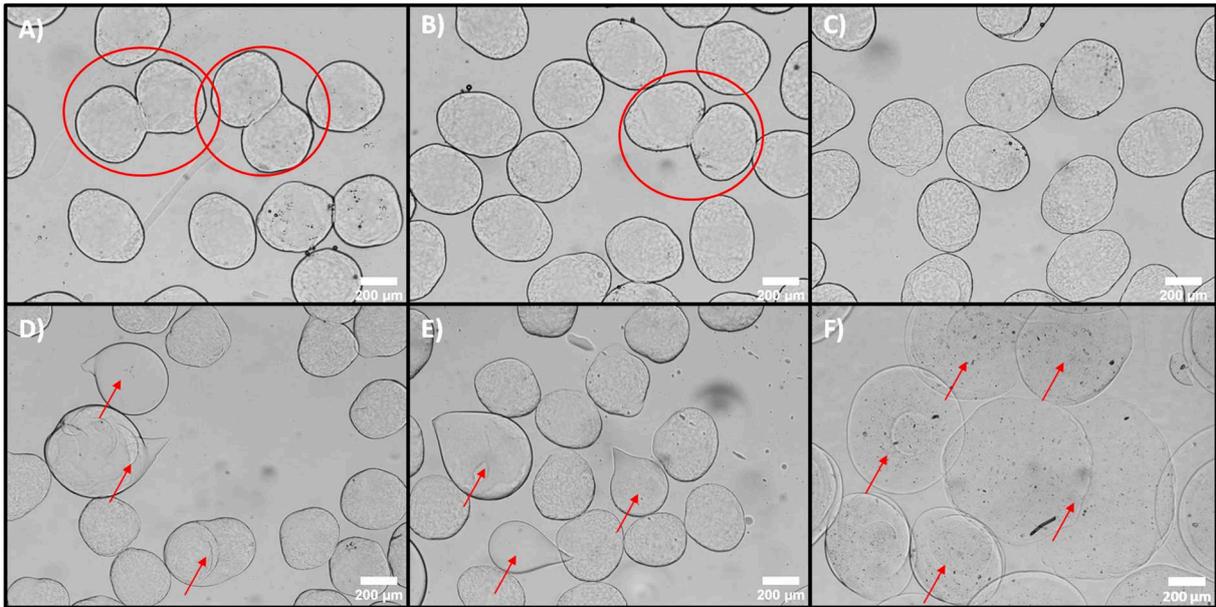


Figure 104 : Illustration de l'impact de la pré-gélification, sur des capsules formées à une pression d'huile de soja de 300 mbar, et une pression d'huile pré-gélifiante variable : A) Capsules formées à une pression d'huile pré-gélifiante de 250 mbar, présentant de la coalescence (cercles rouges) ; B) Capsules formées à une pression d'huile pré-gélifiante de 300 mbar, présentant de la coalescence (cercles rouges) ; C) Capsules formées à une pression d'huile pré-gélifiante de 350 mbar, ne présentant pas de coalescence ; D) et E) Capsules formées à une pression d'huile pré-gélifiante de 350 mbar, mais pour lesquelles l'huile n'est pas bien arrivée à cause d'un problème fluidique, les capsules ont une forme de larme (flèches rouges) ; F) Capsules formées à une pression d'huile pré-gélifiante de 350 mbar, mais pour lesquelles l'huile n'est pas bien arrivée à cause d'un problème fluidique, les capsules ont des formes très variées.

Les Figures suivantes montrent des exemples de capsules obtenues en alginate de référence SLG100 (Figure 105), Système A (Figure 106), Système C (Figure 107), et alginate-Kétoprofène (Figure 108). Les numérotations des différents lots sont faites chronologiquement. Les premiers lots correspondent donc à des protocoles de synthèse effectués par l'EPFL en début de thèse, n'étant pas aussi optimisés (et aussi visqueux) que ceux effectués en fin de thèse. Le Tableau 33 rassemble les valeurs obtenues pour les différents paramètres caractérisés, et pour les différents lots de capsules formés, à des pressions d'huile de soja et d'huile pré-gélifiantes de 300 et 350 mbar respectivement.

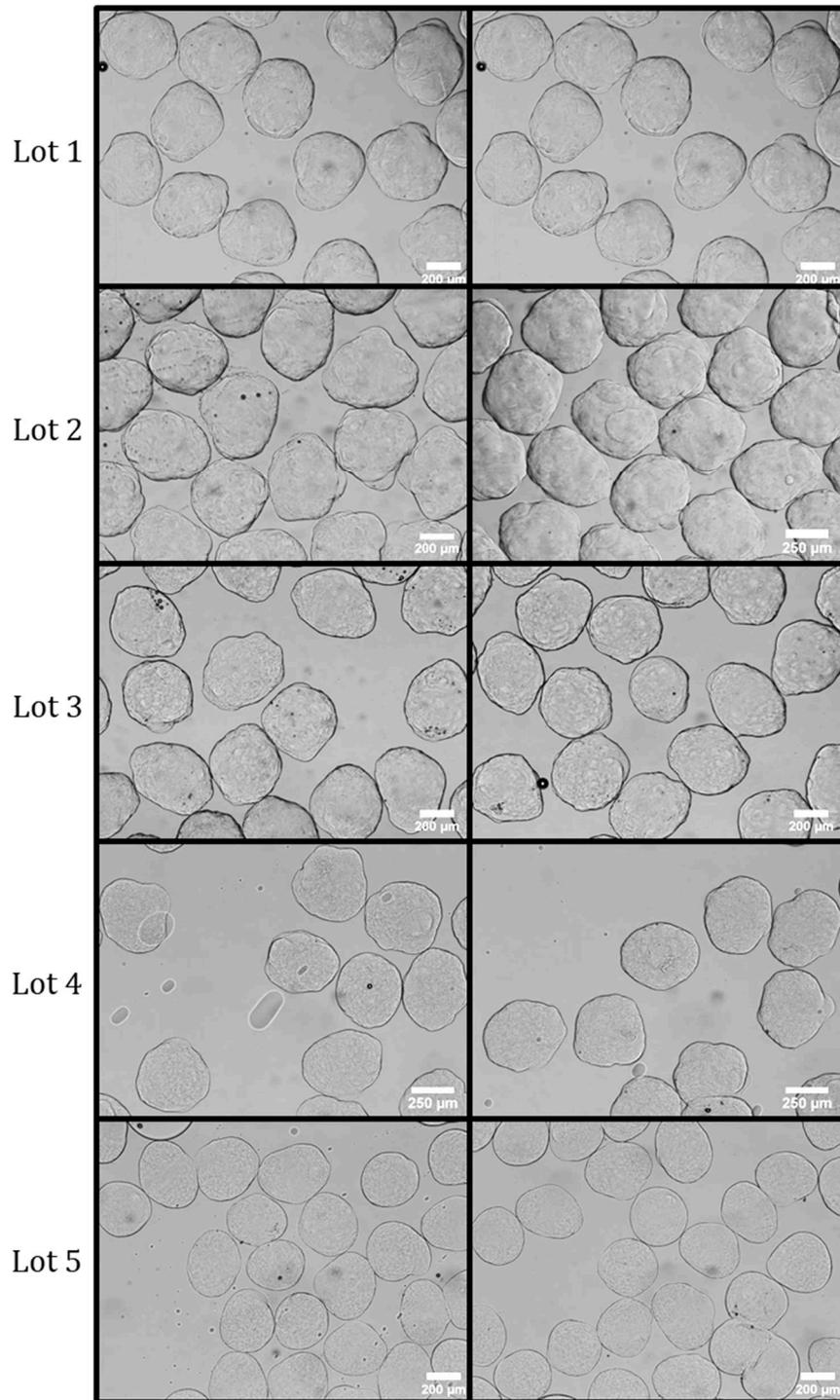


Figure 105 : Exemples de capsules obtenues en système microfluidique MFFD550 avec l'alginate de référence SLG100-2,5%

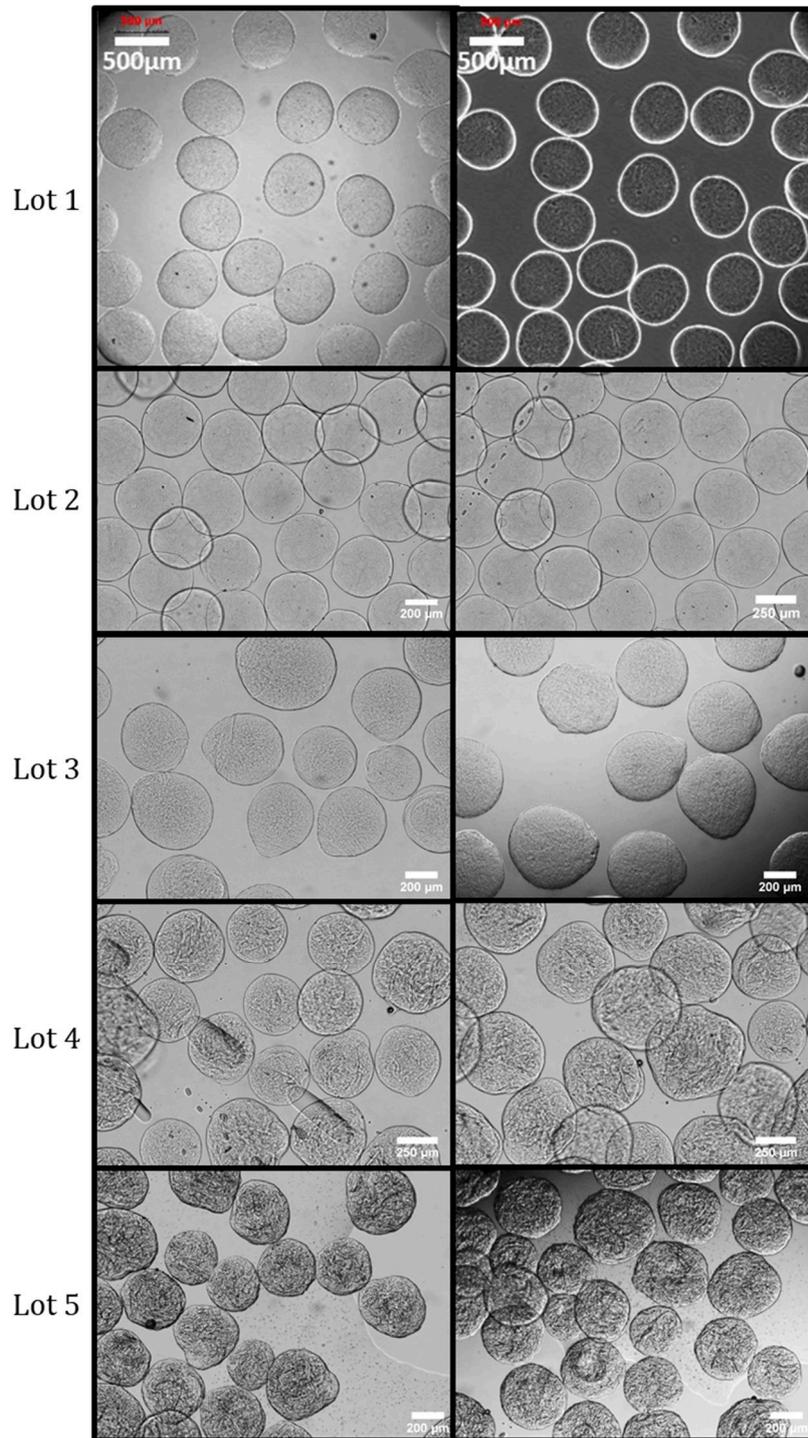


Figure 106 : Exemples de capsules obtenues en système microfluidique MFFD550 avec l'alginate Système A-4%

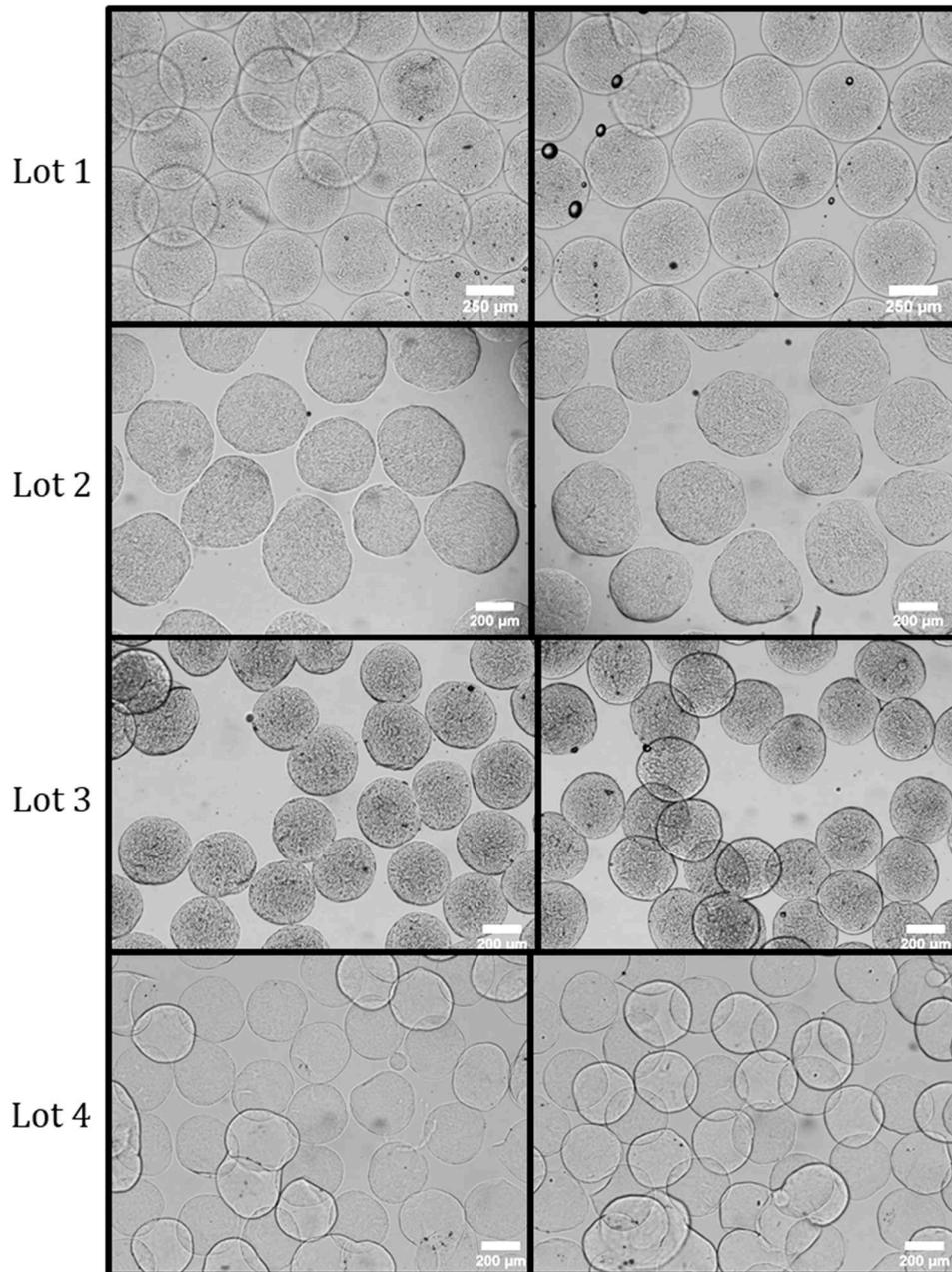


Figure 107 : Exemples de capsules obtenues en système microfluidique MFFD550 avec l'alginate Système C-4%

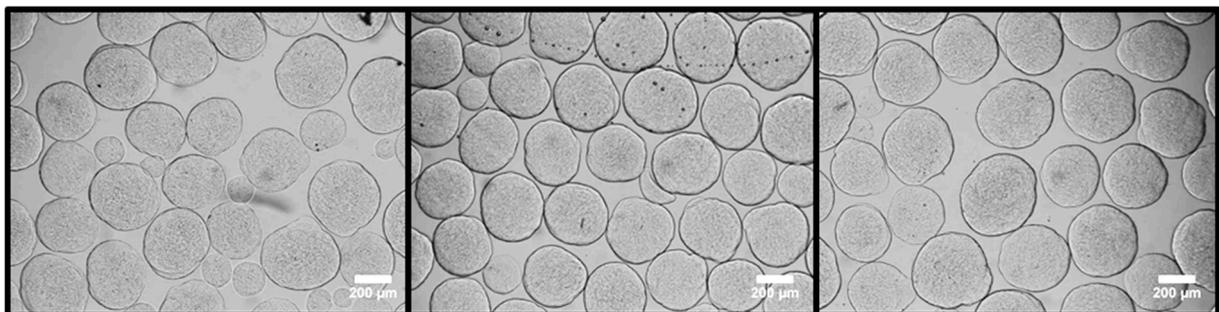


Figure 108 : Exemples de capsules obtenues en système microfluidique MFFD550 avec l'Alginate-Kétoprofène-4%

On peut voir que pour un même alginate, les capsules n'ont pas toutes le même aspect. La différence se voit particulièrement pour le Système A et le Système C. En effet, les capsules formées avec les premiers lots de ces alginate (lots 1 et 2 pour le Système A, et lot 1 pour le Système C) paraissent plus lisses, celles formées après paraissent plus denses et compactes. D'après nos observations, cela semble être dû à la viscosité des alginate. En effet, malgré le fait que les mesures de rhéologie n'ont pu être effectuées sur tous les différents lots d'alginate, leurs aspects lors de leur manipulation pendant les expériences, au cours des trois ans de thèse, ont clairement montré une augmentation globale de leur viscosité (due à l'optimisation des procédés de synthèse par l'EPFL). Les premiers lots sont donc beaucoup moins visqueux que les derniers.

Alginate	Lot	% gouttes satellites	Moyenne diamètre	Coefficient de variation (%)	Aspect Ratio
SLG100-2,5%	1	0	440,59	4,67	0,89
	2	1,06	471,02	4,85	0,86
	3	0	428,12	4,36	0,89
	4	0	431,43	4,11	0,91
	5	0	338,59	6,30	0,89
SLM100-2,5%		0	390,18	3,13	0,95
Système A-4%	1		589	2,2	
	2	1,29	385,25	2,89	0,94
	3	0	437,09	13,01	0,93
	4	0	495,67	8,80	0,94
	4	1,09	467,15	16,23	0,94
	5	0,41	370,67	15,65	0,94
Système C-4%	1	0	417,66	2,89	0,98
	2	0,2	441,22	11,28	0,89
	3	0	505,58	17,27	0,93
	3	0	340,02	5,39	0,94
	4	2,92	318,69	3,85	0,94
Kétoprofène-4%		9	345,64	10,67	0,92

Tableau 33 : Caractérisation des capsules obtenues avec les différents alginate en système microfluidique simplifié MFFD550, et pour des pressions d'huile de soja et d'huile pré-gélifiante de 300 et 350 mbar respectivement

Certaines productions de capsules ont donné lieu à des coefficients de variation relativement élevés (aux alentours de 10 % et plus) (Tableau 33). Dans la majorité des cas, ces variations en tailles de capsules sont dues à un problème de solubilisation du polymère ou de pré-gélification.

Si le polymère est mal solubilisé (comme ça peut être le cas pour des viscosités élevées), il forme des agrégats au niveau du MFFD, et les gouttes formées présentent donc des tailles variées (Figure 109, représentant les capsules d'alginate Système A-4% lot 5, ayant un CV de 15,65 %). Si les gouttes ne sont pas suffisamment pré-gélifiées (de par un problème fluïdique, un bouchon au niveau d'une connectique par exemple), les capsules ont des formes et tailles très variées (Figure 110 représentant des capsules de Système A-4% lot 4, dont le CV est de 8,8%, et Figure 111 représentant des capsules de Système C-4% lot 3, donc le CV est de 17,27%).

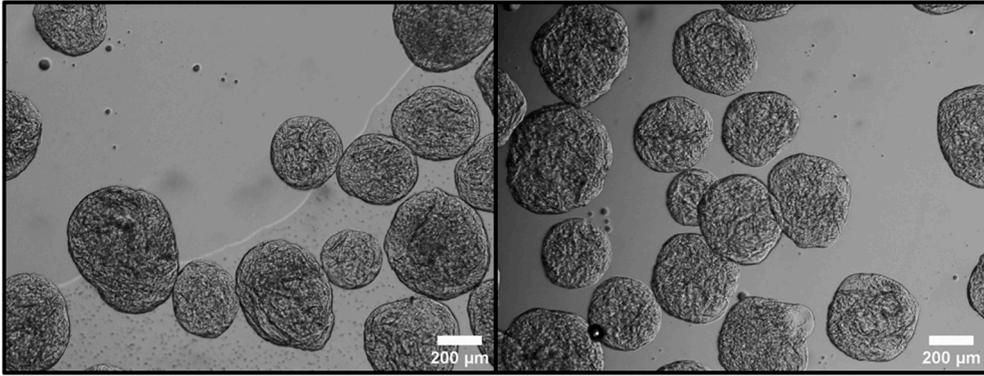


Figure 109 : Capsules d'alginate Système A-4% lot 5, dont le CV est de 15,65 % : la variation en taille est due à une mauvaise solubilisation de l'alginate, créant des gouttes d'agglomérats plus grosses, suivies de gouttes plus petites.

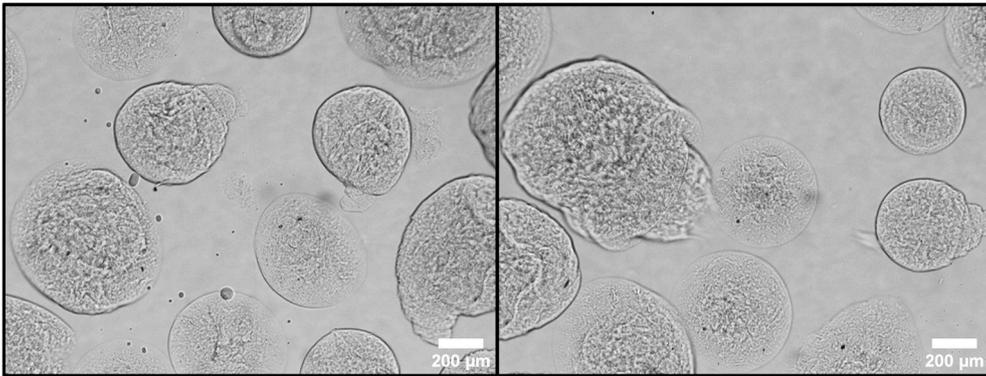


Figure 110 : Capsules d'alginate Système A-4% lot 4, dont le CV est de 8,8% : la variation en taille est due à problème de pré-gélification.

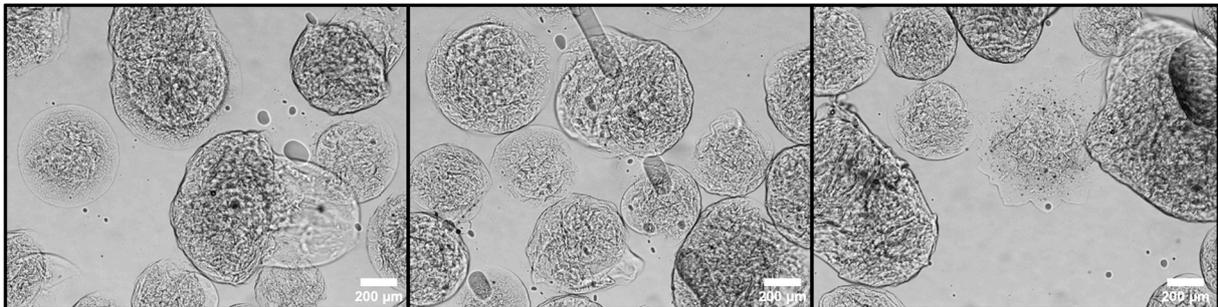


Figure 111 : Capsules d'alginate Système C-4% lot 3, dont le CV est de 17,27% : la variation en taille est due à problème de pré-gélification

Les valeurs notées en rouge dans le Tableau 33 correspondent à des productions de capsules pour lesquelles un problème a été rencontré, soit de pré-gélification, soit de solubilisation. Les coefficients de variation obtenus pour ces lots ne sont donc pas exploitables. En considérant uniquement les valeurs de CV pour les encapsulations qui n'ont pas rencontrées de problèmes majeurs, on obtient le graphique en Figure 112, représentant les CV pour les différents alginates.

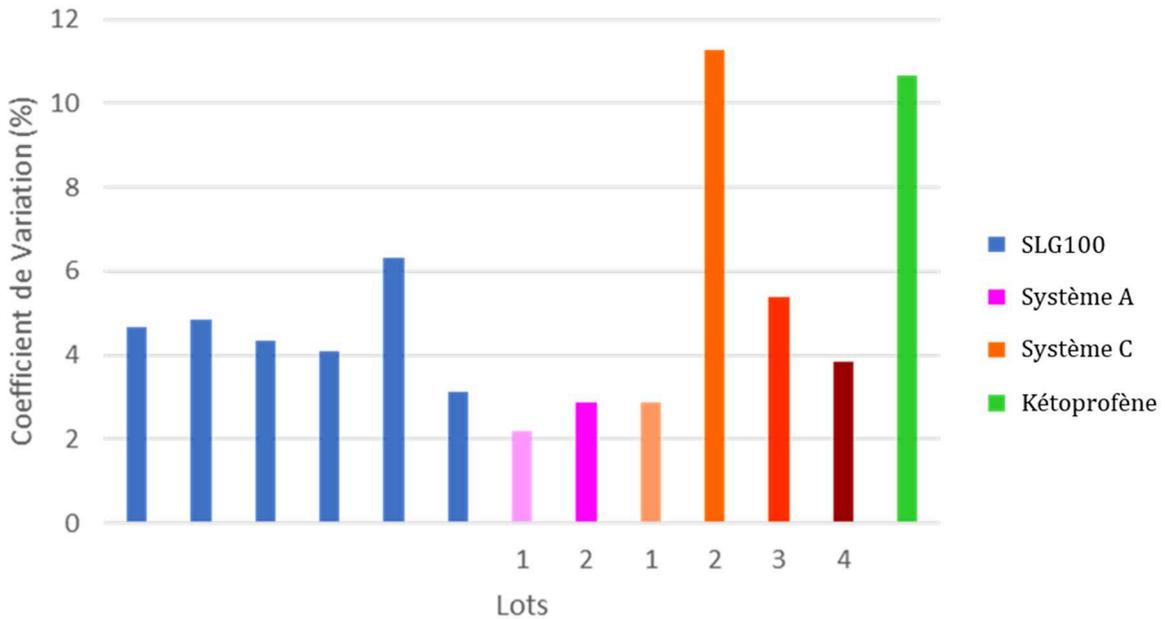


Figure 112 : Coefficients de variations obtenus lors des productions de capsules vides avec les différents alginates

Les capsules les plus monodisperses sont produites avec l’alginate Système A (CV inférieur à 3%). Les capsules d’alginate de référence SLG100 ont un coefficient de variation moyen inférieur à 5 %. Les capsules produites avec l’alginate Système C présentent des coefficients de variation relativement hétérogènes, démontrant que les propriétés varient d’un lot à l’autre. Il est cependant difficile de conclure avec ces résultats car le nombre de valeurs est faibles.

Concernant la présence de gouttes satellites, à partir des résultats obtenus en termes d’élasticité des polymères, il semblerait logique d’obtenir plus de gouttes satellites avec l’alginate Système C, qui est plus élastique que l’alginate de référence et l’alginate-Kétoprofène. Or à partir de la caractérisation des capsules, on observe plus de gouttes satellites pour l’alginate-Kétoprofène.

Ce résultat peut être expliqué par différentes hypothèses :

- Le lot d’alginate-kétoprofène sur lequel a été effectué les caractérisations de viscoélasticité n’est pas le même que celui avec lequel les capsules ont été formées. Il est donc possible que le lot utilisé pour la formation de capsules soit beaucoup plus élastique que celui caractérisé en rhéologie.
- Notre méthode consiste à détecter les gouttes satellites à partir de l’observation des capsules gélifiées, or afin d’être gélifiées, ces gouttes doivent passer l’interface huile-eau lors de leur récupération en solution gélifiante, à l’extérieur du système microfluidique simplifié. Comme expliqué auparavant dans le chapitre V, le passage de l’interface dépend entre autres de la taille de goutte, et pour des gouttes de l’ordre de quelques micromètres, le temps de coalescence est élevé.³⁵² Par conséquent, il est possible que des gouttes satellites soient restées à l’interface et n’aient jamais été récupérées, biaisant ainsi nos interprétations. Il serait donc intéressant de coupler ces caractérisations avec des mesures de taille de goutte au niveau de la jonction MFFD.
- Les gouttes satellites produites circulent plus vite que les grosses car elles sont au centre de l’écoulement et rattrapent la grosse goutte, coalescent et augmentent la disparité entre les gouttes.

Concernant la sphéricité des capsules (représentée par l'Aspect Ratio), les valeurs notées en rouge dans le tableau sont celles pour lesquelles la forme des capsules était trop impactée par un problème de gélification ou solubilisation. Elles n'ont donc pas été prises en considération, et la Figure 113 représente les valeurs prises en compte pour les différents alginates.

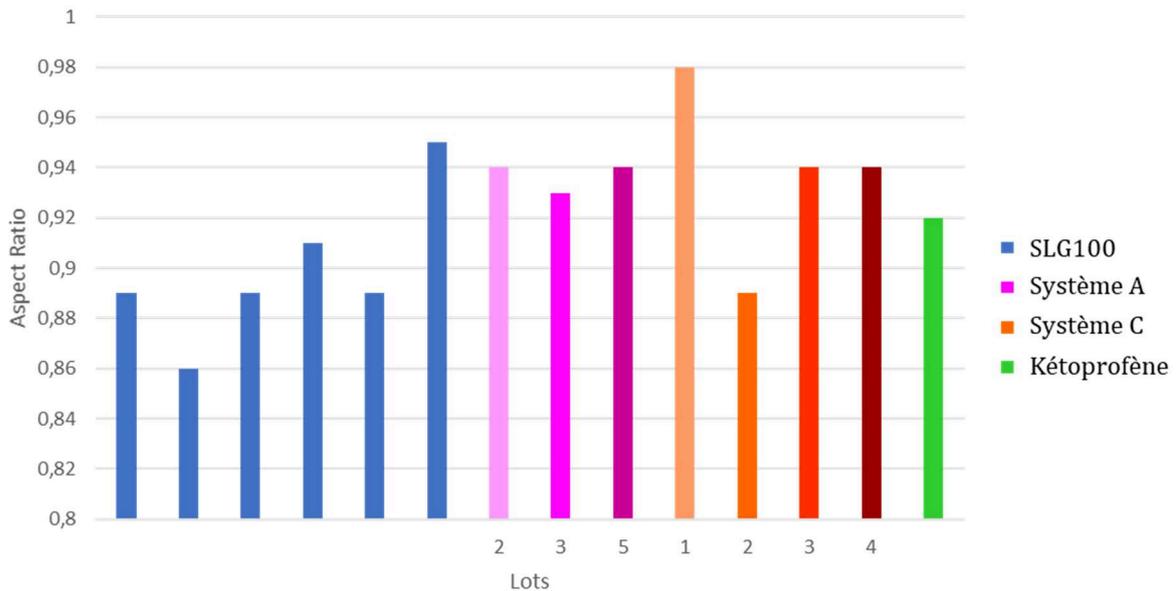


Figure 113 : Aspect Ratio obtenus lors des productions de capsules vides avec les différents alginates

Les capsules produites en alginates Système A et Système C sont globalement beaucoup plus sphériques que celles produites en alginate de référence SLG100 (leur Aspect Ratio est plus proche de 1) (c'est également le cas pour l'alginate Kétoprofène, mais n'ayant qu'une valeur, ce n'est pas possible d'en conclure sur une tendance). La force principale qui agit dans le fait de rendre les gouttes sphériques est la tension interfaciale : une augmentation de la tension interfaciale entraîne une plus grande sphéricité de goutte³⁶³. Or d'après le chapitre Encapsulation, les valeurs des tensions interfaciales des différents alginates sont classées dans cet ordre :

$$\text{SLG100} > \text{Alginate-Kétoprofène} > \text{Système C} > \text{Système A}$$

Les gouttes en alginates PEGylés sont donc normalement moins sphériques qu'en alginate de référence. Dans nos analyses, comme expliqué précédemment, il n'a pas été possible d'étudier la taille et la forme au niveau de la formation des gouttes, et les tailles et formes sont donc étudiées sur les gouttes gélifiées (capsules). En étudiant les capsules au lieu des gouttes, un paramètre essentiel entre en jeu : la gélification des gouttes. Il a été vu que ce paramètre a un impact important sur la taille et la forme des capsules obtenues lorsque l'apport en huile pré-gélifiante n'est pas suffisant. Il y a également un impact lorsque l'apport est suffisant, voire trop important.

Dans notre système, lors de la pré-gélification, l'huile pré-gélifiante arrive dans le canal de phase continue en co-écoulement sur les parois supérieure et inférieure, à une pression plus importante que l'huile de soja. Ainsi, la différence d'écoulement entre les deux huiles peut déformer la goutte, et si l'alginate est plus visqueux, la forme sphérique de la goutte sera mieux maintenue. C'est la raison pour laquelle les capsules d'alginates PEGylés sont plus sphériques que les capsules d'alginate de référence.

1.2 Perméabilité

Comme expliqué dans l'Etat de l'Art, un autre paramètre important dans une optique de greffe des capsules pour le diabète de type 1 est la perméabilité de ces dernières.

D'après la revue de Rokstad *et al.*¹⁴¹, la perméabilité optimale recommandée est celle de pores de 13 nm maximum³⁶⁴, afin de ne pas laisser passer les immunoglobulines, qui ont une taille effective allant de 5 à 15 nm³⁶⁵. Cependant, d'autres études ont montré que des pores de plusieurs dizaines de nanomètres permettent également de protéger les îlots encapsulés, alors que les immunoglobulines peuvent donc passer^{209,366}. De la même manière, différentes études se contredisent sur l'importance de bloquer les cytokines (~5-20 kDa) et chémokines (~8-14 kDa) en plus des cellules immunitaires (~50-250 kDa)^{367,368}.

Afin de déterminer la taille de pores maximale, il est nécessaire de comprendre les processus mis en jeu lors de la destruction des cellules encapsulées. Dans le cadre d'allogreffes, le rejet est dû principalement au contact direct entre les cellules encapsulées et les cellules effectrices immunitaires. Par conséquent, une protection des cellules greffées à l'aide d'une encapsulation par un matériau dont la perméabilité permet de les protéger des cellules immunitaires est suffisante pour éviter un rejet. En revanche, dans le cadre de xénogreffes, les composants sécrétés par les cellules encapsulées sont vus comme des antigènes étrangers, conduisant à la production d'immunoglobuline. Ces immunoglobulines entraînent la destruction des cellules à travers la membrane. A ces processus s'ajoute l'action des cytokines, qui peuvent diriger les cellules vers l'apoptose.

Il serait donc plus prudent d'avoir une perméabilité de capsules empêchant le passage des cellules effectrices immunitaires, ainsi que des cytokines et des sécrétions cellulaires, cependant, ces deux dernières ont un poids moléculaire très faible (8 à 50 kDa), et bloquer leur passage pourrait également bloquer le passage de composés nutritionnels essentiels à la survie des cellules (comme le glucose, 180 Da), ou de composés nécessaires sécrétés par les cellules (comme l'insuline, 6 kDa). Il est donc difficile de trouver la perméabilité adéquate pour les capsules, comme en témoignent différentes études^{141,369,370}. Cependant, la littérature témoigne de nombreux cas de succès d'allogreffes et de xénogreffes à l'aide de capsules dont la perméabilité stoppe uniquement les cellules effectrices immunitaires.^{109,366,369,371,372} L'objectif fixé dans le cadre de cette thèse a donc été d'obtenir des capsules dont la perméabilité stoppe les cellules effectrices du système immunitaire ainsi que les différentes immunoglobulines (150-900 kDa), mais ne stoppe pas les cytokines et chémokines.

Pour cela, différents tests ont été mis en place. Tout d'abord, le protocole développé par Mahou et Wandrey⁶ à l'EPFL a été utilisé : il consiste à mettre une grande quantité de capsules dans une solution contenant des molécules de dextran marquées par de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), fluorescente. La fluorescence de la solution est mesurée au cours du temps, donnant ainsi la concentration en dextran-FITC. Si les capsules sont perméables aux molécules de dextran-FITC, la concentration de la solution baisse, sinon elle reste constante.

Cependant, cette technique n'est pas adaptée aux capsules produites en microfluidique, car elles sont beaucoup plus petites que celles produites dans le cadre de l'étude de Mahou et Wandrey⁶, et la baisse de concentration n'est donc pas suffisante pour détecter précisément si les capsules sont perméables ou non aux molécules de dextran-FITC.

Une autre technique a donc été développée au sein du laboratoire (décrite dans le Matériel et Méthodes). Elle consiste à mettre les capsules, ainsi que des billes de verre (qui servent de référence) dans des solutions de FITC-dextran de différentes tailles (20 kDa, 40 kDa, 70 kDa,

150 kDa, 250 kDa, et 500 kDa), pendant 48 heures. Les capsules sont ensuite observées au microscope confocal, directement dans la solution de FITC-dextran, en plaçant la focalisation du microscope au centre de la capsule. On obtient le type d'images présentées en Figure 115 (Exemple sur les capsules d'Alginate-Kétoprofène). La comparaison entre la fluorescence au centre de la capsule et la fluorescence du fond permet ainsi d'en déduire le pourcentage de molécules de FITC-dextran étant passées à l'intérieur des capsules, grâce au protocole décrit dans le Matériel et Méthodes.

Cette méthode a été utilisée sur des capsules d'alginate de référence SLG100, alginate Système A, Système C, et alginate-Kétoprofène, produites en système microfluidique simplifié MFFD550 (voir Figure 114). Les résultats obtenus sont présentés en Figure 116.

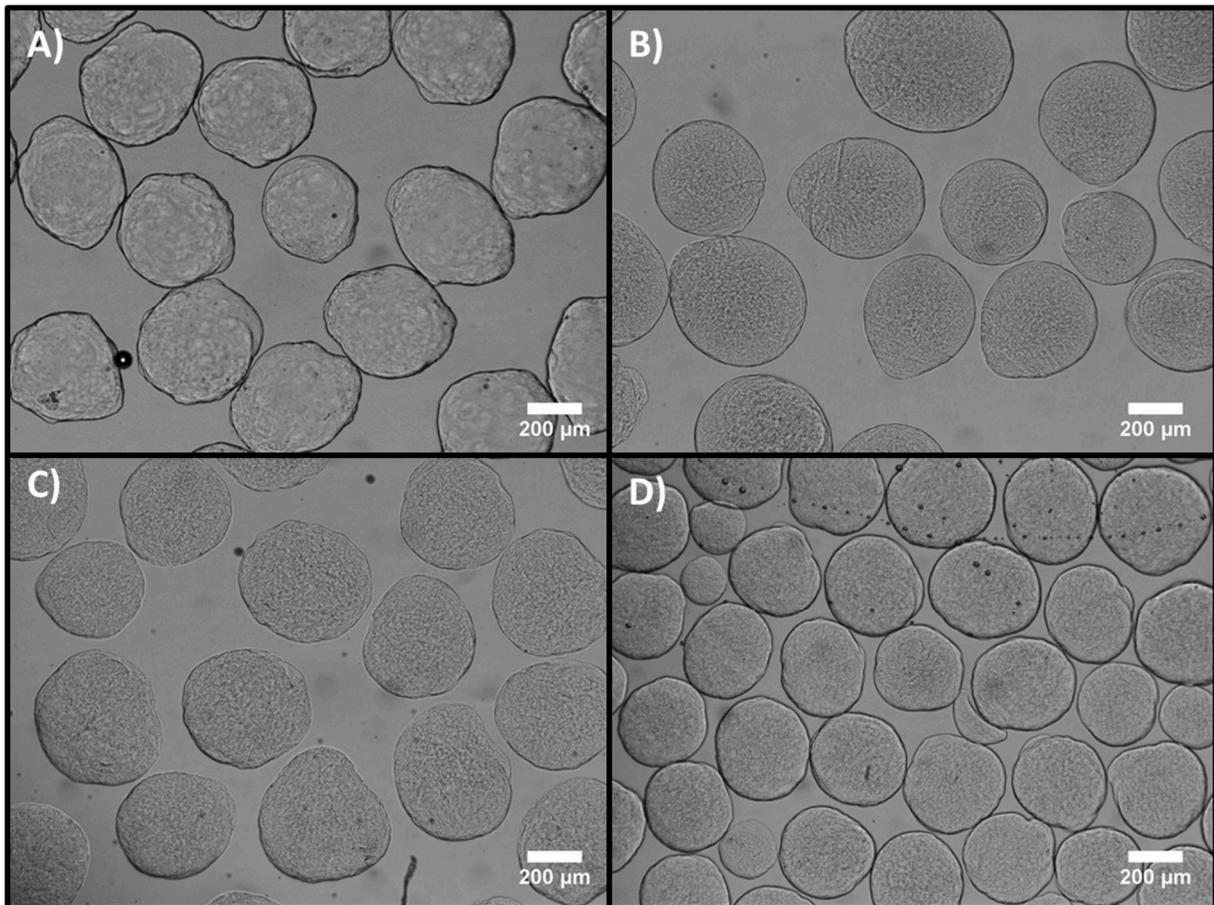


Figure 114 : Capsules produites en système microfluidique simplifié MFFD550, pour les mesures de perméabilité, avec les différents alginates : A) Alginate de référence SLG100-2,5% ; B) Alginate Système A ; C) Alginate Système C ; D) Alginate-Kétoprofène

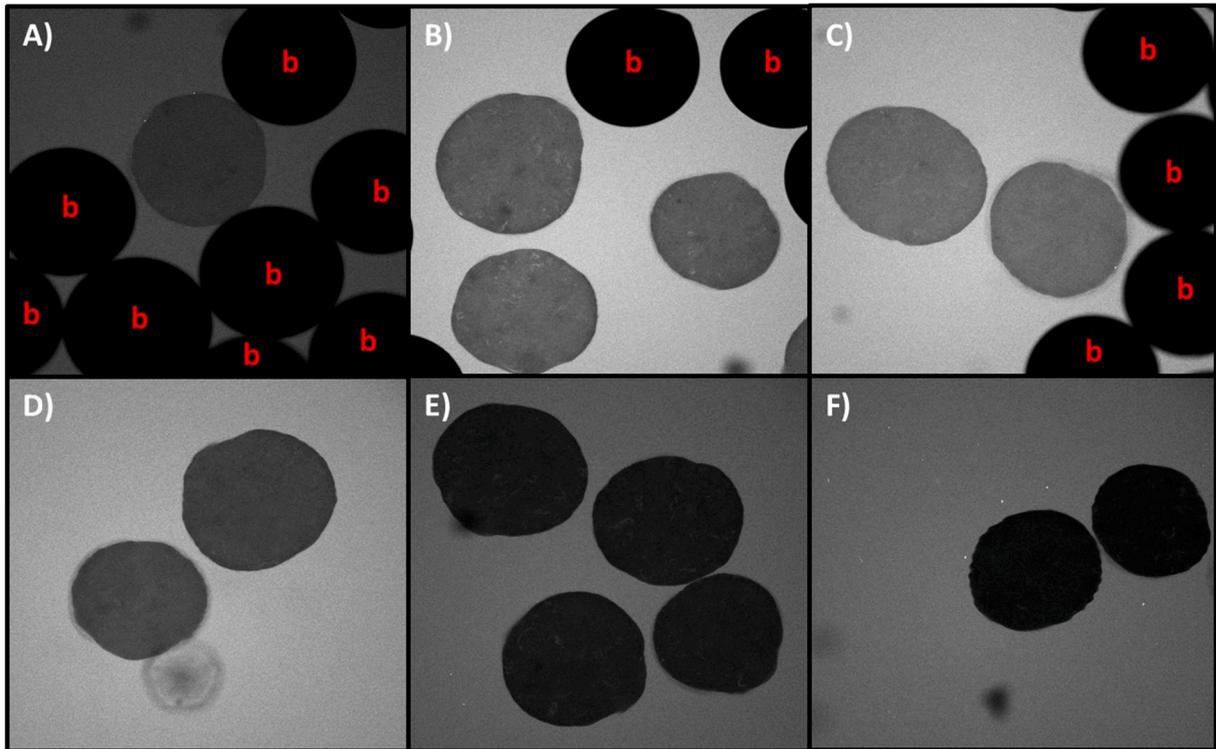


Figure 115 : Microscopie confocale des capsules d'alginate Système C-4% dans des solutions contenant des molécules dextran fluorescentes de différentes tailles : A) Solution de molécules Dextran de 20 kDa ; B) Solution de molécules Dextran de 40 kDa ; C) Solution de molécules Dextran de 70 kDa ; D) Solution de molécules Dextran de 150 kDa ; E) Solution de molécules Dextran de 250 kDa ; F) Solution de molécules Dextran de 500 kDa ; les lettres « b » rouges désignent les billes de verre

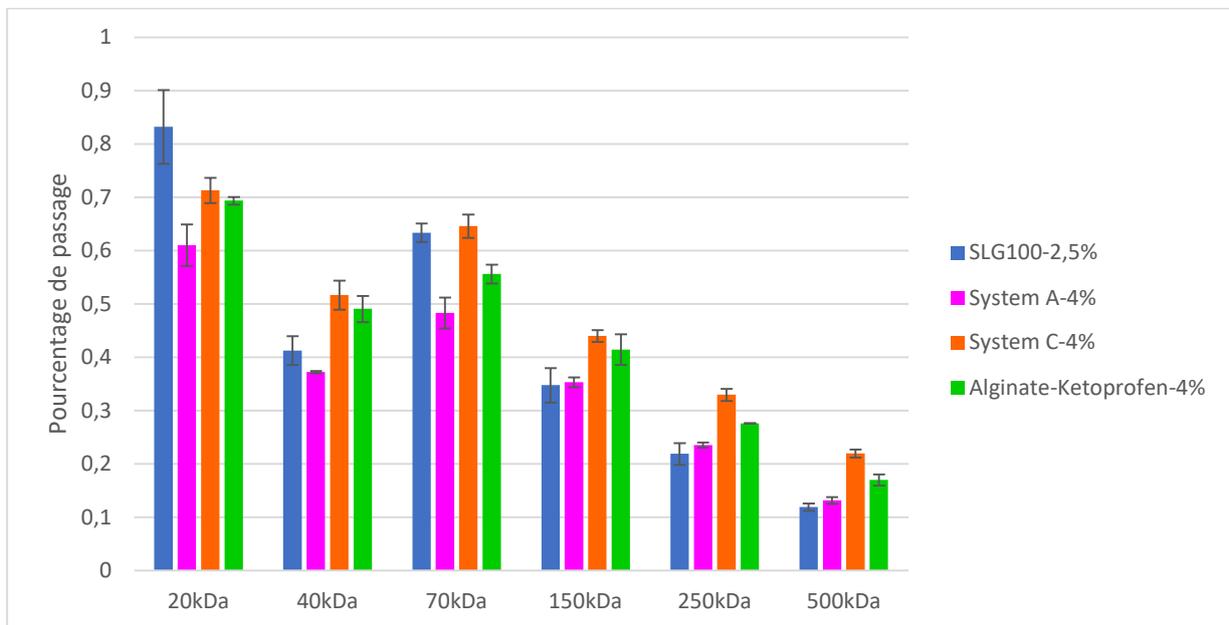


Figure 116 : Pourcentages de passage de molécules de dextran-FITC de différentes tailles, à l'intérieur de capsules de différents alginates, normalisés par les pourcentages de passage dans des billes de verre.

On peut voir que la perméabilité des capsules diminue bien avec la taille des molécules de dextran-FITC, et que les perméabilités sont très proches pour les différents alginates. Le poids moléculaire

seuil (Molecular Weight Cut Off MWCO) au-dessus duquel on peut considérer que les molécules ne passent plus à travers les capsules est d'environ 250 kDa. Comme expliqué précédemment, les capsules ne doivent pas être perméables aux cellules du système immunitaire, et aux immunoglobulines, qui peuvent être plus petits. En effet, dans le corps humain, l'immunoglobuline la plus présente est l'immunoglobuline G (IgG), qui représente 80 % des immunoglobulines du corps humain. Or c'est également la plus petite des immunoglobulines, puisqu'elle ne mesure que 150 kDa. La perméabilité des capsules est donc adaptée au blocage des cellules du système immunitaire et des immunoglobulines autres que l'IgG, mais semble pouvoir laisser passer ces dernières, et est donc peut-être légèrement trop importante pour bien protéger les cellules encapsulées.

Il serait donc intéressant de coupler ces résultats avec des tests *in vivo*, afin de vérifier si la perméabilité des capsules est en effet trop importante ou si ces dernières permettent malgré tout une bonne protection des cellules encapsulées.

2. Encapsulation de cellules

Suite aux différentes caractérisations effectuées sur capsules vides, il a été décidé d'effectuer des tests d'encapsulation de cellules, avant de passer aux encapsulations d'îlots. Pour cela, le protocole décrit dans le Matériel et Méthodes a été suivi. Le but de ces expériences était de vérifier la biotolérabilité du matériau et l'impact du procédé d'encapsulation sur la viabilité des cellules.

Ces dernières ont donc été marquées par du Fluorescein Diacetate (FDA) (pour les cellules vivantes) et de l'Iodure de Propidium (IP) (pour les cellules mortes) tout au long des expériences d'encapsulation, afin de mesurer leur viabilité (voir Matériel et Méthodes également).

Les images obtenues en fluorescence des cellules marquées sont ensuite analysées sur le logiciel ImageJ. Ces tests ont été faits uniquement sur l'alginate Système A, et l'alginate de référence. En effet, au moment où ces expériences ont été effectuées, les tests sur les alginates Système C et Alginate-Kétoprofène n'avaient pas encore démarré.

2.1 Capsules obtenues

Les premières expériences d'encapsulation d'INS-1 ont permis de montrer qu'il était possible d'encapsuler les cellules avec l'alginate Système A, et d'obtenir des capsules très sphériques et monodisperses (voir Figure 118). Leurs tailles et formes ont été caractérisées de la même manière que pour les capsules vides, et les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 34.

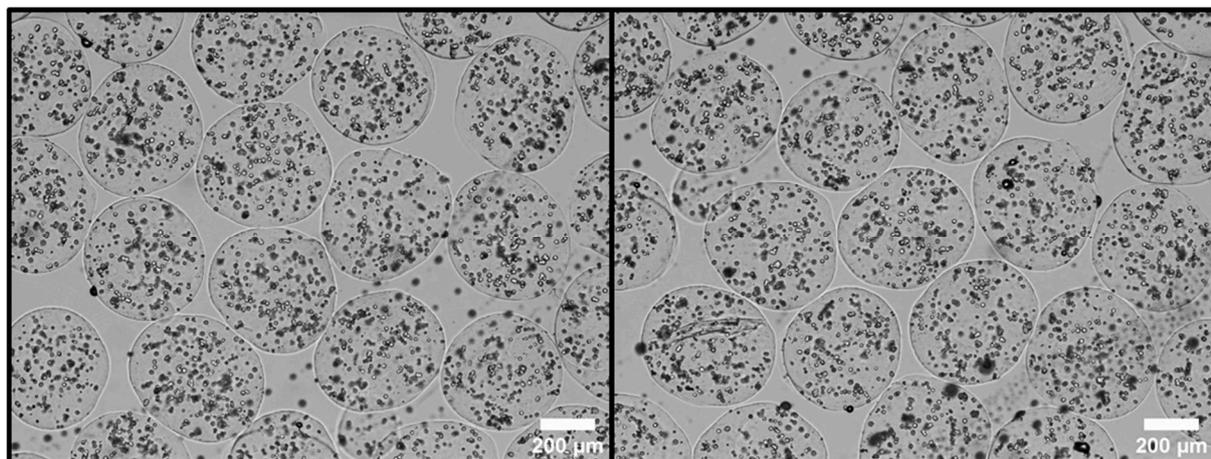


Figure 117 : Encapsulation d'INS-1 en alginate de référence SLM100-2,5 %

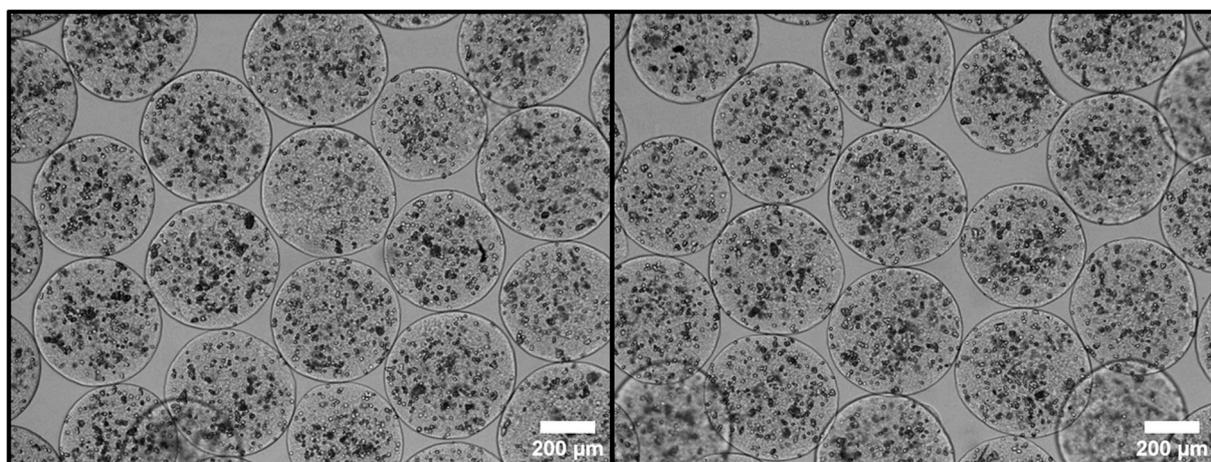


Figure 118 : Encapsulation d'INS-1 en alginate Système A - 4 %

Alginate	Moyenne diamètre	Coefficient de variation (%)	Aspect Ratio
SLM100-2,5%	457,15	3,09	0,91
Système A-4%	464,37	5,52	0,97

Tableau 34 : Caractérisation des capsules obtenues avec les différents alginates en système microfluidique simplifié MFFD550, lors de l'encapsulation d'INS-1

On peut voir que les capsules d'alginate Système A sont beaucoup plus sphériques (Aspect Ratio plus proche de 1) et les coefficients de variation sont proches et inférieurs à 6 % pour les deux alginates. Cependant, lors des premiers tests, les mesures de viabilités effectuées sur les cellules en fin d'encapsulation ont montré que toutes les cellules encapsulées en alginate Système A étaient mortes (Figure 119).

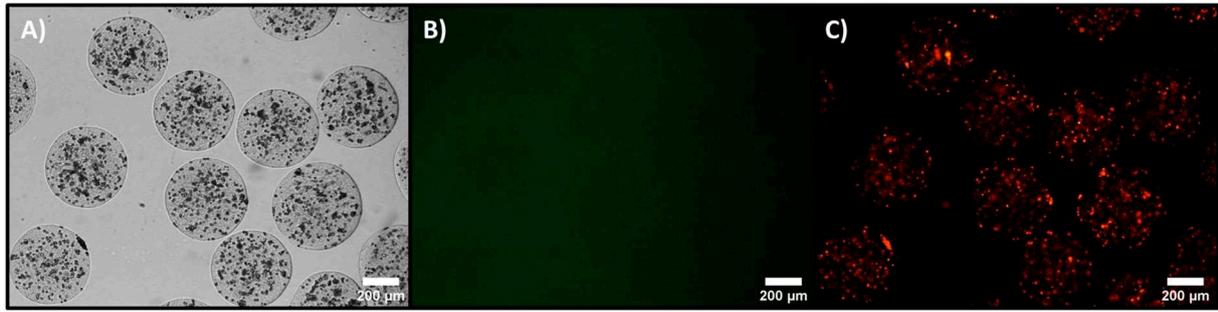


Figure 119 : INS-1 encapsulées en alginate Système A-4 %, marquées au Syto13-IP : A) Image en lumière blanche ; B) Image en fluorescence, les cellules vivantes marquées par le Syto13 fluorescent en vert ; C) Image en fluorescence, les cellules mortes marquées par l'IP fluorescent en rouge

Les deux explications envisagées ont été les suivantes :

- Le polymère a un effet néfaste sur les cellules (à cause d'une pureté non optimale par exemple)
- L'encapsulation a un effet néfaste sur les cellules : il a été démontré dans le chapitre Encapsulation que les cisaillements engendrés par l'encapsulation en microfluidique ne sont pas néfastes pour les cellules. Cependant, le temps de formation de goutte n'étant pas le même pour tous les polymères, la durée de l'encapsulation peut être plus longue pour certains polymères, et donc entraîner une baisse de la viabilité des cellules encapsulées.

2.2 Optimisation des résultats

Afin de déterminer précisément l'influence du polymère sur la viabilité des cellules, il a été décidé d'encapsuler les mêmes cellules en parallèle avec l'alginate de référence SLG100-2,5 %, et l'alginate testé Système A-4 % (dans le même système microfluidique simplifié MFFD550 en même temps, et pendant la même durée). Une carte microfluidique et un montage expérimental ont donc été développés pour paralléliser les encapsulations. Ces expériences ont permis d'évaluer l'impact du polymère, en gardant constants les autres paramètres (type de cellule, procédé et durée d'encapsulation). Les résultats obtenus sont présentés en Figure 120, et les photos correspondantes en Figure 121 et Figure 122.

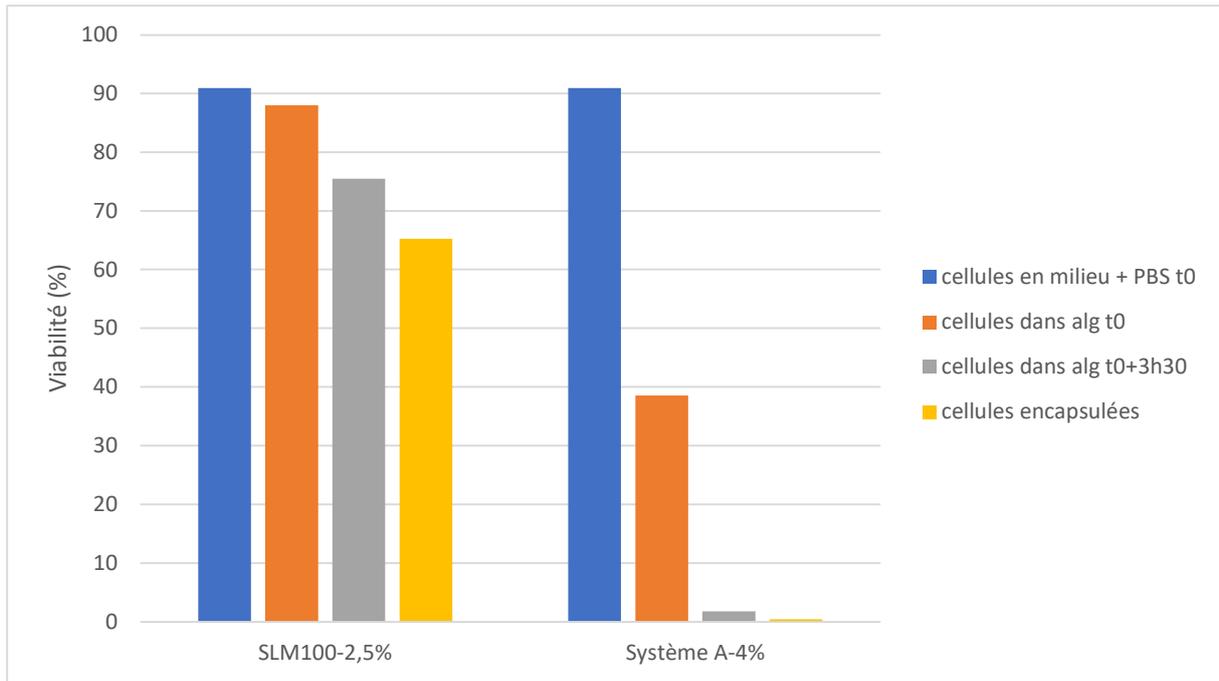


Figure 120 : Résultats de mesures de viabilités sur une des premières encapsulations d'INS-1 en alginate Système A-4% et alginate de référence SLG100-2,5% en parallèle, en système microfluidique simplifié MFFD550

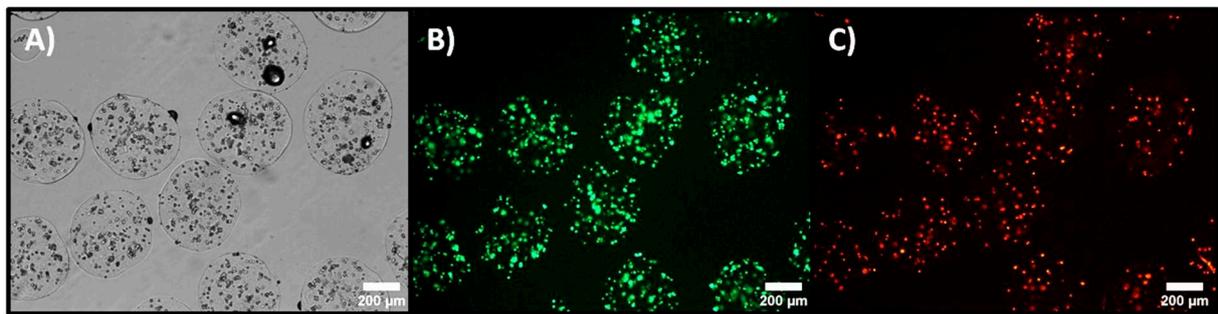


Figure 121 : INS-1 encapsulées en alginate de référence SLM100-2,5 %, marquées au Syto13-IP : A) Image en lumière blanche ; B) Image en fluorescence, les cellules vivantes marquées par le Syto13 fluorescent en vert ; C) Image en fluorescence, les cellules mortes marquées par l'IP fluorescent en rouge



Figure 122 : INS-1 encapsulées en alginate Système A-4 %, marquées au Syto13-IP : A) Image en lumière blanche ; B) Image en fluorescence, les cellules vivantes marquées par le Syto13 fluorescent en vert ; C) Image en fluorescence, les cellules mortes marquées par l'IP fluorescent en rouge

La viabilité des cellules encapsulées en alginate de référence baisse d'environ 25 % par rapport à la viabilité des cellules en milieu avant encapsulation. L'alginate de référence étant pur et sans endotoxine, et le taux de cisaillement appliqué n'étant pas néfaste pour les cellules (Chapitre V),

cette baisse de viabilité est donc imputable à la durée de l'encapsulation (pendant laquelle les cellules n'ont accès à aucun nutriments). Il peut donc être nécessaire de réduire la durée d'encapsulation, afin de moins affecter la viabilité des cellules.

La baisse de viabilité est beaucoup plus importante pour les cellules encapsulées en alginate Système A, puisque toutes les cellules encapsulées sont mortes, et les cellules restantes dans l'alginate (non encapsulées) en fin d'expérience présentent une viabilité d'environ 2 %. Cette baisse de viabilité est donc entraînée uniquement par le contact des cellules avec l'alginate non gélifié.

Suite à ces résultats, il a donc été décidé de se focaliser dans un premier temps sur le fait de réduire l'impact du polymère sur les cellules. Pour cela, les équipes de l'EPFL ont optimisé leurs protocoles afin d'améliorer la purification de l'alginate synthétisé, et ces derniers ont été filtrés avant d'effectuer les encapsulations (voir Matériel et Méthodes). Après plusieurs essais, ces optimisations ont permis d'obtenir les résultats présentés en Figure 123 (photos correspondantes en Figure 125 et Figure 124).

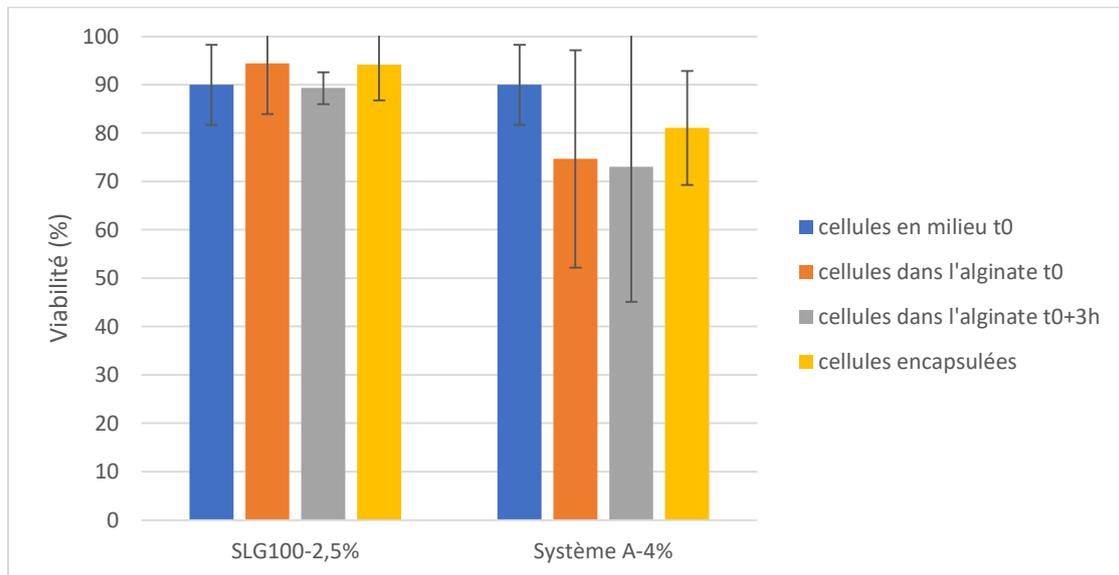


Figure 123 : Résultats de mesures de viabilités sur des INS-1 encapsulées en alginate Système A-4% et alginate de référence SLG100-2,5% en parallèle, en système microfluidique simplifié MFFD550, obtenus après optimisation de la purification et filtration de l'alginate

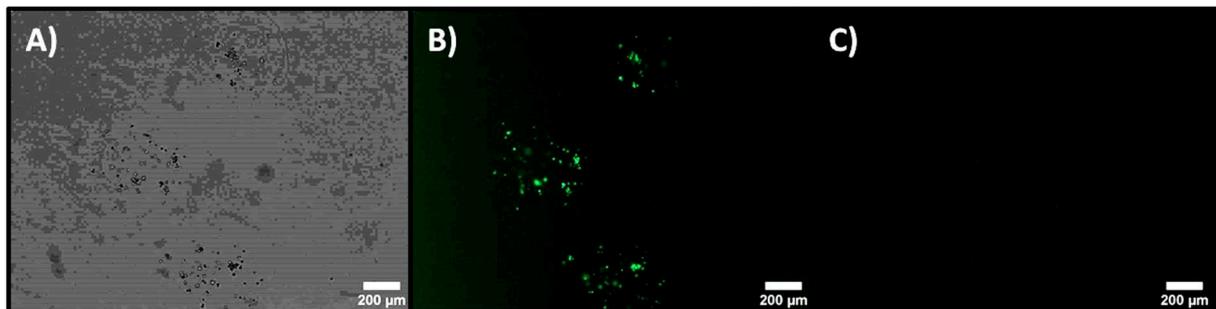


Figure 124 : INS-1 encapsulées en alginate de référence SLG100-2,5 %, marquées au Syto13-IP : A) Image en lumière blanche ; B) Image en fluorescence, les cellules vivantes marquées par le Syto13 fluorescent en vert ; C) Image en fluorescence, les cellules mortes marquées par l'IP fluorescent en rouge

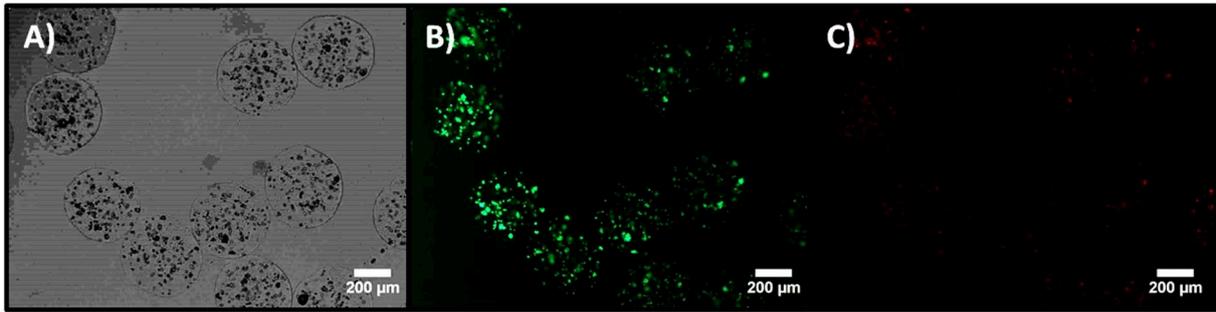


Figure 125 : INS-1 encapsulées en alginate Système A-4 %, marquées au Syto13-IP : A) Image en lumière blanche ; B) Image en fluorescence, les cellules vivantes marquées par le Syto13 fluorescent en vert ; C) Image en fluorescence, les cellules mortes marquées par l'IP fluorescent en rouge

On peut voir que les viabilités obtenues sont bien meilleures pour les deux types d'alginate (94 % de viabilité pour les cellules encapsulées en alginate de référence, et 81 % pour les cellules encapsulées en Système A). Les optimisations effectuées sur le polymère ont donc permis d'obtenir des résultats de viabilité suffisants pour démarrer les tests avec les îlots de Langerhans.

3. Encapsulation d'îlots

Afin de procéder à l'encapsulation des îlots, un protocole similaire à celui suivi pour l'encapsulation de cellules est utilisé. La seule différence est au niveau de la préparation et de la caractérisation des îlots. Avant de les encapsuler, ces derniers sont analysés à l'aide de la macro développée sur ImageJ, et décrite dans le Matériel et Méthodes.

3.1 Caractérisation des îlots

Afin de caractériser la répartition en taille des îlots, une cinquantaine de photos sont prises sur la totalité de la flasque (voir Figure 126), afin d'avoir un échantillon suffisamment grand, et représentant bien tous les îlots. La macro développée sur ImageJ est ensuite utilisée sur la totalité des images. Elle permet de détecter automatiquement les îlots et de calculer leur taille. Suite à cela, on obtient le type de graphiques présentés en Figure 127 et Figure 128.

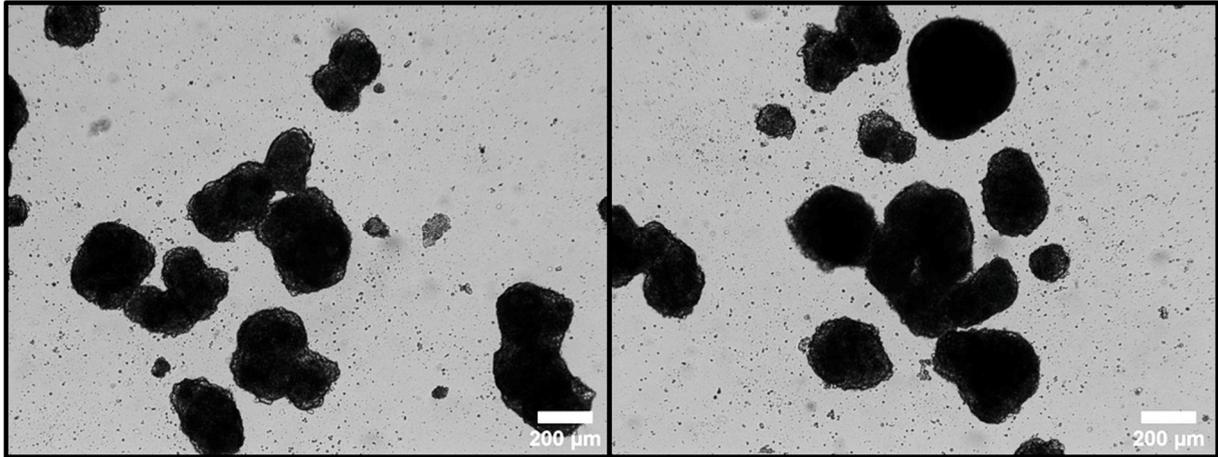


Figure 126 : Îlots de porc nouveau-né

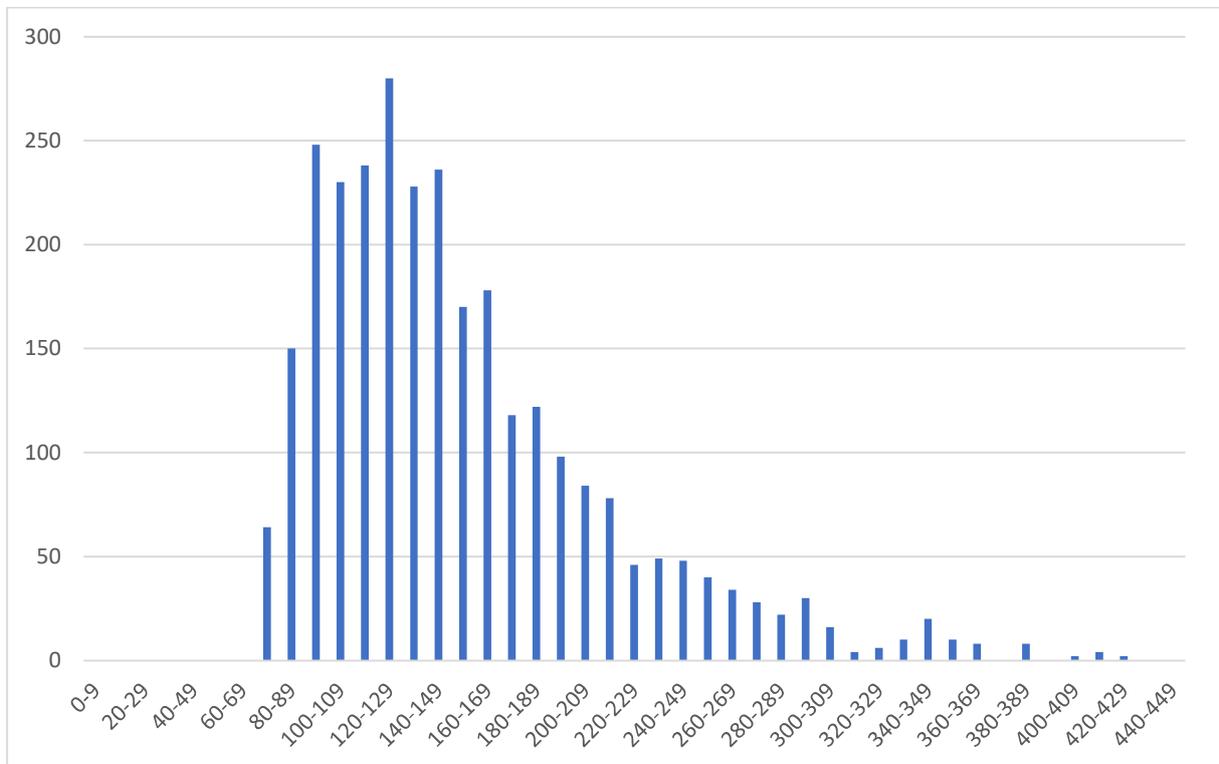


Figure 127 : Exemple de graphique de répartition en taille des îlots de porc, obtenus par caractérisation à l'aide d'une macro sur ImageJ

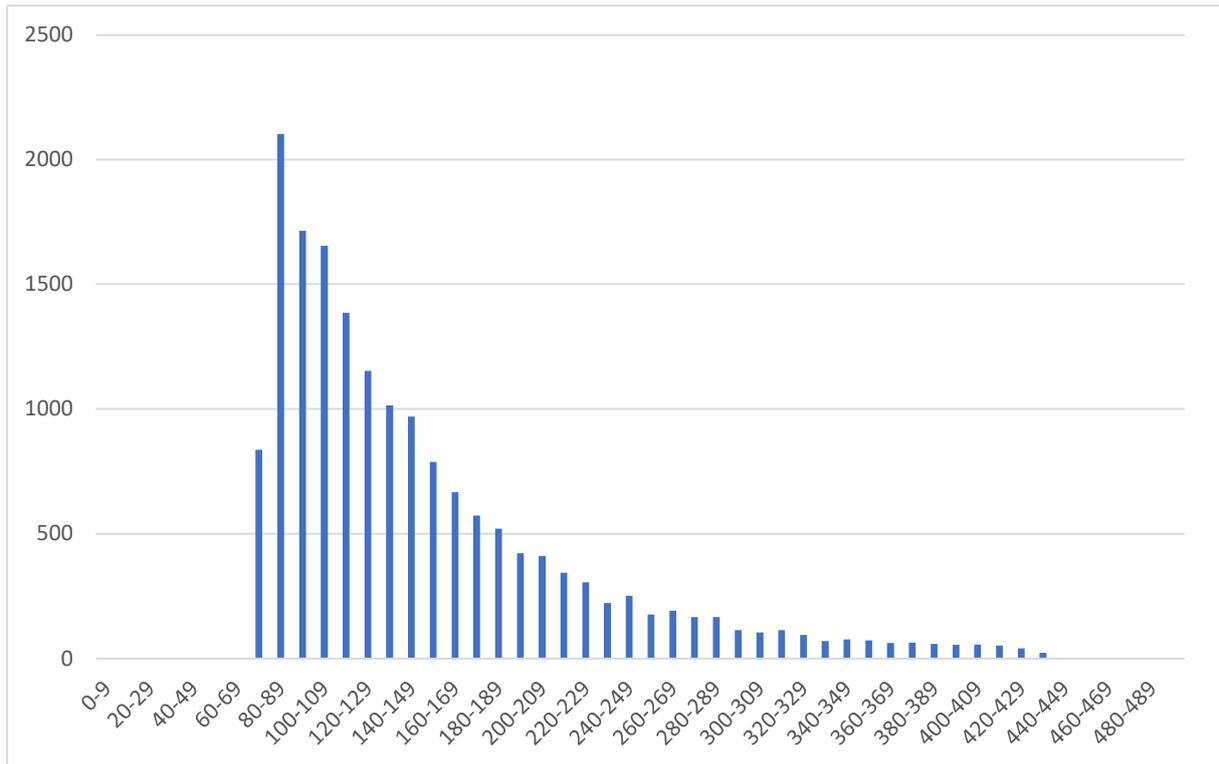


Figure 128 : Exemple de graphique de répartition en taille des îlots de porc, obtenus par caractérisation à l'aide d'une macro sur ImageJ

Selon l'isolation, les tailles des îlots sont réparties de manière plus ou moins homogène (pour certaines encapsulations, 90% des îlots sont répartis sur un intervalle de taille de 120 µm, pour d'autres, sur un intervalle de 300 µm), et sur une gamme plus ou moins grande (allant de 70-350 µm à 70-500 µm environ). Les deux figures sont représentatives des différentes répartitions en taille caractérisées, avec de nombreux îlots ayant un diamètre supérieur à 200 µm. Par conséquent, le système microfluidique choisi a toujours été le système simplifié MFFD550. Toutes les encapsulations effectuées dans la suite de ce chapitre ont donc été faites avec ce système.

3.2 Caractérisation des capsules obtenues

Des exemples de capsules obtenues lors de l'encapsulation des îlots sont présentés en Figure 129 (SLG100-2,5%), Figure 130 (Système A-4%), Figure 131 (Système C-4%) et Figure 132 (Alginate-Kétoprofène). Les numérotations correspondent à différentes expériences. De la même manière que pour les capsules vides formées en microfluidique, lors de l'encapsulation des îlots, les capsules obtenues ont également été caractérisées en termes de taille, forme et monodispersité. Le Tableau 35 rassemble les caractérisations réalisées, et celles correspondant aux images sont indiquées par le même numéro.

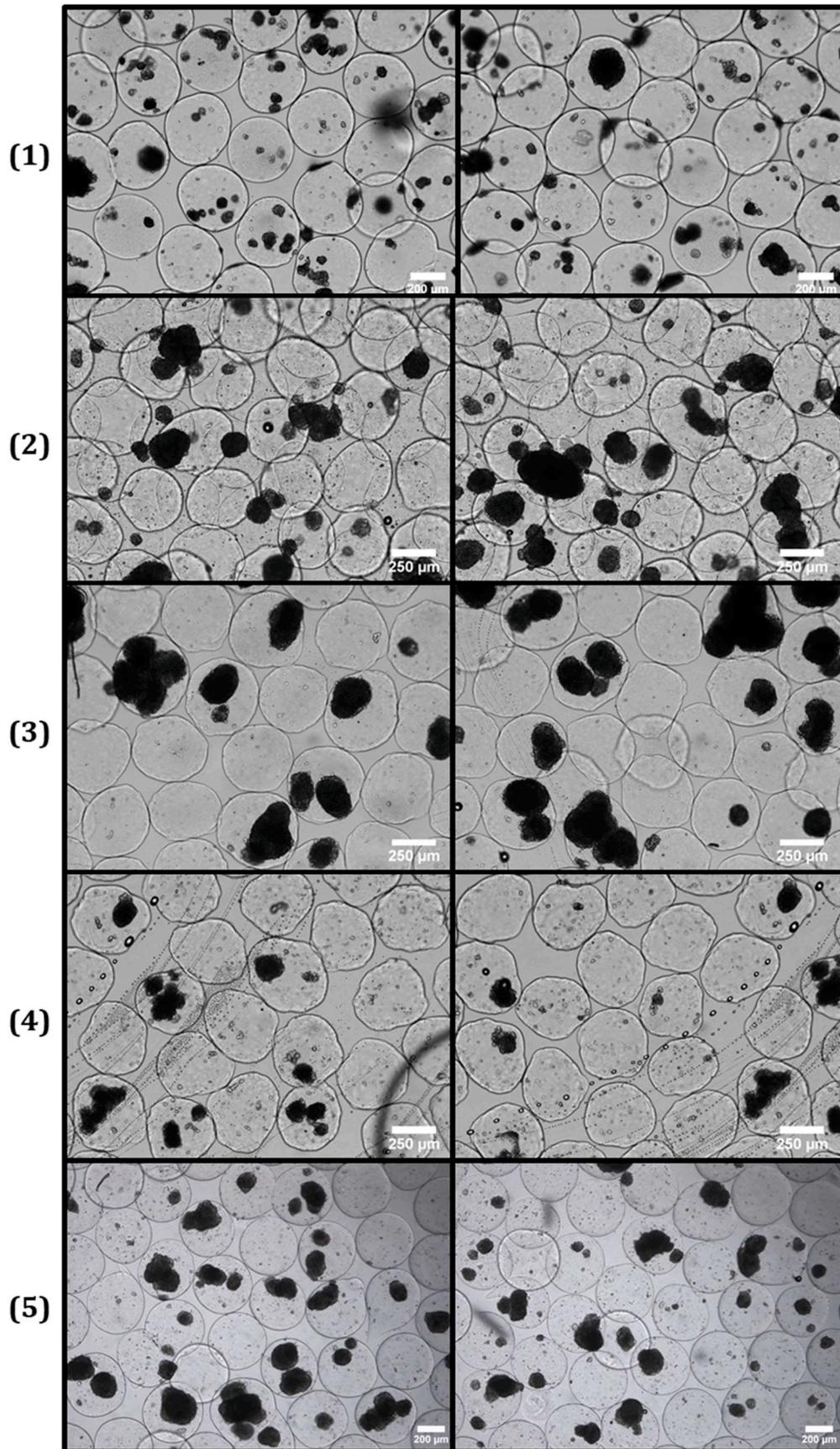


Figure 129 : Exemples de capsules obtenues avec l'alginate de référence SLG100-2,5% lors de l'encapsulation d'îlots de Langerhans en système microfluidique MFFD550

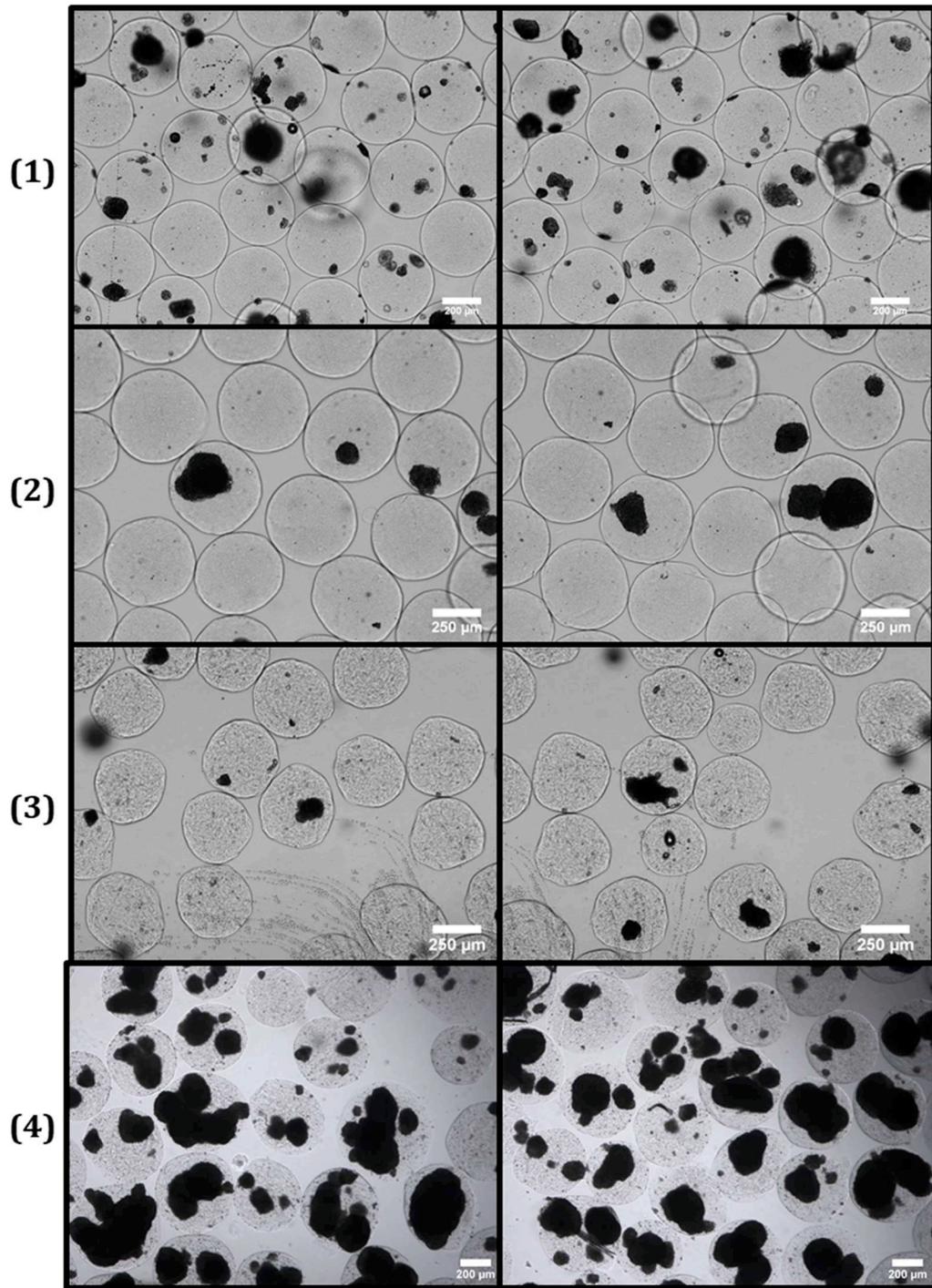


Figure 130 : Exemples de capsules obtenues avec l'alginate Système A-4% lors de l'encapsulation d'îlots de Langerhans en système microfluidique MFFD550

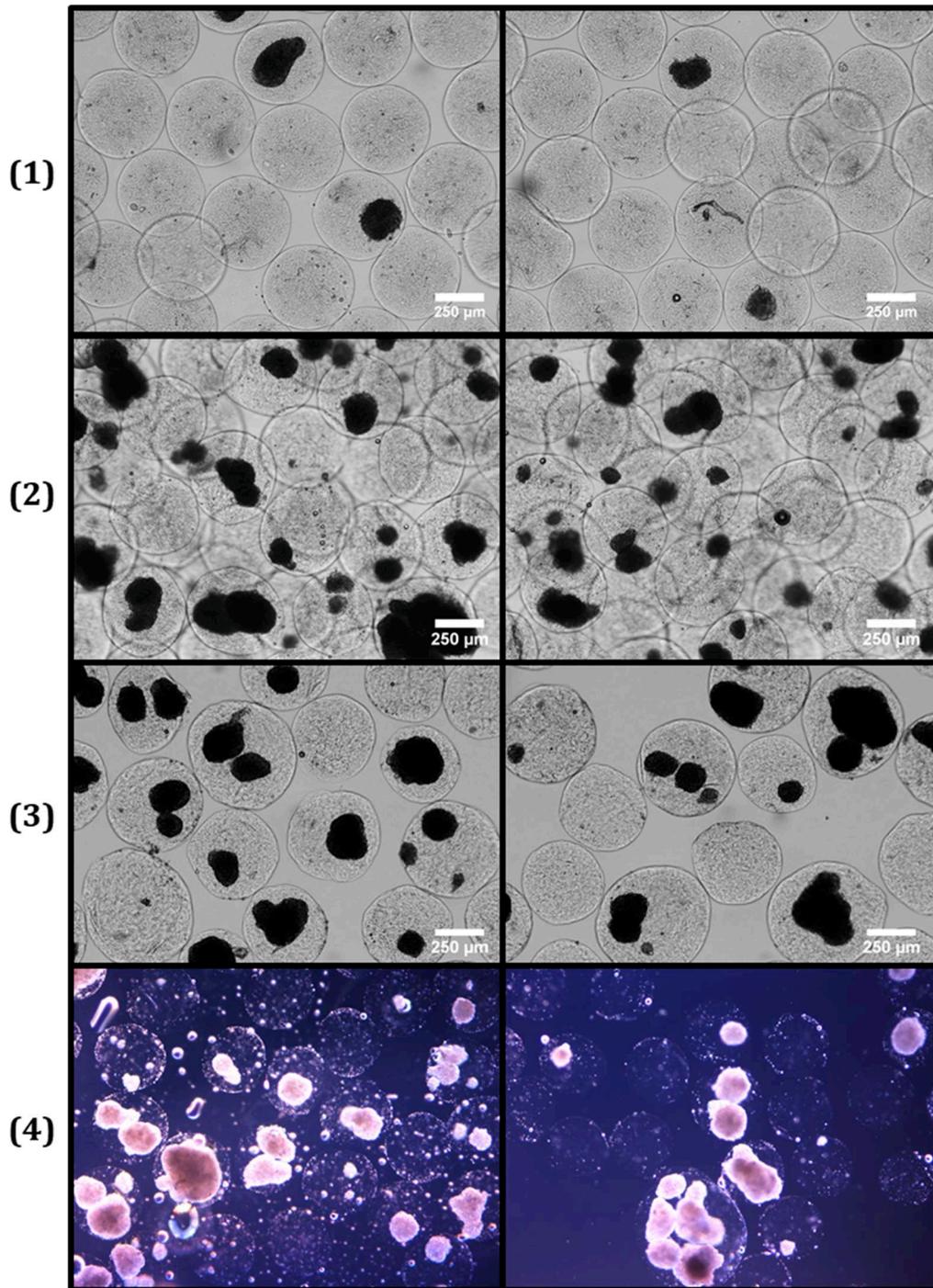


Figure 131 : Exemples de capsules obtenues avec l'alginate Système C-4% lors de l'encapsulation d'îlots de Langerhans en système microfluidique MFFD550

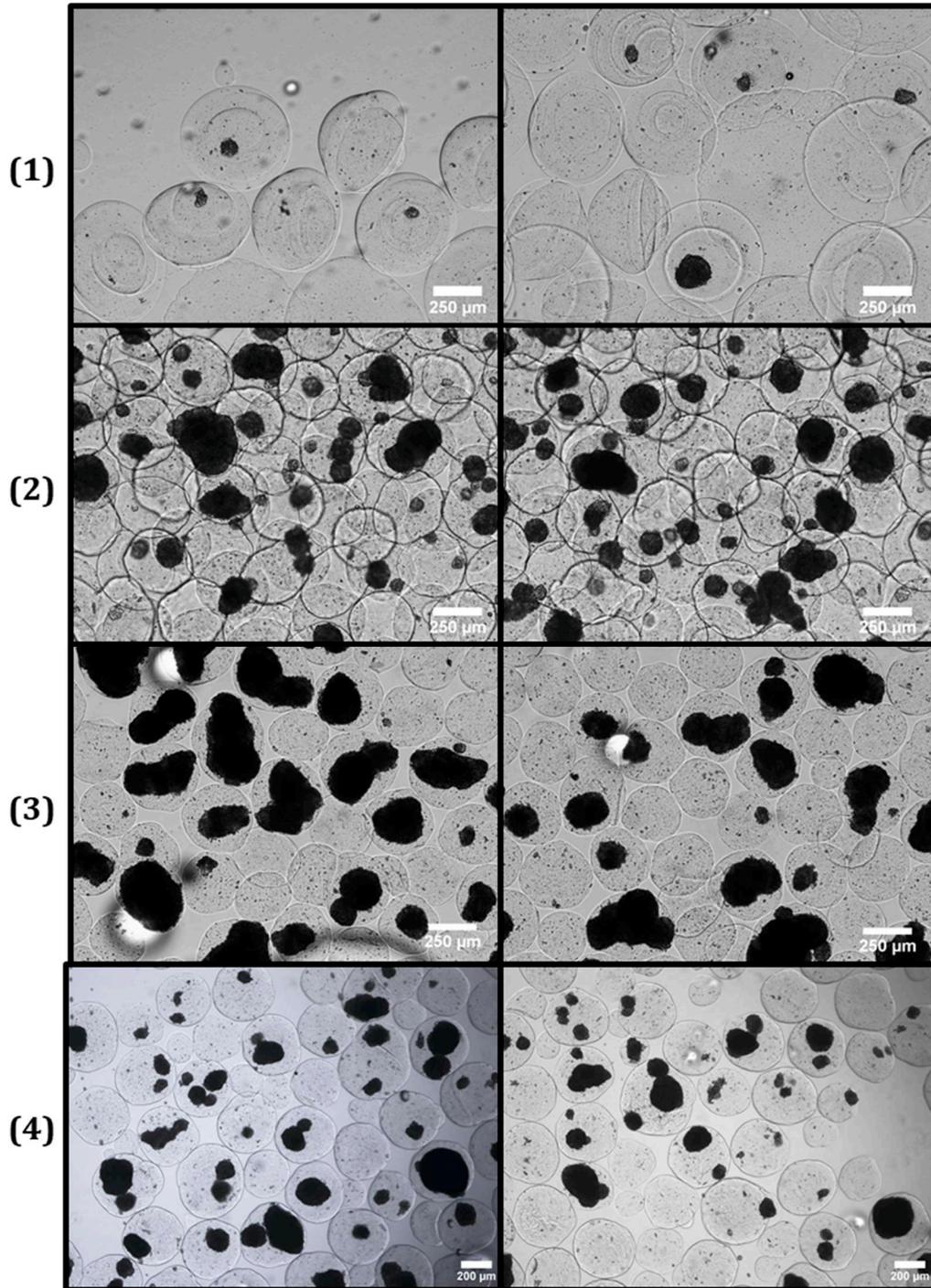


Figure 132 : Exemples de capsules obtenues avec l'Alginate-Kétoprofène-4% lors de l'encapsulation d'îlots de Langerhans en système microfluidique MFFD550

Tout comme pour les capsules vides, les capsules sont de manière générale monodisperses et sphériques, et celles en alginates PEGylés ont un aspect moins lisse, ce qui est probablement dû à leur viscosité. Les valeurs obtenues pour les différents paramètres caractérisés sont rassemblées dans le Tableau 35, et comme pour les capsules vides, les valeurs aberrantes (de par un problème de pré-gélification dans le système microfluidique, ou un problème de solubilisation) sont indiquées en rouge, et ne seront pas prises en considération dans la comparaison des résultats.

Alginate	Moyenne diamètre	Coefficient de variation (%)	Aspect Ratio	% de remplissage	Viabilité	Photo
SLG100	533,16	14,59	0,83	68,18	18,8	
	404,02	3,21	0,87	87,39	55,41	(1)
	414,36	4,17	0,87	45,10	24,99	
	529,80	21,30	0,88	34,29	67,06	
	386,51	5,35	0,89	62,62	67,31	(2)
	426,60	9,60	0,90	64,49	73,69	
	417,61	6,77	0,92	51,35	65,85	(3)
	402,25	5,00	0,88	54,55		(4)
	420,00	5,33	0,96	68,89	70,01	(5)
Système A	464,00	7,36	0,96	64,36	15,93	
	389,34	2,32	0,95	88,79	10,39	(1)
	392,53	4,18	0,97	25	2,11	
	460,09	2,91	0,95	23,58	40,15	(2)
	374,36	8,96	0,94	39,22		(3)
	488,83	11,70	0,95	98,11	49,58	(4)
Système C	455,08	4,12	0,98	16,22	46,08	(1)
	440,96	3,85	0,94	63,06	87,46	(2)
	486,52	13,26	0,93	77,78	61,70	(3)
Kétoprofène	583,38	19,45	0,88	29,90	51,16	(1)
	344,36	8,89	0,90	73,28	67,19	(2)
	327,48	9,73	0,91	48	69,59	(3)
	340,00	7,81	0,94	60,95	46,87	(4)

Tableau 35 : Caractérisation des capsules obtenues lors de l'encapsulation d'îlots de Langerhans avec différents alginates. Les valeurs notées en rouge correspondent à des expériences pour lesquelles un problème de pré-gélification, de solubilisation, ou de concentration en îlots trop élevée s'est présenté ; elles sont aberrantes et ne sont pas prises en considération pour l'interprétation des résultats.

Concernant la sphéricité, les valeurs des Aspect Ratio obtenues sont représentées sous forme de graphique en Figure 133 (les numéros de l'axe des abscisses représentent les différentes encapsulations, dans l'ordre chronologique). On obtient les mêmes résultats que sur capsules vides : les capsules en alginates Système A et Système C sont beaucoup plus sphériques que les capsules en alginate de référence SLG100. Comme expliqué précédemment, cela peut être expliqué par leur viscosité plus élevée, permettant à leur forme de mieux se maintenir pendant leur gélification et leur déplacement. Concernant les capsules d'alginate Kétoprofène, celles obtenues sur les dernières expériences sont plus sphériques que celles des premières encapsulations. La viscosité de l'alginate-Kétoprofène a augmenté au cours des optimisations de synthèse de l'EPFL, et les dernières capsules sont donc produites avec un alginate plus visqueux que les premières.

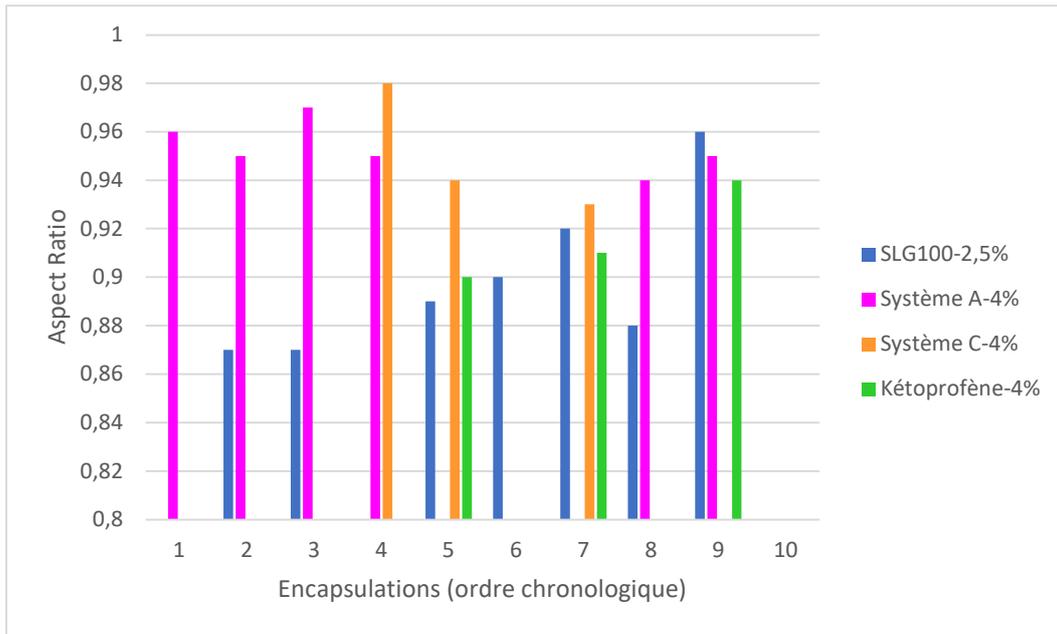


Figure 133 : Aspect Ratio des capsules obtenues lors des encapsulations d'îlots avec les différents alginates. Les numéros de l'axe des abscisses représentent les différentes encapsulations, classées dans l'ordre chronologique

Les valeurs obtenues pour les coefficients de variation sont rassemblées également sous forme de graphique, en Figure 134. Toutes les capsules produites (pour lesquelles aucun problème de pré-gélification ou solubilisation ne s'est présenté) ont des Coefficients de Variation inférieurs à 10 %, ce qui correspond à des capsules relativement monodisperses. Les meilleurs résultats semblent être obtenus pour l'alginate Système C, mais sur seulement deux valeurs, ce qui ne permet pas de conclure sur une tendance générale.

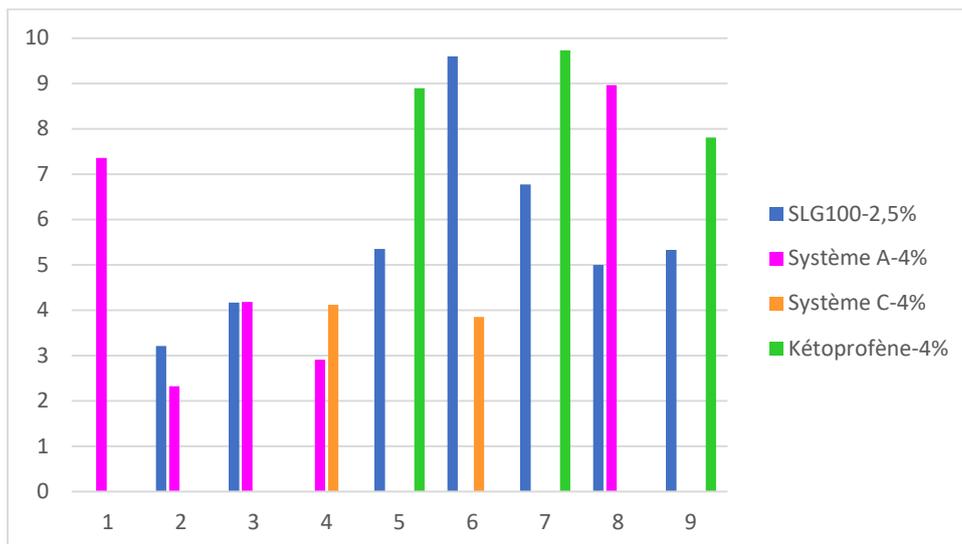


Figure 134 : Coefficients de variation des capsules obtenues lors des encapsulations d'îlots avec les différents alginates. Les numéros de l'axe des abscisses représentent les différentes encapsulations, classées dans l'ordre chronologique

3.3 Paramètres influençant l'encapsulation

Après avoir étudié les différents paramètres influençant les étapes de formation de goutte dans le Chapitre 5, cette partie s'intéresse aux paramètres influençant la formation des capsules, qui sont spécifiques à l'encapsulation d'îlots. Ces paramètres supplémentaires doivent être maîtrisés afin d'obtenir de bons résultats en termes de reproductibilité des capsules, et de viabilité et fonctionnalité des îlots *in vivo*.

3.3.1 Concentration en îlots

Lors de l'encapsulation, il est important d'avoir une concentration d'îlots optimale : l'alginate doit être suffisamment concentré, car une concentration trop faible entraîne la formation de nombreuses capsules vides, ayant deux principaux effets négatifs :

- Augmentation de la durée de l'encapsulation pour le même nombre d'îlots, réduisant donc la viabilité des îlots.
- Augmentation du volume total de capsules, rendant la greffe plus volumineuse.

La Figure 135 présente un exemple de cas où la concentration en îlots n'est pas suffisante, et le pourcentage de capsules vides est donc trop important. Pour la Figure 135 A), le pourcentage de remplissage des capsules était de 25 %, soit 75 % de capsules vides, et pour la Figure 135 B) et C), le pourcentage de remplissage des capsules était de 16,22 %, soit 83,78 % de capsules vides.

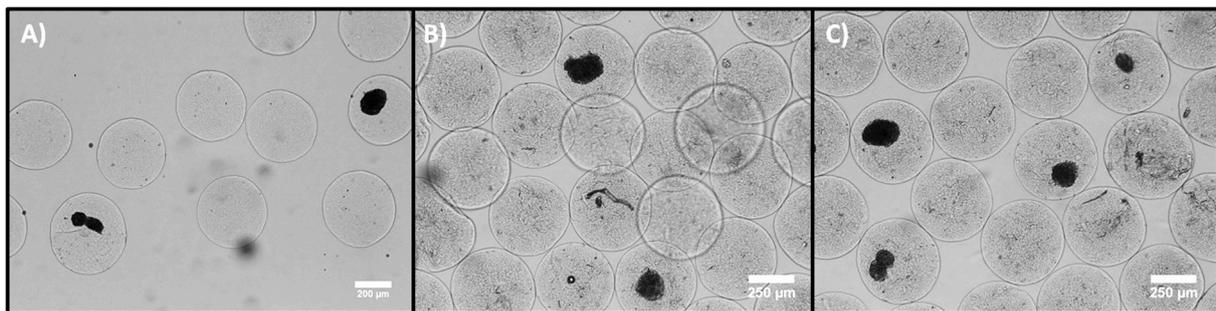


Figure 135 : Exemple de capsules pour lesquelles la concentration en îlots est trop faible : A) capsules d'alginate Système A - 4 %, 75 % de capsules vides ; B) et C) capsules d'alginate Système C-4%, 83,78 % de capsules vides

Une concentration trop importante en îlots peut également entraîner des complications : des capsules trop remplies présentent plus de risques de former des protrusions d'îlots. Dans le cadre d'une greffe de ces îlots encapsulés, ces protrusions entraînent un risque de rejet de la greffe car les îlots en bordure de capsules ne sont pas protégés du système immunitaire de l'hôte. La Figure 136 présente un exemple de capsules obtenues en alginate Système A, pour lesquelles la concentration en îlots était trop importante : les capsules présentent un pourcentage de remplissage de 98,11 %, et un pourcentage de capsules présentant des protrusions d'environ 28 % (représentés sur la Figure par les flèches rouges).

Enfin, une concentration trop importante a également un effet sur le coefficient de variation des capsules. En effet, les capsules contenant trop d'îlots sont plus grandes que les capsules vides, et leur diamètre n'est donc plus contrôlé aussi précisément. Dans le cas de l'encapsulation présentée en Figure 136, le coefficient de variation ainsi obtenu est de 11,70 %, alors que pour les encapsulations où la concentration en îlots est inférieure, les coefficients de variations obtenus sont d'environ 5 % (voir Tableau 35) (c'est la raison pour laquelle cette valeur de coefficient de variation n'a pas été prise en considération dans les analyses précédentes).

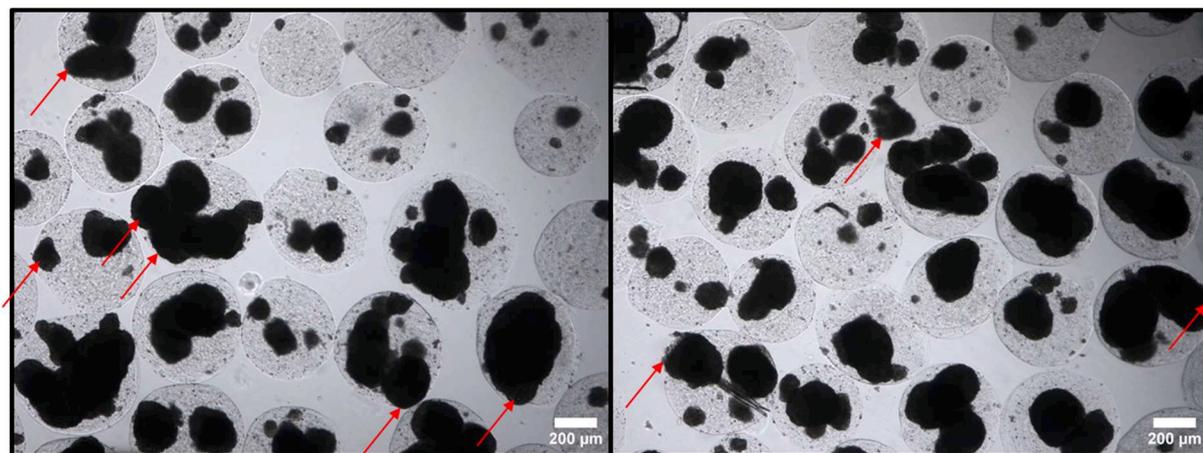


Figure 136 : Exemple de capsules d'alginate Système A-4% pour lesquelles la concentration en îlots est trop élevée ; le pourcentage de remplissage des capsules est de 98,11 %. Les flèches rouges pointent les protrusions d'îlots.

Il est donc important de caractériser le nombre d'îlots avant d'effectuer l'encapsulation. Dans le cadre de cette thèse, l'objectif fixé a été d'utiliser une concentration de 20 000 IEQ d'îlots pour 300 μ l d'alginate (voir Matériel et Méthodes), permettant d'atteindre entre 50 % et 80 % de capsules remplies. Cet objectif a été rempli dans la majorité des cas. Les cas où l'objectif n'a pas été atteint correspondent à une surévaluation ou sous-évaluation du nombre des îlots lors de leur caractérisation.

3.3.2 Répartition des îlots

La présence de protrusions d'îlots dans les capsules peut être également due à une mauvaise répartition des îlots, même dans un cas où la concentration n'est pas trop élevée. Si les îlots ne sont pas répartis de façon homogène dans l'alginate, lors de l'avancement de ce dernier pour former les gouttes, les îlots vont arriver par agglomérats, formant ainsi des gouttes contenant un grand nombre d'îlots, puis un grand nombre de gouttes vides.

La mauvaise répartition des îlots dans l'alginate peut avoir différentes explications :

- Elle peut être due à un mauvais mélange lors de la préparation des îlots avec l'alginate. En effet, comme cela a été décrit dans le Matériel et Méthodes, le mélange des cellules est manuel, et l'homogénéité de la solution obtenue n'est donc pas précisément contrôlée. Un exemple de ce cas est présenté en Figure 137 A) avec des capsules d'alginate SLG100. L'étape de mélange peut également être rendue plus difficile par une viscosité élevée de l'alginate. Un exemple de ce cas est présenté en Figure 137 B) avec des capsules d'alginate-Kétoprofène.
- A l'inverse, une viscosité trop faible peut entraîner une sédimentation des îlots au fond de l'ependorf lors de l'encapsulation. Il est alors nécessaire de re-suspendre les îlots manuellement pendant l'expérience, et ces derniers arrivent alors par paquets. Un exemple de ce cas est présenté en Figure 137 C) avec des capsules d'alginate Système C à chaînes courtes (dont la viscosité était plus faible).

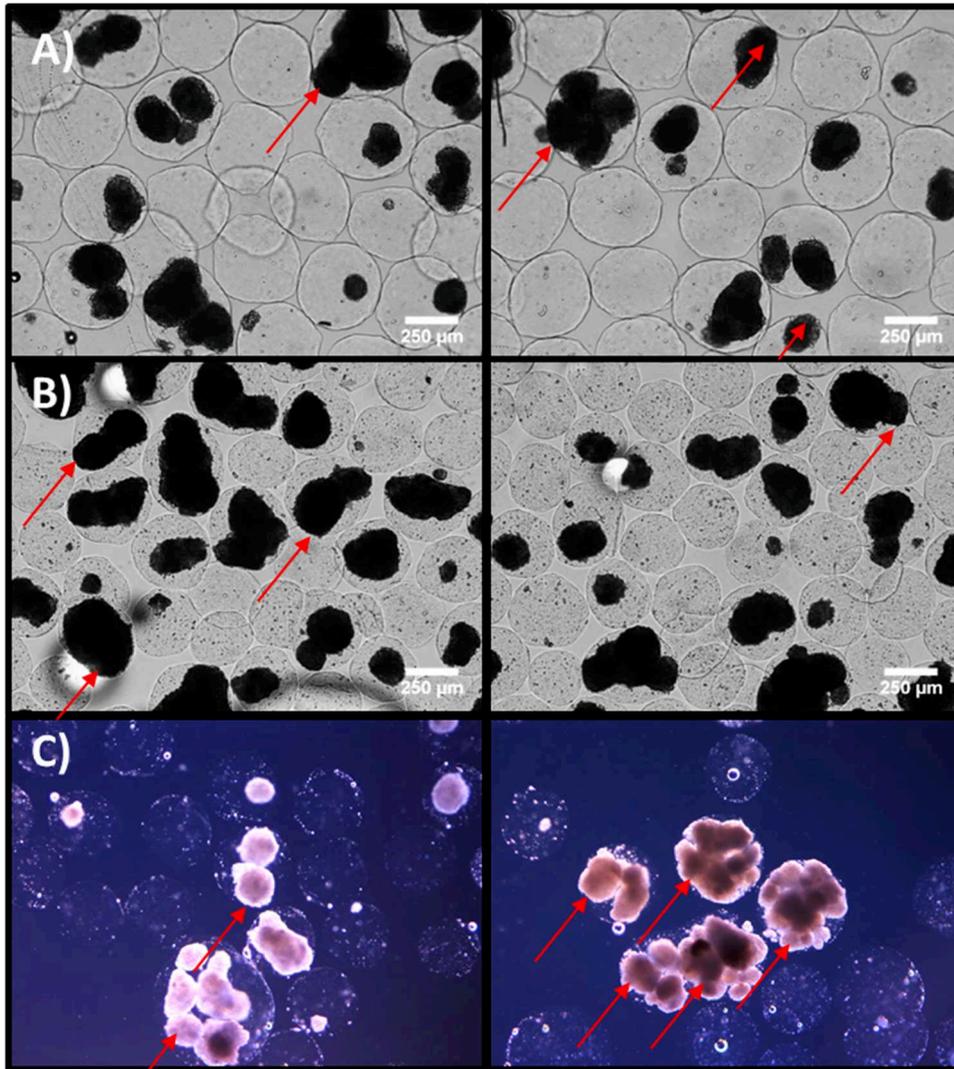


Figure 137 : Exemples de capsules pour lesquelles la répartition des îlots n'est pas optimale : A) Capsules d'alginate SLG100-2,5%, la mauvaise répartition des îlots est due à un mauvais mélange ; B) Capsules d'alginate-Kétoprofène-4%, la mauvaise répartition des îlots est due à un mauvais mélange, causé par une viscosité élevée ; C) Capsules d'alginate Système C-4% faible greffage, la mauvaise répartition des îlots est due à une viscosité faible. Les flèches rouges représentent les protrusions.

Le Tableau 36 rassemble les pourcentages de protrusions obtenus dans les différents cas présentés en Figure 137, ainsi que les pourcentages de remplissage des capsules. Dans ces différents exemples, environ la moitié des capsules contenant des îlots présentent des protrusions.

Alginate	SLG100-2,5 % Figure 137	Alginate- Kétoprofène-4 % Figure 137	Système C-4 % Figure 137
Remplissage (%)	51	48	50
Protrusions (%)	25	20	30

Tableau 36 : Coefficients de variation obtenus pour les capsules présentées en Figure 137

Ces différents résultats montrent que le point de fonctionnement à trouver est compliqué, en particulier en raison de la viscosité de l'alginate. D'après les expériences effectuées, il semble cependant préférable d'avoir une viscosité d'alginate élevée, même de plusieurs Pa.s, plutôt que

trop faible (inférieure à 500 mPa.s). Il faut alors porter une attention particulière à l'étape de mélange des îlots dans l'alginate.

3.3.3 Gouttes satellites

Un autre paramètre ayant également un impact sur la présence de protrusions dans les capsules est la présence de gouttes satellites. En effet, lorsqu'une goutte satellite est formée, si un îlot se trouve dans l'alginate au niveau du MFFD, il est alors encapsulé par une quantité beaucoup trop faible d'alginate, formant ainsi une capsule beaucoup plus petite, entraînant de plus grands risques de protrusions. Ce cas de figure est représenté en Figure 138 avec des capsules d'alginate-Kétoprofène. Les flèches rouges représentent la présence de protrusion dans des capsules formées par des gouttes satellites.

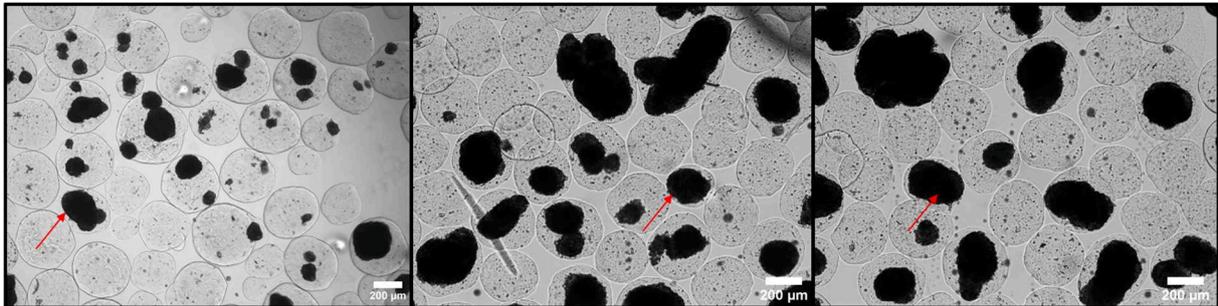


Figure 138 : Exemple de présence de protrusion dans des capsules d'alginate-kétoprofène formées par des gouttes satellites, représentées par les flèches rouges.

Ce cas de figure est cependant assez rare, car les gouttes satellites sont dans la majorité des cas trop petites pour entraîner un îlot lors de leur formation.

3.4 Mesures de viabilité

De la même manière que pour les expériences avec cellules, la viabilité des îlots a été mesurée au fur et à mesure des expériences d'encapsulation (voir Matériel et Méthodes).

La Figure 139 présente un exemple de résultats obtenus sur une encapsulation d'îlots de porc. Sur une dizaine d'encapsulations différentes réalisées, des résultats similaires ont été obtenus, permettant ainsi de déterminer que pour l'alginate de référence, la baisse de viabilité entre les îlots avant encapsulation et les îlots encapsulés est de 10 % maximum. En considérant que cet alginate est parfaitement purifié et biotoléré, on peut en déduire que cette perte est imputable à la durée de l'encapsulation (pendant laquelle les îlots n'ont accès à ni oxygène ni nutriments). Les résultats des caractérisations du taux de cisaillement présent dans le système, présentés dans le chapitre Encapsulation ont permis de montrer que ce taux de cisaillement n'est pas néfaste pour les cellules. Cette baisse de viabilité est donc certainement due à la durée de l'encapsulation (3 heures en moyenne). Ce paramètre est donc à prendre en considération dans les analyses des résultats de viabilité.

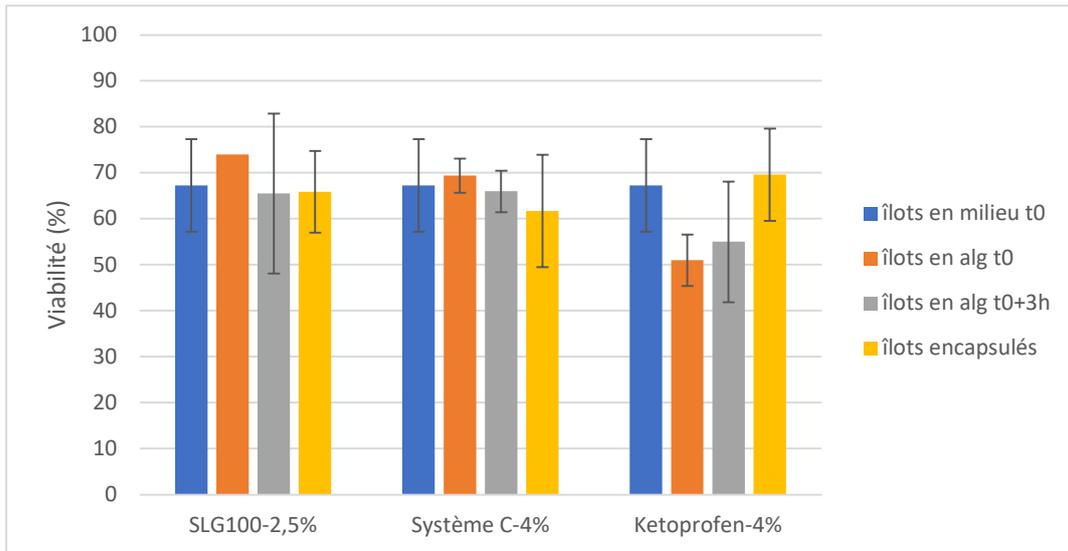


Figure 139 : Exemple de résultats de mesures de viabilité obtenus lors d'encapsulation d'îlots de porc

Les premières encapsulations d'îlots ont été faites avec l'alginate Système A. Ce sera donc le premier étudié ici. Les résultats obtenus sur toutes les encapsulations effectuées avec cet alginate au cours de cette thèse sont rassemblés dans la Figure 140, où l'axe des abscisses correspond aux différentes encapsulations, classées par ordre chronologique. Les encapsulations sont faites en même temps en alginate de référence et Système A, et sur le même système microfluidique (MFFD550). Afin de simplifier la présentation des résultats, les viabilités présentées par la suite sont uniquement celles des îlots en milieu avant encapsulation et des îlots encapsulés (les deux étapes intermédiaires de mesures de viabilité ne sont pas présentées).

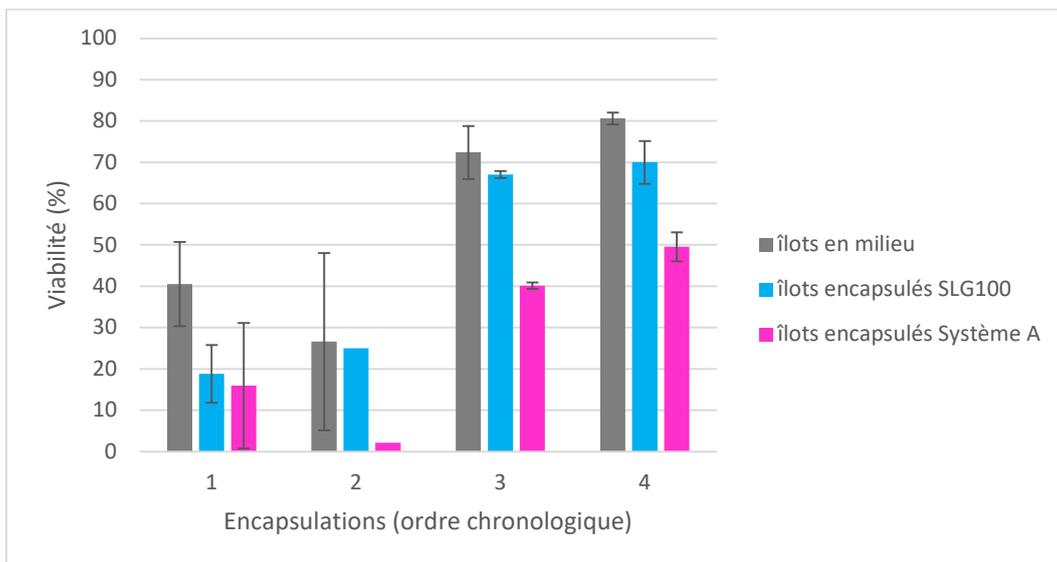


Figure 140 : Résultats de viabilité obtenus pour les encapsulations d'îlots avec l'alginate Système A-4% et avec l'alginate de référence SLG100-2,5%. Les couleurs du plus clair au plus foncé correspondent à l'ordre chronologique des encapsulations

Les viabilités de départ (avant encapsulation) pour les 2 premières expériences sont beaucoup plus faibles que pour les encapsulations suivantes. Les îlots sont tout d'abord extraits par une

équipe de l'Hôpital de Genève, partenaire de la thèse, puis sont envoyés au CEA de Grenoble pour effectuer l'encapsulation. Ces deux premiers lots d'îlots présentaient une mauvaise viabilité dès la réception au CEA de Grenoble, qui semblait être due au transport ou à la maturation des îlots. Suite à ces observations, l'équipe de l'Hôpital de Genève a optimisé l'isolation des îlots, le nombre de jours de maturation avant envoi (fixé à 7 jours), ainsi que le protocole de transport de ces derniers : le milieu des îlots a été oxygéné avant d'effectuer l'envoi. Ces modifications ont permis d'obtenir des résultats de viabilité à réception des îlots bien meilleurs sur les lots suivants.

Par ailleurs, les mesures de viabilité pour les 2 premières encapsulations ont été effectuées en utilisant un marquage FDA-PI (comme pour les expériences avec cellules), mais le FDA donnait un résultat de fluorescence diffus (auto-fluorescence de la solution, voir Figure 141 A), ne permettant pas de déterminer les viabilités de manière très précise. Il a donc été décidé d'utiliser un autre marquage permettant d'obtenir une fluorescence plus précise : le Syto13 (voir Figure 141 B). Un test comparatif a été effectué entre ces deux marqueurs, dont les résultats sont présentés en Figure 142. Ce test a permis de confirmer que le Syto13 permet d'obtenir des mesures plus précises.

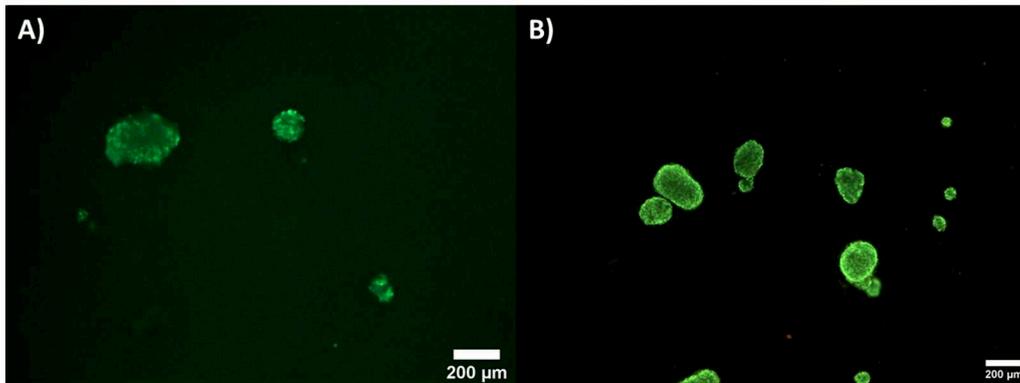


Figure 141 : Exemple de marquage de cellules vivantes : A) avec du FDA ; B) avec du Syto13 ; la solution auto-fluoresce en FDA, et les îlots sont marqués de manière plus diffuse qu'avec le Syto13

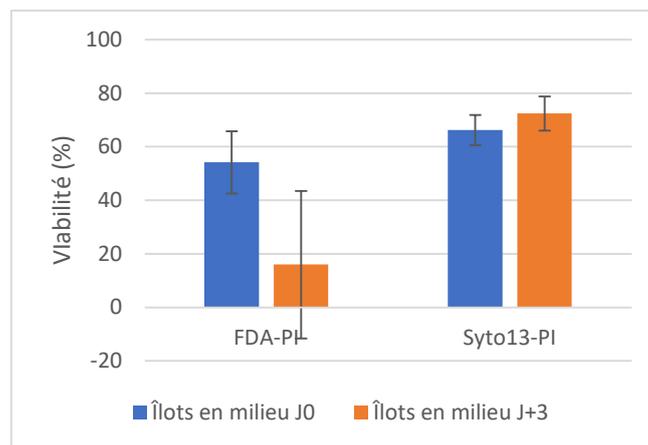


Figure 142 : Mesures de viabilité sur des îlots de porc, à l'aide de deux marquages différents : FDA-PI et Syto13-PI

Les mesures de viabilités pour les encapsulations suivantes ont donc été effectuées avec le marqueur Syto13 au lieu du FDA. C'est la raison pour laquelle les deux premières encapsulations présentent des barres d'erreur plus importantes.

Les résultats montrent que malgré les optimisations effectuées par l'EPFL sur la purification de l'alginate Système A (comme expliqué dans la partie 2.2 Optimisation des résultats), la viabilité des îlots encapsulés dans cet alginate est plus affectée que celle des îlots encapsulés en alginate

de référence. Au niveau de l'encapsulation, la durée de l'expérience a été réduite, en augmentant la fréquence de production, et en effectuant les préparations des alginates et cellules, et les transferts en milieu après encapsulation le plus rapidement possible. Ces optimisations ont permis de limiter légèrement la baisse de viabilité sur la dernière encapsulation, mais il semble nécessaire d'améliorer encore ces résultats.

Les résultats obtenus avec le Système C et l'alginate-kétoprofène sont présentés respectivement sur les Figure 143 et Figure 144. On peut voir que ces alginates semblent être moins néfastes pour les cellules. En effet, les viabilités des îlots encapsulés avec ces deux types d'alginate sont proches des viabilités des îlots encapsulés en alginate de référence SLG100. Par ailleurs, les résultats montrent que l'optimisation de l'isolation et de l'envoi des îlots a bien fonctionné puisque sur toutes ces encapsulations, les viabilités des îlots avant encapsulation (à réception) sont d'au moins 70 % environ.

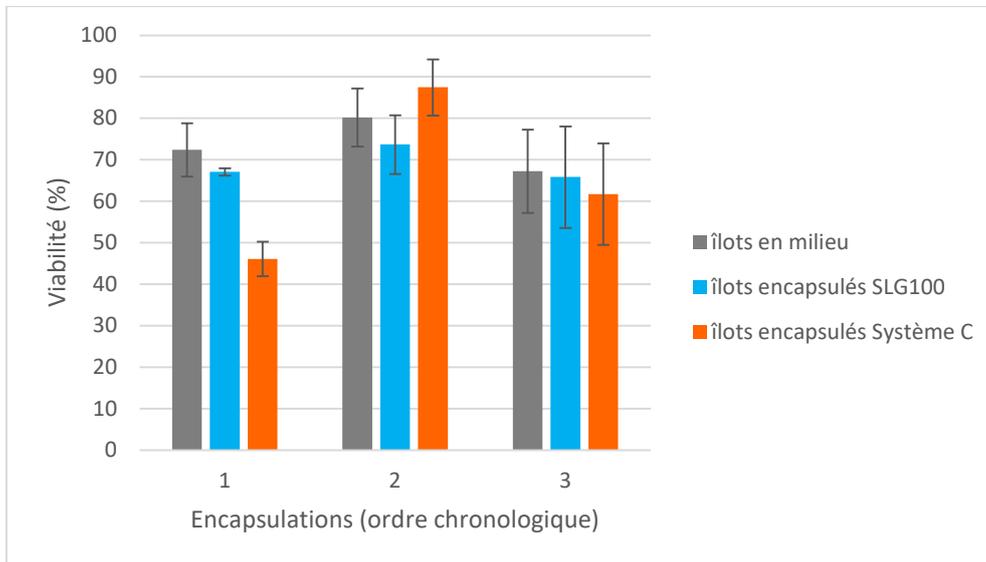


Figure 143 : Résultats de viabilité obtenus pour les encapsulations d'îlots avec l'alginate Système C-4% et avec l'alginate de référence SLG100-2,5%. Les couleurs du plus clair au plus foncé correspondent à l'ordre chronologique des encapsulations

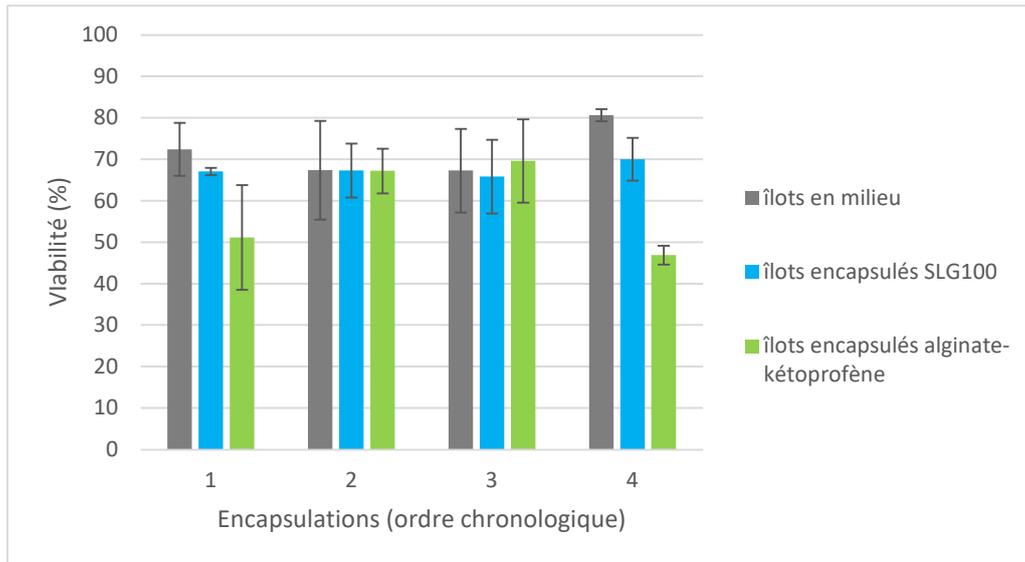


Figure 144 : Résultats de viabilité obtenus pour les encapsulations d'îlots avec l'alginate-kétoprofène-4% et avec l'alginate de référence SLG100-2,5%. Les couleurs du plus clair au plus foncé correspondent à l'ordre chronologique des encapsulations

Afin de comparer les résultats obtenus entre les différents alginates, et mieux se rendre compte des différences de viabilité, tous les résultats sont rassemblés dans un même graphique, en Figure 145. On peut ainsi voir que les viabilités obtenues en Système A sont effectivement inférieures à celles obtenues en Système C et Kétoprofène. Suite à ces résultats, un test in vivo a pu être effectué. Pour ce test, le choix d'un polymère était nécessaire. Les résultats de viabilité du Système C et de l'alginate kétoprofène étant proches, et les résultats en termes de sphéricité et monodispersité étant meilleurs pour le Système C (voir partie 3.2), le choix s'est porté sur ce dernier pour les tests in vivo.

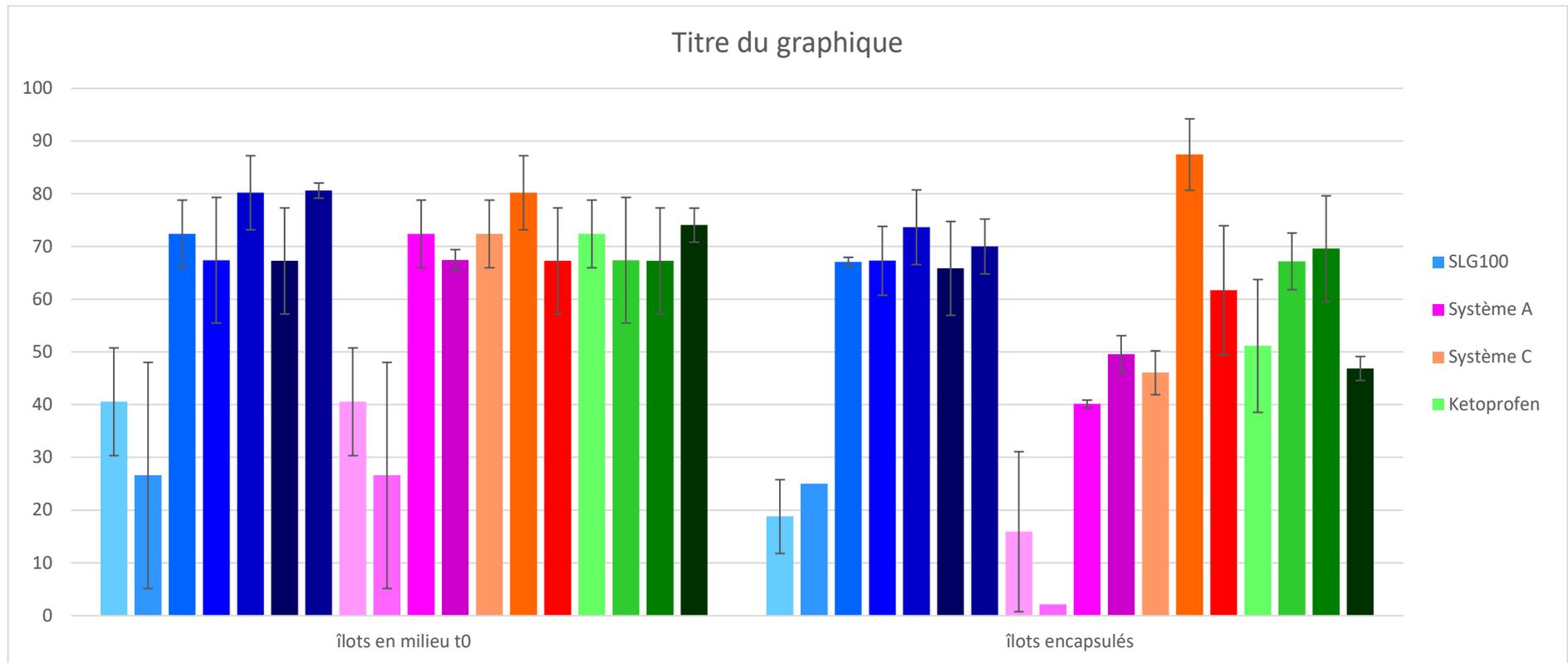


Figure 145 : Résultats de viabilités obtenus sur les îlots encapsulés dans les différents alginates. Les couleurs du plus clair au plus foncé correspondent à l'ordre chronologique des encapsulations.

4. Test in vivo

Un test in vivo a été effectué dans le cadre de cette thèse, consistant en un greffage d'îlots encapsulés dans des souris, afin de déterminer la biotolérabilité des alginates in vivo, et de vérifier l'efficacité des capsules en tant que barrière protectrice, et leur résistance une fois greffées. Comme expliqué précédemment, l'alginate ayant été choisi pour ce test in vivo est le Système C, car il présente les meilleurs résultats en termes de viabilité des îlots encapsulés, sphéricité et monodispersité des capsules.

Pour cela, le protocole décrit dans le Matériel et Méthodes a été suivi : des capsules vides d'alginate Système C ainsi que d'alginate de référence ont tout d'abord été produites. Des îlots de porcs ont ensuite été encapsulés en parallèle en alginate de référence et en Système C. Des îlots ont également été encapsulés en parallèle en alginate de référence avec le système d'encapsulation utilisé par l'EPFL : l'encapsulateur par segmentation de jet par vibration Buchi. Chaque type de capsule a ensuite été greffé dans une souris différente :

- Cage 1 Souris 1 : îlots encapsulés dans l'alginate de référence UP LVM, en système de dripping Buchi
- Cage 1 Souris 2 : îlots encapsulés dans l'alginate de référence SLG100, en système microfluidique simplifié MFFD550
- Cage 1 Souris 3 : îlots encapsulés dans l'alginate Système C, en système microfluidique simplifié MFFD550
- Cage 2 Souris 1 : capsules vides d'alginate de référence SLG100, produites en système microfluidique simplifié MFFD550
- Cage 2 Souris 2 : capsules vides d'alginate Système C, produites en système microfluidique simplifié MFFD550

Les souris sont ensuite sacrifiées deux semaines plus tard, afin de récupérer les capsules greffées, de les observer pour déterminer s'il y a présence de fibrose ou non, et d'effectuer des mesures de viabilité. Cette expérience a pour but d'étudier différents aspects :

- Tout d'abord comparer l'encapsulation en système microfluidique par rapport à l'encapsulation en système de dripping Buchi.
- Vérifier la biotolérabilité des différents alginates testés, grâce au greffage des capsules vides : si l'alginate utilisé est biotoléré, il ne doit pas y avoir de fibrose.
- Comparer les résultats entre l'alginate de référence et l'alginate étudié (Système C), au niveau de la viabilité des îlots, et de la présence ou non de fibrose.
- Vérifier l'efficacité des capsules en tant que barrière protectrice pour les îlots : s'il y a présence de fibrose autour des capsules contenant les îlots, alors qu'il n'y en a pas autour des capsules vides, cela signifie qu'elle est déclenchée par la présence des îlots, et que les capsules ne les protègent donc pas suffisamment (qu'elles sont certainement trop perméables).

4.1 Formation des capsules vides

Les capsules vides formées en système microfluidique simplifié MFFD550 avec l'alginate de référence SLG100 et l'alginate Système C sont présentées en Figure 146.

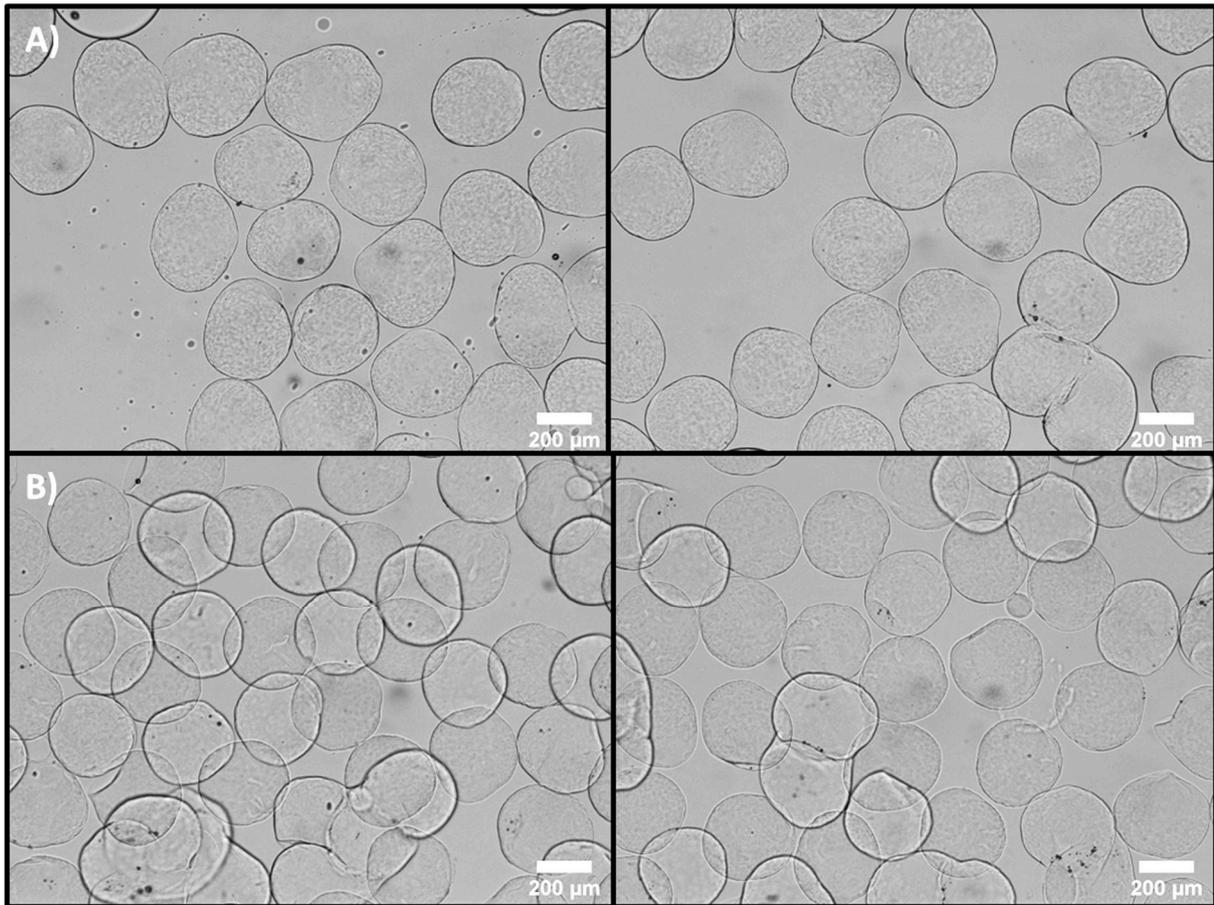


Figure 146 : Capsules vides formées en système microfluidique MFFD550 (en conditions stériles) pour l'implantation in vivo : A) capsules d'alginate de référence SLG100-2,5 % ; B) capsules d'alginate Système C-4 %

Ces capsules ont été caractérisées en termes de taille, forme et monodispersité, de la même manière que précédemment. Les résultats sont présentés dans le Tableau 37. Comme précédemment, on peut voir que les capsules produites en Système C sont plus monodisperses et sphériques que celles produites en alginate de référence.

Alginate	Moyenne diamètre (μm)	Coefficient de variation (%)	Aspect Ratio
SLG100-2,5%	338,59	6,3	0,89
Système C-4%	318,69	3,85	0,94

Tableau 37 : Caractérisation en termes de taille, forme et monodispersité des capsules vides d'alginate de référence SLG100 et d'alginate Système C, produites pour l'implantation in vivo

4.2 Encapsulation des îlots

Après avoir produit des capsules vides, des îlots de porcs néo-nataux ont été encapsulés dans les mêmes alginates, ainsi que dans l'alginate Système C-chaînes courtes-4%. Pour cette encapsulation, la totalité du banc expérimental développé au CEA a été déplacée à l'hôpital de

Genève, afin de ne pas risquer une perte de viabilité en envoyant tout d’abord les îlots depuis Genève vers le CEA, puis en envoyant les îlots encapsulés depuis le CEA de Grenoble vers l’hôpital de Genève (pour les implantations).

Afin d’optimiser au maximum les résultats de viabilité, il a été décidé de paralléliser les encapsulations : au lieu d’encapsuler la totalité d’un polymère en une fois, le volume est réparti dans 2 eppendorfs contenant la moitié du volume habituel.

Une première encapsulation est ainsi faite avec deux circuits utilisés pour encapsuler chacun la moitié du volume de l’alginate de référence, puis une deuxième encapsulation est faite avec deux circuits utilisés pour encapsuler chacun la moitié du volume de l’alginate Système C. Cette parallélisation a permis de réduire de moitié la durée de l’encapsulation (1h30 au lieu de 3h environ de temps de contact entre le moment où les îlots sont mélangés aux alginates, et le moment où les îlots encapsulés sont transférés en milieu de culture), pour le même nombre de capsules produites (environ 5 000), et ainsi d’obtenir de meilleurs résultats de viabilité (Figure 147).

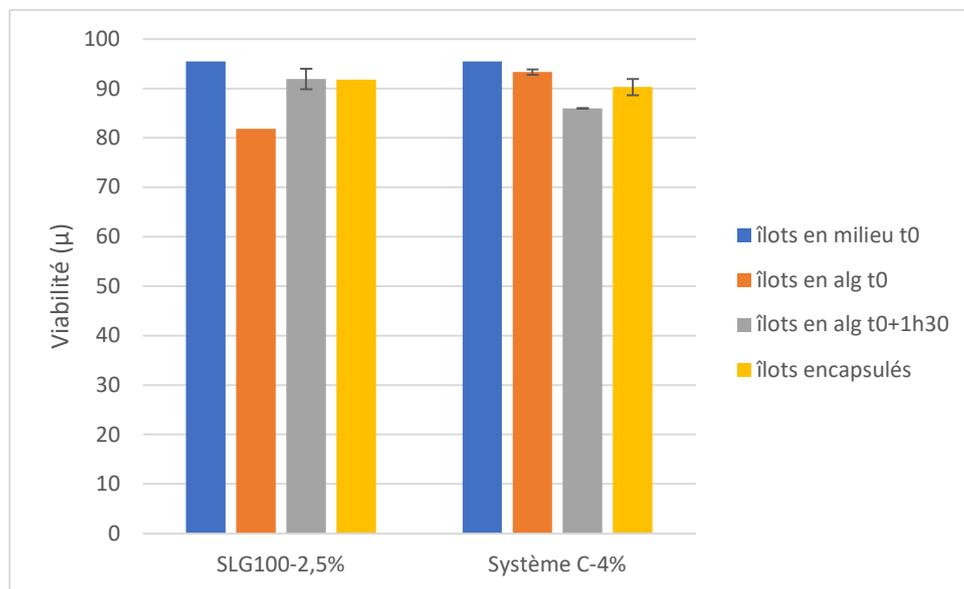


Figure 147 : Résultats de viabilité sur les îlots encapsulés en alginate de référence SLG100-2,5% et en alginate Système C chaînes courtes et chaînes longues - 4%

La Figure 147 montre que la parallélisation de l’encapsulation a bien permis d’améliorer les résultats de viabilité. Cependant, cette option présente l’inconvénient d’augmenter le volume mort d’alginate (volume perdu dans les connectiques en fin d’encapsulation), et donc d’augmenter le nombre d’îlots perdus (puisque pour un même volume d’alginate encapsulé, le double de connectique est utilisé).

Les capsules obtenues sont présentées en Figure 148, et les valeurs obtenues après leur caractérisation sont rassemblées dans le Tableau 38

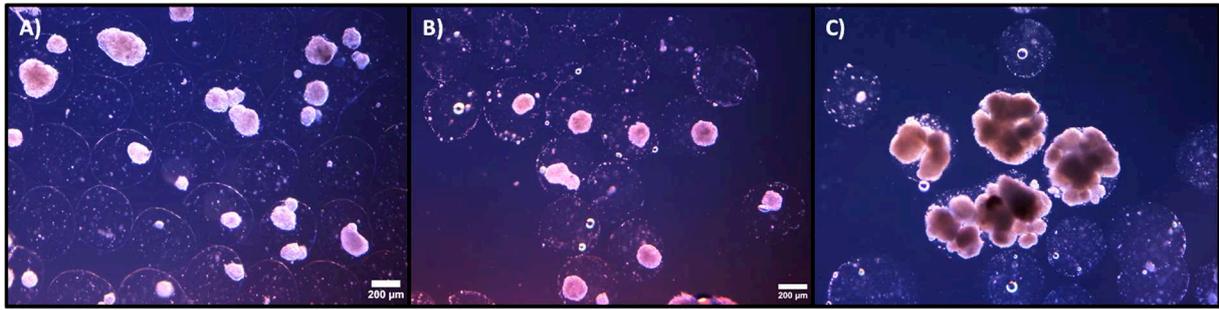


Figure 148 : Capsules obtenues lors de l'encapsulation d'îlots de Langerhans pour une implantation in vivo A) Capsules d'alginate de référence SLG100 ; B) Capsules d'alginate Système C-4% chaînes longues ; C) Capsules d'alginate Système C-4% chaînes courtes

Alginate	Moyenne diamètre (µm)	Coefficient de variation (%)	Aspect Ratio	% de remplissage	Viabilité
SLG100-2,5%	444,74	5,74	0,86	10,48	91,75
Système C-4%	428,49	11,21	0,95	65	90,30

Tableau 38 : Caractérisation des capsules obtenues lors de l'encapsulation d'îlots de Langerhans pour une implantation in vivo

Le pourcentage de remplissage des capsules d'alginate de référence obtenu est très faible. Cela peut être dû à un mauvais comptage des îlots (la macro habituellement utilisée n'a pas été utilisée ici), donnant lieu à une concentration trop faible d'utilisation, ou à un mauvais mélange ou une sédimentation des îlots. Les capsules ont malgré tout été utilisées pour l'implantation in vivo.

4.3 Greffe des îlots encapsulés et récupération des capsules

Suite aux encapsulations des îlots, les capsules vides ainsi que les capsules contenant les îlots ont été greffées dans les différentes souris (selon le protocole présenté dans le Matériel et Méthodes). Les souris ont ensuite été nourries et entretenues normalement, en cage, pendant deux semaines. A l'issue des deux semaines, elles ont été sacrifiées pour récupérer les capsules à l'intérieur, et les observer. Un exemple de récupération de capsule est présenté en Figure 149, correspondant à la Souris 2 de la cage 1 (greffée avec les îlots encapsulés en alginate de référence SLG100 en système microfluidique MFFD550).

Suite au sacrifice des différentes souris, toutes les capsules n'ont malheureusement pas pu être récupérées. En effet, chez certaines souris, les capsules greffées sont restées introuvables, certainement parce que ces dernières se sont décomposées lors de l'injection, ou in vivo (par manque de résistance mécanique). De plus, une des souris est malheureusement morte avant d'avoir pu récupérer les capsules. Ce décès peut être causé par la greffe des capsules, mais également par une infection de la plaie laissée par la greffe. Le Tableau 39 résume les conditions testées, et indique pour chacune si les capsules ont pu être récupérées ou non.

Souris	Condition	Récupération des capsules
Cage 1 souris 1	Alginate de référence UP LVM + îlots, encapsulation Buchi	Oui
Cage 1 souris 2	Alginate de référence SLG100 + îlots, encapsulation MFFD500	Oui
Cage 1 souris 3	Système C + îlots, encapsulation MFFD550	Pas de capsules trouvées
Cage 2 souris 1	Capsules vides alginate de référence SLG100, MFFD550	Oui
Cage 2 souris 2	Capsules vides Système C, MFFD550	Souris morte avant la récupération

Tableau 39 : Résumé des conditions testées in vivo, et possibilité de récupérer les capsules ou non pour chacune

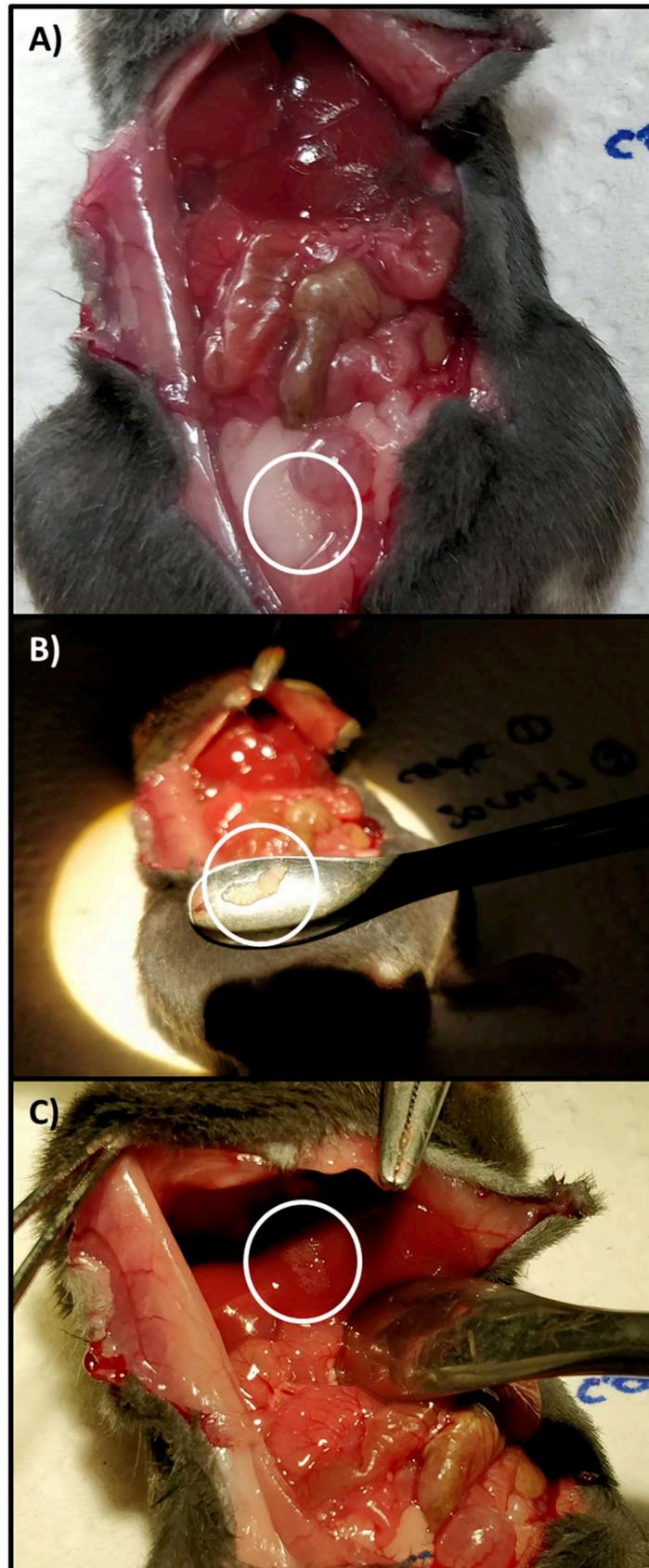


Figure 149 : Exemple de récupération de capsules dans une souris, les cercles blancs entourent les capsules : A) capsules situées dans la cavité péritonéale de la souris ; B) capsules récupérées de la cavité péritonéale, présentées sur la spatule ; C) capsules situées sous le rein de la souris

Il n'a donc pas été possible d'étudier l'alginate Système C in vivo, puisqu'aucune capsule n'a pu être récupérée dans cette condition. Cependant, l'observation des capsules d'alginate de référence vide, et contenant des îlots en encapsulation Buchi® et microfluidique peut permettre :

- De vérifier la biotolérabilité de ces alginates
- De vérifier leur efficacité en tant que barrière protectrice pour les îlots
- De comparer les résultats pour les deux systèmes d'encapsulation

Les capsules vides d'alginate de référence SLG100 récupérées sont présentées en Figure 150 A), celles d'alginate de référence SLG100 contenant des îlots, encapsulés en microfluidique, en Figure 150 B), et celles d'alginate de référence UP LVM contenant des îlots, encapsulés en dripping, en Figure 150 C).

Les capsules d'alginate contenant des îlots présentent toute de la fibrose autour. Il semble donc clair que leur immuno-protection n'est pas suffisamment efficace. La comparaison entre les deux systèmes d'encapsulation (microfluidique et dripping avec segmentation de jet par vibration) semble compromise, puisque les capsules produites dans les deux systèmes présentent de la fibrose. Les images en Figure 150 A) semblent montrer que les capsules vides présentent beaucoup moins de fibroses, mais certaines capsules possèdent néanmoins du tissu fibreux autour (comme sur l'image de gauche).

Cette différence entre les capsules vides et celles contenant les îlots confirme que la fibrose est principalement due à la présence d'îlots, et que la perméabilité de l'alginate est donc peut-être trop importante. Cela peut s'expliquer par le fait qu'on est dans un cadre de xénogreffe, et les composants sécrétés par les îlots encapsulés sont donc vus comme des antigènes étrangers, conduisant à la production d'immunoglobuline. Les îlots entraînent donc une réaction plus importante du système immunitaire, et il faudrait une perméabilité d'autant plus faible pour les protéger.

Concernant la présence de fibrose sur certaines capsules vides, cela montre que la biotolérabilité de l'alginate n'est pas non plus optimale. Le test mériterait cependant d'être réitéré car il est difficile de conclure sur un unique résultat.

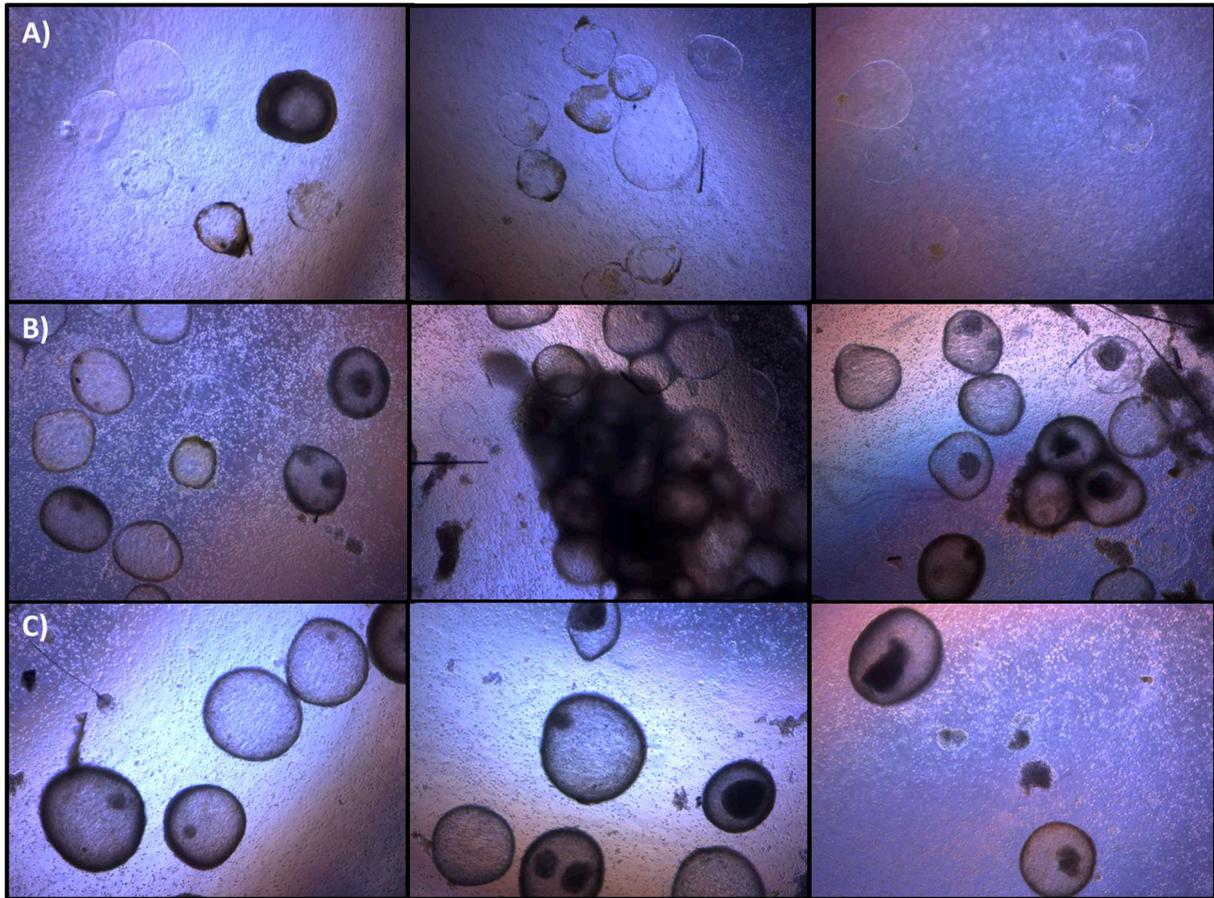


Figure 150 : Capsules récupérées après 2 semaines in vivo : A) Capsules vides d'alginate de référence SLG100-2,5%, produites en système microfluidique MFFD550 ; B) Capsules d'alginate de référence SLG100-2,5% contenant des îlots de porc, produites en système microfluidique MFFD550 ; C) Capsules d'alginate de référence UP LVM contenant des îlots de porc, produites en encapsulateur par segmentation de jet par vibration Buchi

Suite à la récupération des capsules, des mesures de viabilité ont été effectuées, afin de déterminer si les îlots présentent une meilleure viabilité en capsules produites en microfluidique par rapport aux capsules produites en système de dripping. Cependant, les capsules étant trop entourées de tissu fibreux, le marquage utilisé pour la viabilité (Syto13-IP) marque uniquement les cellules du tissu fibreux, et ne passent pas dans les capsules pour marquer les îlots. On obtient des images du type de celles présentées en Figure 151. Ces images n'ont donc pas été analysées sur ImageJ.

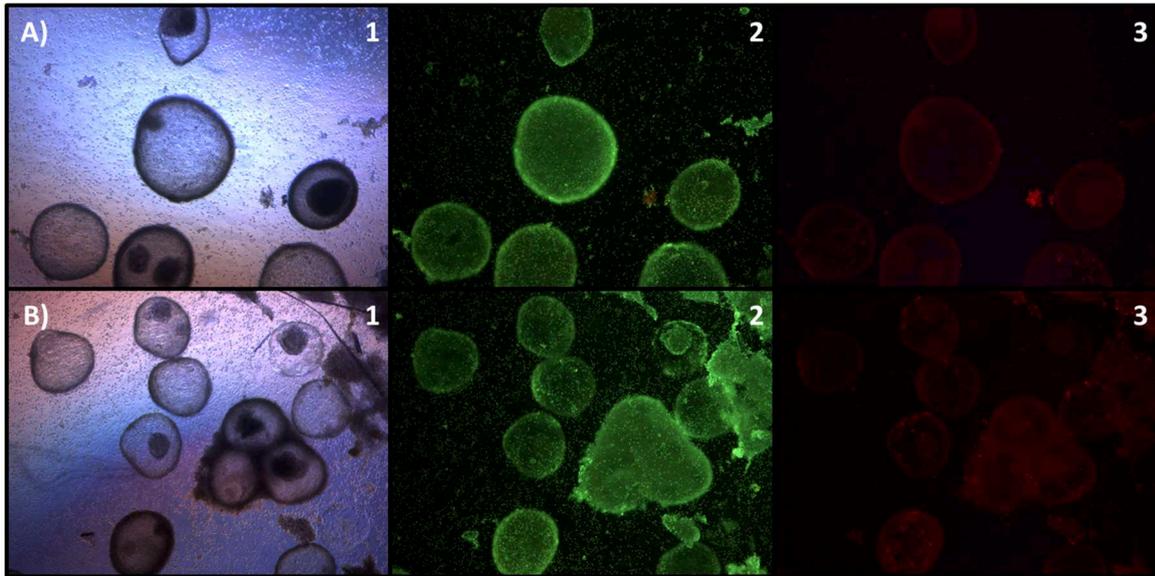


Figure 151 : Mesures de viabilités sur les capsules contenant des îlots de porc récupérées après implantation in vivo :
 A) Capsules d'alginate de référence SLG100-2,5% contenant des îlots de porc, produites en système microfluidique MFFD550 ; B) Capsules d'alginate de référence contenant des îlots de porc, produites en encapsulateur par segmentation de jet par vibration Buchi® ; 1 : images en lumière blanche ; 2 : images en fluorescence, cellules vivantes marquées au Syto13 fluorescent en vert ; 3 : images en fluorescence, cellules mortes marquées à l'IP fluorescent en rouge

En conclusion, cette expérience in vivo a permis de montrer que le système microfluidique d'encapsulation développé au CEA peut être déplacé afin d'installer le banc expérimental à l'endroit où les capsules sont implantées, et éviter ainsi leur transport. Les capsules d'alginate Système C n'ont malheureusement pas pu être récupérées après implantation, mais cela a été possible avec les capsules d'alginate de référence SLG100. Cependant, ces capsules présentaient de la fibrose. L'expérience mérite donc d'être réitérée par la suite, afin d'optimiser les conditions et obtenir de meilleurs résultats.

5. Discussion

Ce chapitre s'est focalisé sur l'encapsulation de cellules et d'îlots, ainsi que sur les étapes ayant lieu après la production des capsules : la caractérisation de ces capsules (en termes de taille, monodispersité, sphéricité, et de perméabilité), et la mesure de viabilité sur les îlots encapsulés.

La production de capsules et l'encapsulation d'îlots suivent différentes étapes, qui dépendent de nombreux paramètres interconnectés :

- La production des gouttes, leur gélification et le passage de l'interface dépendent de la viscosité, l'élasticité, et la tension interfaciale des fluides, ainsi que de l'angle de contact et du cisaillement présents dans le système microfluidiques. Les résultats présentés dans le Chapitre V sur l'étude de ces paramètres a permis d'atteindre l'objectif de production de capsules avec les différents alginates en système microfluidique.
- Lors de l'encapsulation d'îlots, des paramètres supplémentaires entrent en jeu, ayant un impact sur la viabilité des îlots et la biotolérabilité de la greffe in vivo : la pureté des

alginates, la durée de l'encapsulation, la concentration en îlots, leur répartition dans l'alginate, et la présence de gouttes satellites.

Suite aux différentes études présentées dans ce manuscrit, il a donc été possible de produire des capsules sphériques et monodisperses avec tous les alginates utilisés, en microfluidique, ainsi que d'encapsuler des cellules et des îlots.

L'étape d'encapsulation des cellules INS-1 a permis d'identifier une limitation du système : les polymères utilisés pouvant avoir une légère toxicité résiduelle, et l'expérience d'encapsulation en microfluidique étant plus longue que l'encapsulation en dripping, le temps de contact entre les cellules et les alginates est plus long et l'impact de ces derniers sur la viabilité est donc plus important. C'est la raison pour laquelle les viabilités obtenues sur les premières expériences sont moins bonnes pour les alginates PEGylés, et également moins bonnes que les résultats obtenus en système Buchi^{®306,307}.

Les optimisations développées, autant du côté de l'EPFL (au niveau de la purification de l'alginate), de l'Hôpital de Genève (au niveau de l'isolation et du protocole d'envoi des îlots), que du côté du CEA (au niveau de la durée de l'encapsulation), ont malgré tout permis d'améliorer grandement les résultats : les premières encapsulations présentent une baisse de viabilité d'environ 30 %, contre moins de 10 % pour la dernière encapsulation effectuée en parallélisation.

Les résultats de l'unique expérience in vivo semblent cependant montrer qu'une optimisation est encore nécessaire afin de limiter la formation de fibrose autour des capsules.

Conclusion Générale

Le travail effectué dans cette thèse s'intègre dans le cadre d'un projet collaboratif (Projet Futurcaps, ANR-15-CE18-0022-02) visant à combiner de nouveaux biomatériaux synthétisés par l'Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne^{6,305-308,373}, à un système microfluidique d'encapsulation de cellules, afin d'améliorer la survie des cellules encapsulées et produire des capsules de façon reproductibles. Le système ainsi obtenu est utilisé pour encapsuler des îlots de Langerhans dans le cadre de thérapie cellulaire pour le diabète de type 1.

Afin d'évaluer le système utilisé, notre démarche a consisté dans un premier temps à caractériser les propriétés physico-chimiques des différents alginates, ainsi que le système microfluidique.

Après un Etat de l'art et une description des montages expérimentaux et outils d'analyse mis en place, le Chapitre IV s'est donc concentré sur la caractérisation des propriétés rhéologiques des différents alginates, ainsi que leur structure chimique et leur impact sur la viabilité des cellules. Les résultats obtenus ont permis de montrer que les différents alginates étudiés ont des longueurs et des structures de chaînes très variables, donnant lieu à des comportements rhéologiques très différents. L'alginate-kétoprofène et les alginates de référence se comportent comme des fluides non Newtonien rhéofluidifiants sans seuil, alors que les alginates Système A et Système C se comportent comme des fluides plastiques rhéofluidifiants à seuil. Les modèles rhéologiques théoriques permettant de prédire la viscosité en fonction du cisaillement ont été déterminés pour chaque alginate, et les propriétés viscoélastiques ont été comparées.

La biocompatibilité de ces alginates a été évaluée et a permis de mettre en évidence la nécessité d'optimiser certaines étapes de synthèse afin de maximiser la pureté. Un protocole développé par l'EPFL (consistant à maintenir le milieu en pH neutre lors des étapes de synthèse, permettant ainsi de réduire la dégradation des chaînes) a ainsi été déterminé comme étant le plus adapté pour l'utilisation des alginates avec des cellules.

Le Chapitre V s'est ensuite focalisé sur la caractérisation du système microfluidique (angle de contact, tension interfaciale, taux de cisaillement présents dans le système, et cinétique de gélification des alginates). Les informations présentées dans ces deux chapitres ont permis d'interpréter et optimiser les résultats en termes de formation et gélification de gouttes. Suite aux travaux effectués dans les Chapitres IV et V, il a ainsi été possible de produire des capsules de taille et forme contrôlée en microfluidique, avec les différents alginates étudiés, ayant des propriétés physico-chimiques très variées.

Le Chapitre VI présente tout d'abord les résultats de caractérisation des capsules vides, puis ceux des mesures de viabilité in vitro de cellules et îlots encapsulés. Les résultats obtenus ont montré que malgré les améliorations apportées aux protocoles de synthèse, les alginates modifiés chimiquement ont toujours un impact sur la viabilité des cellules. Après optimisation des étapes de purification des alginates au niveau de l'EPFL, des étapes d'isolation et de préparation des îlots au niveau de l'hôpital de Genève, et des étapes d'encapsulation au niveau du CEA, les viabilités ont cependant été considérablement augmentées : la mortalité cellulaire était de 30 % pour les premières expériences, et est passée à 10 % pour les expériences en conditions optimisées. Une première implantation in vivo a également pu être effectuée, mais les résultats obtenus n'ont pas permis de conclure sur une meilleure fonctionnalité des îlots encapsulés en microfluidique par rapport à un système d'encapsulation classique, ou sur une meilleure résistance des capsules d'alginate modifié chimiquement par rapport à un alginate de référence.

La Figure 152 résume les différentes étapes critiques de l'encapsulation de cellules, ainsi que les paramètres entrant en jeu. Ces différents paramètres dépendent soit de l'EPFL (symbole rond bleu), soit du CEA (symbole triangle rouge), soit de l'Hôpital Universitaire de Genève (symbole carré vert). Certains paramètres dépendent à la fois des propriétés des alginates (contrôlés par

l'EPFL), et de paramètres microfluidiques (contrôlés par le CEA), les deux symboles correspondants sont alors indiqués.

Cette figure illustre la difficulté de maîtriser les nombreux paramètres entrant en jeu dans le bon déroulement d'une encapsulation d'îlots, et met en exergue l'importance du travail collaboratif et pluridisciplinaire nécessaire au développement d'une thérapie cellulaire pour le diabète de type 1.

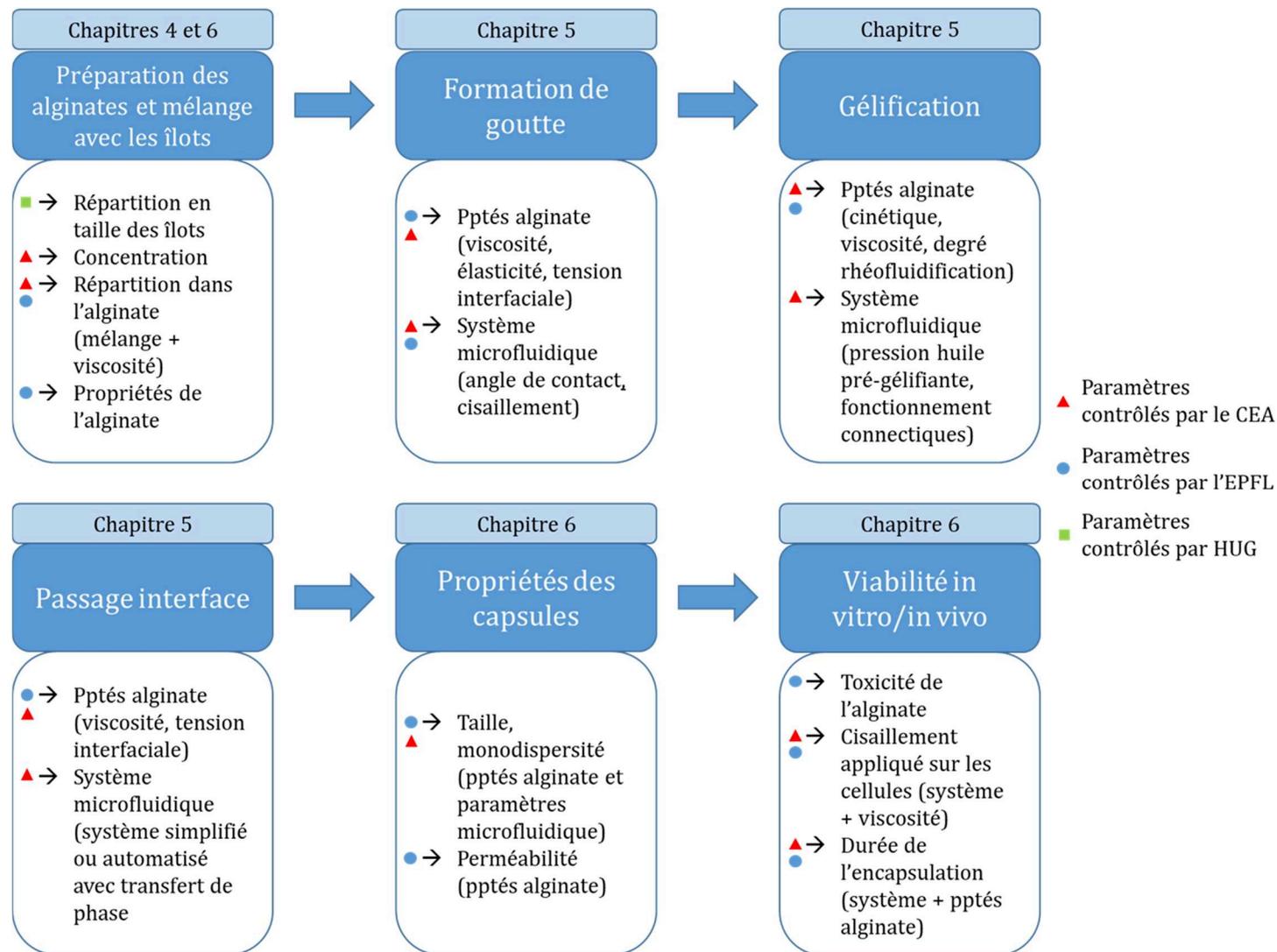


Figure 152 : Schéma illustrant les différents paramètres entrant en jeu dans les étapes d'encapsulation d'îlots. Les paramètres inscrits en vert dépendent de l'Hôpital Universitaire de Genève, ceux inscrits en rouge dépendent de l'Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, et ceux soulignés dépendent du CEA. Certains paramètres peuvent dépendre à la fois de l'EPFL et du CEA.

Tout au long des expériences effectuées au cours de cette thèse, certaines difficultés se sont présentées. La principale limitation a été la quantité suffisante d'alginate sur un même lot, entraînant certaines approximations lors de l'analyse et interprétation des résultats. Le développement de conditions de synthèse des alginate permettant d'obtenir des quantités plus importantes pour chaque lot (plusieurs dizaines de grammes dans l'idéal) permettrait dans le futur d'effectuer les différentes mesures sur chaque lot synthétisé, et ainsi avoir accès à une analyse et compréhension plus précise des résultats obtenus.

Par ailleurs, les résultats obtenus en termes de viabilité semblent mettre en évidence que la viabilité des cellules est plus impactée lorsqu'elles sont en contact avec de l'alginate modifié chimiquement qu'avec de l'alginate de référence. Or les expériences d'encapsulation de cellules et de mesures de viabilité faites par l'EPFL et HUG avec ces mêmes alginate, en système d'encapsulation par dripping Buchi®, ne semblent pas montrer la même baisse de viabilité^{306,307}. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que les alginate modifiés chimiquement présentent une légère toxicité pour les cellules, qui se manifeste plus lors de l'encapsulation en microfluidique car elle engendre un temps de contact plus long entre les cellules et les alginate d'une part, et d'autre part car ces alginate sont utilisés à une concentration plus élevée que dans le système d'encapsulation Buchi®.

Cette hypothèse souligne le fait que la combinaison des alginate modifiés chimiquement et du système microfluidique représente un défi, et qu'il est donc nécessaire de réduire le temps d'encapsulation au maximum afin de pouvoir poursuivre les expériences d'encapsulation dans ces conditions. Lors de la dernière encapsulation effectuée dans cette thèse, l'encapsulation en microfluidique a été parallélisée (le volume d'alginate à encapsuler a été réparti dans deux contenants au lieu d'un). Cette méthode a permis d'obtenir des viabilités bien supérieures à celles obtenues précédemment (perte de viabilité inférieure à 5 %). Cette méthode semble donc intéressante pour l'utilisation d'alginate tels que ceux modifiés chimiquement par l'EPFL, et représente une bonne perspective d'amélioration du système.

Par ailleurs, certains protocoles pourraient être améliorés, comme celui utilisé pour la perméabilité, car les molécules de dextran sont des polysaccharides, et leur conformation est de type pelote aléatoire, alors que les protéines ont une conformation globulaire.¹⁴¹ Par conséquent, pour un même poids moléculaire, les protéines ont une taille un peu moins importante que les polysaccharides. Il serait donc intéressant de doubler les résultats obtenus avec une méthode de caractérisation utilisant des protéines. Le protocole utilisé pour l'étape de mélange des îlots avec l'alginate mériterait également d'être optimisé pour être plus reproductible.

Enfin, les résultats de l'implantation des capsules *in vivo* ont montré que les capsules étaient recouvertes de tissu fibreux, et ont donc provoqué une réaction du système immunitaire des souris greffées. Il serait donc intéressant de tester l'alginate-kétoprofène *in vivo*, afin de déterminer l'efficacité des propriétés anti-inflammatoires du Kétoprofène ; ainsi que de greffer sur les alginate des dérivés de PEG possédant des propriétés permettant de limiter la fibrose, ou bien de recouvrir les capsules d'une couche externe antifouling.

Ces tests *in vivo* mériteraient également d'être effectués sur des souris diabétiques, afin de valider la fonctionnalité des îlots encapsulés et leur efficacité à produire de l'insuline et rétablir une normo-glycémie. De nouveaux tests en modèle préclinique permettraient d'envisager un passage en essai clinique, si les résultats sont concluants.

Annexe 1 :
Proceedings 25th International conference on
Bioencapsulation,
Juillet 2017

VERSATILE CELL MICROENCAPSULATION PLATFORM

Crouïgneau R., Bottausci F., Gerber S., Szabó L., Benhamou P.Y., Icard B. and Rivera F. – CEA Leti DTBS, France



INTRODUCTION AND OBJECTIVES

Type 1 diabetes affects around 25 million people in the world. Curing this disease is a major challenge for health care. The most common treatment today is insulin injections, several times a day, but it is constraining and does not provide optimal glycaemic control. Transplantation of islets from human donors is a better hope for stable normoglycemia and a reduction in diabetes complications. However, this treatment requires administration of immunosuppressant that lead to many side effects and complications. Islet microencapsulation might be an alternative of immunosuppressive treatment.

Microcapsules properties depend on polymer properties and encapsulation technologies. Regarding the latter, the most commonly used is the air dripping nozzle, that produces microcapsules of 400-1000 μm in diameter, with a size monodispersity that isn't optimal (CV around 15%). We use here the Cellenc™ microfluidic platform to produce microcapsules down to 150 μm in diameter with a low size dispersion.

Additionally, two types of alginate have been characterized and used to produce microcapsules. The main drawbacks of alginate are its limited mechanical stability, durability and permeability problems (Mahou R., 2010) *Macromolecules*. In this paper, we compare the commercially available Pronova SLG100 alginate (Novamatrix) with an innovative PEGylated alginate that combines common alginate ionic binding with covalent binding using poly(ethylene-glycol) molecules grafted on the alginate backbone. It has been shown that these covalent bindings increase mechanical stability of the microcapsules (Mahou R., 2010) *Macromolecules* (Mahou R., 2015) *Chem. Mater.*

We demonstrate that the Cellenc™ microfluidic platform can be used and adapted for different biopolymers within a large range of viscosity and physico-chemical properties.

MATERIAL AND METHODS

Microfluidic design and fabrication

The alginate microcapsules are produced within the Cellenc™ microfluidic platform. First, alginate droplets are generated using a Micro Flow Focusing Device (MFFD) previously described (Le Vot S., 2008) *XVI International Conference on Bioencapsulation*: the alginate flow is sheared by the non-miscible continuous phase (soybean oil), producing a droplet. The droplet is then transferred automatically in a gelling solution, and finally in a physiological serum, thanks to phase transfers modules in the microfluidic cartridge. The size and shape of the capsules are controlled by adapting the channels size, the cartridge design and the pressures used for alginate, oils, gelling solution and physiological serum.

The Cellenc™ microfluidic cartridge is shown in Figure 1. It is a home-made hybrid system made of one silicon chip sealed within a cyclic olefin polymer (COC) cartridges. In the silicon chip, microfluidic channels are dry etched with standard microelectronic technologies to obtain 200 μm large and deep

microfluidic channels. The MFFD and phase transfers (Dalle P., 2012) *NSTI Nanotechnology conference and expo* are integrated into the silicon chip. Gelation channels are integrated into the plastic cartridge. Both silicon chip and plastic cartridge are functionalized to obtain hydrophobic channels.

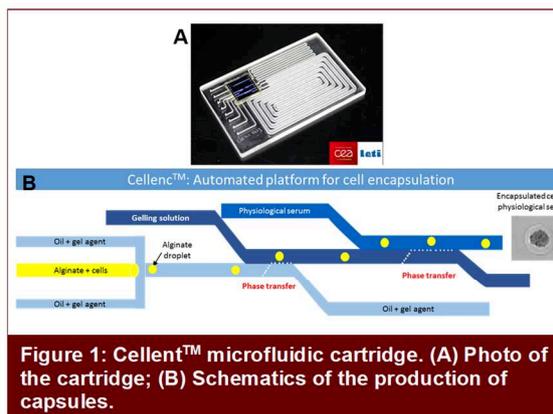


Figure 1: Cellenc™ microfluidic cartridge. (A) Photo of the cartridge; (B) Schematics of the production of capsules.

Capsules characterization

Capsules were produced in this microfluidic platform, with commercial alginate (Pronova SLG100-3%, Novamatrix), and innovative PEGylated alginate LS1/082-4% (EPFL). As previously described before, this PEGylated alginate is issued from the commercially available sodium alginate Kelton HV (CP KELCO, $[\eta]=813\text{mL.g}^{-1}$ in 0,1M NaCl, G/M=0.67), on which Poly Ethylene Glycol (PEG) molecules are grafted on the hydroxyl group, with a 14.3% rate.

Microcapsules were imaged with phase contrast microscope, and analysis of the size and shape of the capsules were done with the software ImageJ. Aspect Ratio (AR) (ratio between small and large diameters: spherical for 1) was characterized.

Biopolymers characterizations

Rheological properties of both alginates were measured on Malvern Bohlin Gemini rheometer, using a 1/60 cone. Viscosities were obtained either by fitting the rheological measurements with Carrea-Yasuda model (high viscosity), or from the plateau of the rheology curves (low viscosity).

Contact angles of the different alginates were measured using Krüss DSA100, by forming a drop on a silanized silicon surface immersed in Soybean oil.

RESULTS AND DISCUSSION

Rheology

Rheological curves of the two alginates are presented on Figure 2, showing a shear-thinning behavior. Viscosity of SLG100-3% (3.16Pa.s) is around 30 times higher than the one of LS1/082-4% (87.9mPa.s).

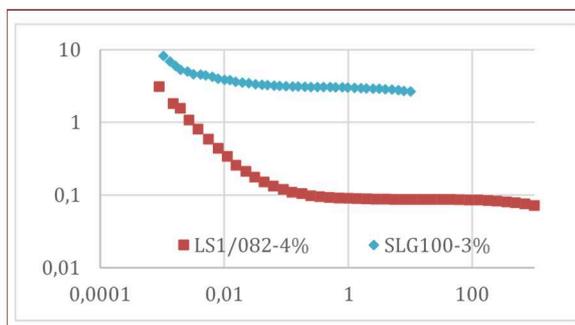


Figure 2 : Viscosity of different alginates (Pa.s) versus shear rate (s⁻¹)

Contact angle and surface tension

Contact angle and surface tension impact the production and properties of microcapsules. Low contact angle lead to wettability of the polymer to the microchannels and high surface tension to higher shear rate needed to form the capsules. The measurements for both biopolymers are presented on the table below. The silanization makes the surface highly hydrophobic (contact angle > 90°) for both biopolymers. However, LS1/082-4% alginate has lower contact angle than Pronova SLG100-3%, which means that it is more wettable with the surface.

Table 1: Surface tension and contact angles of different alginates in soybean oil

Alginate	Contact angle (°)	Surface tension (mN/m)
LS1/082-4%	126,45±1,43	11,434±0,42
SLG100-3%	139,1	16,992±0,52

Capsules production and analyse

Considering these characterizations, parameters in the microfluidic platform were adapted to produce capsules.

Microcapsules obtained with the Cellenc™ microfluidic platform are shown in Figure 3. Microcapsules diameter were characterized to be 188,2±2,7µm (CV: 1.5%) for Pronova SLG100-3% and 201±11µm (CV: of 5.5%) for LS1/082-4%. For both polymers, Aspect Ratio was close to 1 (1.054±0.028 for SLG100-3% and 1.06±0.03 for LS1/082-4%).

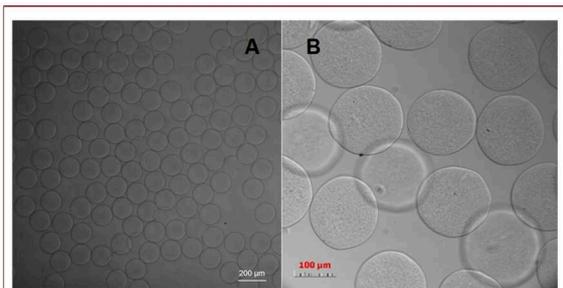


Figure 3 : Capsules obtained in Cellenc™ microfluidic platform. (A) Pronova SLG100-3% capsules; (B) PEGylated Kelton alginate capsules.

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

These results showed the ability of the Cellenc™ microfluidic platform to produce automatically microcapsules from different biopolymers. Low size dispersion (CV:5%) microcapsules have been produced independently from their physico-chemical properties and for a large range of viscosity.

Currently, capsules production with the innovative PEGylated alginate in the microfluidic platform are carried on, to eventually encapsulate insulin secreting cells first, and pig islets then. Encapsulated cells and islets will be tested in vitro and in vivo. The good control in size and shape of the capsules should give better results in terms of cells survival and biocompatibility, and the better mechanical resistance of PEGylated alginate should give long term mechanical stability and durability of the capsules.

This work has been funded by the French National Agency (ANR-15-CE18-0022).

REFERENCES

- Mahou R., Wandrey C., *Macromolecules*, 2010, **43**, 1371-1378
- Mahou R., Borcard F., Crivelli V. et al., *Chem. Mater.*, 2015, **27**, 4380-4389.
- Le Vot S. et al., *Proceedings of the XVI International Conference on Bioencapsulation*, 2008
- Dalle P. et al., 2012, *Technical proceedings of the 2012 NSTI Nanotechnology conference and expo*

Annexe 2 :
Proceedings BioEngineering 2019 Summit

Microfluidic encapsulation of pancreatic islets with improved biopolymers for type 1 diabetes cell therapy

Roxane Crouigneau, Ph.D.

French Alternative Energies and Atomic Energy Commission (CEA), LETI

Université Grenoble Alpes

F-38000 Grenoble, France

Cell therapy with allogenic pancreatic islets is a treatment used for Type 1 diabetes patients on whom the usual insulin treatment does not work. However, this requires administration of immunosuppressant that leads to many side effects and complications. FUTURCAPS presents an alternative to immunosuppressive treatment : islet microencapsulation.

Islets are encapsulated using microfluidics¹. This technology presents several advantages compared to the air dripping technology. The better control in capsules size enables to adapt it to that of the islets, increasing the chances of viability. The good shape control enables to avoid protrusions, reducing the risks of detection by the immune system. The most commonly used polymer is alginate, because of its biocompatibility, and permeability, but it has limited mechanical properties. Here, the alginates used are chemically modified² to improve their mechanical properties³, and reduce fibrotic effect when grafted.

First, the biopolymers' physico-chemical properties and the fluidic behavior were characterized⁴. Thanks to these data, human and neonatal pig islets were encapsulated using very viscous improved biopolymers in microfluidics, with a size dispersion lower than 5%. These encapsulated islets were tested in vitro for viability and insulin secretion, and implanted in mice, to check for diabetes reversal after 30 days.

Références :

1. Berthier J., Le Vot S. et al (2009) Highly viscous fluids in pressure actuated flow focusing devices 140-148
2. Mahou R., Borcard F., Crivelli V. (2015) Tuning the Properties of Hydrogel Microspheres by Adding Chemical Cross-linking Functionality to Sodium Alginate 27:4380-4389.
3. Mahou R., Wandrey C. (2010) Alginate-Poly(ethylene glycol) Hybrid Microspheres with Adjustable Physical Properties 43:1371-1378.
4. Berthier J., Dalle P. et al (2011) The physics of pressure powered micro-flow focusing device for the encapsulation of live cells

Références

- (1) Bourne, R. R. A.; Stevens, G. A.; White, R. A.; Smith, J. L.; Flaxman, S. R.; Price, H.; Jonas, J. B.; Keeffe, J.; Leasher, J.; Naidoo, K.; et al. Causes of Vision Loss Worldwide, 1990-2010: A Systematic Analysis. *Lancet Glob. Health* **2013**, *1* (6), e339-349. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(13\)70113-X](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(13)70113-X).
- (2) Ryan, A. J.; O'Neill, H. S.; Duffy, G. P.; O'Brien, F. J. Advances in Polymeric Islet Cell Encapsulation Technologies to Limit the Foreign Body Response and Provide Immunoisolation. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2017**, *36*, 66-71. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2017.07.013>.
- (3) Lim, F.; Sun, A. M. Microencapsulated Islets as Bioartificial Endocrine Pancreas. *Science* **1980**, *210* (4472), 908-910.
- (4) Lee, K. Y.; Mooney, D. J. Alginate: Properties and Biomedical Applications. *Prog. Polym. Sci.* **2012**, *37* (1), 106-126. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003>.
- (5) Zhao, X.; Huebsch, N.; Mooney, D. J.; Suo, Z. Stress-Relaxation Behavior in Gels with Ionic and Covalent Crosslinks. *J. Appl. Phys.* **2010**, *107* (6). <https://doi.org/10.1063/1.3343265>.
- (6) Mahou, R.; Wandrey, C. Alginate-Poly(Ethylene Glycol) Hybrid Microspheres with Adjustable Physical Properties. *Macromolecules* **2010**, *43* (3), 1371-1378. <https://doi.org/10.1021/ma902469f>.
- (7) Dalle, P. Système intégré pour l'encapsulation monocouche de cellules. 186.
- (8) Authesserre, C. Système microfluidique pour le contrôle et l'optimisation de l'encapsulation de cellules pour la thérapie du diabète, Université Grenoble Alpes, Grenoble, 2016.
- (9) Bon Usage des insulines et de leurs stylos - Le stylo à insuline http://www.omedite-centre.fr/stylo/co/1_stylo_.html (accessed Aug 13, 2019).
- (10) L'insulinothérapie par pompe | Agir à dom.
- (11) Dungan, K.; Verma, N. Monitoring Technologies – Continuous Glucose Monitoring, Mobile Technology, Biomarkers of Glycemic Control. In *Endotext*; Feingold, K. R., Anawalt, B., Boyce, A., Chrousos, G., Dungan, K., Grossman, A., Hershman, J. M., Kaltsas, G., Koch, C., Kopp, P., et al., Eds.; MDText.com, Inc.: South Dartmouth (MA), 2000.
- (12) Boughton, C. K.; Hovorka, R. Automated Insulin Delivery in Adults. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **2020**, *49* (1), 167-178. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2019.10.007>.
- (13) Allen, N.; Gupta, A. Current Diabetes Technology: Striving for the Artificial Pancreas. *Diagnostics* **2019**, *9* (1), 31. <https://doi.org/10.3390/diagnostics9010031>.
- (14) Al-Heeti, A. CES 2019: This mobile handset aims to simplify type 1 diabetes management <https://www.cnet.com/news/ces-2019-this-mobile-handset-aims-to-simplify-type-1-diabetes-management/> (accessed Jul 3, 2019).
- (15) Tutin, C. Diabète de type 1 : commercialisation des premières "boucles fermées" en 2019 <https://www.egora.fr/actus-medicales/diabetologie/47230-diabete-de-type-1-commercialisation-des-premieres-boucles-fermees> (accessed Jul 3, 2019).
- (16) Cogger, K.; Nostro, M. C. Recent Advances in Cell Replacement Therapies for the Treatment of Type 1 Diabetes. *Endocrinology* **2015**, *156* (1), 8-15. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1691>.
- (17) Desai, T.; Shea, L. D. Advances in Islet Encapsulation Technologies. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16* (5), 338-350. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.232>.
- (18) M. Skinner, S. J.; J. Tan, P. L.; Garkavenko, O.; Muzina, M.; Escobar, L.; B., R. Cell Replacement Therapy: The Rationale for Encapsulated Porcine Islet Transplantation. In *Type 1 Diabetes Complications*; Wagner, D., Ed.; InTech, 2011. <https://doi.org/10.5772/24824>.
- (19) O'Connell, P.; Cowan, P.; Hawthorne, W.; Yi, S.; M Lew, A. *Transplantation of Xenogeneic Islets: Are We There Yet?*; 2013; Vol. 13. <https://doi.org/10.1007/s11892-013-0413-9>.
- (20) J van der Windt, D.; Bottino, R.; Kumar, G.; Wijkstrom, M.; Hara, H.; Ezzelarab, M.; Ekser, B.; Phelps, C.; Murase, N.; Casu, A.; et al. *Clinical Islet Xenotransplantation: How Close Are We?*; 2012; Vol. 61. <https://doi.org/10.2337/db12-0033>.

- (21) Frank, A.; Deng, S.; Huang, X.; Velidedeoglu, E.; Bae, Y.-S.; Liu, C.; Abt, P.; Stephenson, R.; Mohiuddin, M.; Thambipillai, T.; et al. Transplantation for Type I Diabetes: Comparison of Vascularized Whole-Organ Pancreas With Isolated Pancreatic Islets. *Trans. Meet. Am. Surg. Assoc.* **2004**, *CXXII* (NA), 229–241. <https://doi.org/10.1097/01.sla.0000140754.26575.2a>.
- (22) Gruessner, R. W. G.; Gruessner, A. C. The Current State of Pancreas Transplantation. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2013**, *9* (9), 555–562. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.138>.
- (23) Herberts, C. A.; Kwa, M. S.; Hermsen, H. P. Risk Factors in the Development of Stem Cell Therapy. *J. Transl. Med.* **2011**, *9*, 29. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-29>.
- (24) Pellegrini, S.; Piemonti, L.; Sordi, V. Pluripotent Stem Cell Replacement Approaches to Treat Type 1 Diabetes. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2018**, *43*, 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2018.07.007>.
- (25) Duffy, C.; Prugue, C.; Glew, R.; Smith, T.; Howell, C.; Choi, G.; Cook, A. D. Feasibility of Induced Pluripotent Stem Cell Therapies for Treatment of Type 1 Diabetes. *Tissue Eng. Part B Rev.* **2018**, *24* (6), 482–492. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2018.0124>.
- (26) Barrot, F. En route vers la thérapie cellulaire et l'encapsulation des îlots! *Equilibre* **2016**, No. 313, 40–45.
- (27) Nakagawara, G. Transplantation of Islets of Langerhans. *J. Hepatobiliary. Pancreat. Surg.* **1994**, *1* (5), 542–545. <https://doi.org/10.1007/BF01211917>.
- (28) Hellerstroem, C. A METHOD FOR THE MICRODISSECTION OF INTACT PANCREATIC ISLETS OF MAMMALS. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* **1964**, *45*, 122–132.
- (29) Moskalewski, S. Isolation and Culture of the Islets of Langerhans of the Guinea Pig. *Gen. Comp. Endocrinol.* **1965**, *5* (3), 342–353. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(65\)90059-6](https://doi.org/10.1016/0016-6480(65)90059-6).
- (30) Lacy, P. E.; Kostianovsky, M. Method for the Isolation of Intact Islets of Langerhans from the Rat Pancreas. *Diabetes* **1967**, *16* (1), 35–39. <https://doi.org/10.2337/diab.16.1.35>.
- (31) Shapiro, A. M. J.; Lakey, J. R. T.; Ryan, E. A.; Korbutt, G. S.; Toth, E.; Warnock, G. L.; Kneteman, N. M.; Rajotte, R. V. Islet Transplantation in Seven Patients with Type 1 Diabetes Mellitus Using a Glucocorticoid-Free Immunosuppressive Regimen. *N. Engl. J. Med.* **2000**, *343* (4), 230–238. <https://doi.org/10.1056/NEJM200007273430401>.
- (32) Ricordi, C.; Goldstein, J. S.; Balamurugan, A. N.; Szot, G. L.; Kin, T.; Liu, C.; Czarniecki, C. W.; Barbaro, B.; Bridges, N. D.; Cano, J.; et al. National Institutes of Health–Sponsored Clinical Islet Transplantation Consortium Phase 3 Trial: Manufacture of a Complex Cellular Product at Eight Processing Facilities. *Diabetes* **2016**, *65* (11), 3418–3428. <https://doi.org/10.2337/db16-0234>.
- (33) Barton, F. B.; Rickels, M. R.; Alejandro, R.; Hering, B. J.; Wease, S.; Naziruddin, B.; Oberholzer, J.; Odorico, J. S.; Garfinkel, M. R.; Levy, M.; et al. Improvement in Outcomes of Clinical Islet Transplantation: 1999–2010. *Diabetes Care* **2012**, *35* (7), 1436–1445. <https://doi.org/10.2337/dc12-0063>.
- (34) Pathak, V.; Pathak, N. M.; O'Neill, C. L.; Guduric-Fuchs, J.; Medina, R. J. Therapies for Type 1 Diabetes: Current Scenario and Future Perspectives. *Clin. Med. Insights Endocrinol. Diabetes* **2019**, *12*. <https://doi.org/10.1177/1179551419844521>.
- (35) Pagliuca, F. W.; Melton, D. A. How to Make a Functional β -Cell. *Dev. Camb. Engl.* **2013**, *140* (12), 2472–2483. <https://doi.org/10.1242/dev.093187>.
- (36) Pessina, A.; Gribaldo, L. The Key Role of Adult Stem Cells: Therapeutic Perspectives. *Curr. Med. Res. Opin.* **2006**, *22*, 2287–2300. <https://doi.org/10.1185/030079906X148517>.
- (37) Shafiee, A.; Patel, J.; Lee, J. S.; Hutmacher, D. W.; Fisk, N. M.; Khosrotehrani, K. Mesenchymal Stem/Stromal Cells Enhance Engraftment, Vasculogenic and pro-Angiogenic Activities of Endothelial Colony Forming Cells in Immunocompetent Hosts. *Sci. Rep.* **2017**, *7*. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13971-3>.
- (38) Castro-Manrreza, M. E.; Montesinos, J. J. Immunoregulation by Mesenchymal Stem Cells: Biological Aspects and Clinical Applications. *J. Immunol. Res.* **2015**, *2015*. <https://doi.org/10.1155/2015/394917>.

- (39) Ezquer, M.; Arango-Rodriguez, M.; Giraud Billoud, M.; Ezquer, F. Mesenchymal Stem Cell Therapy in Type 1 Diabetes Mellitus and Its Main Complications: From Experimental Findings to Clinical Practice. *J. Stem Cell Res. Ther.* **2014**, *4*, 4–8. <https://doi.org/10.4172/2157-7633.1000227>.
- (40) Hisanaga, E.; Park, K.-Y.; Yamada, S.; Hashimoto, H.; Takeuchi, T.; Mori, M.; Seno, M.; Umezawa, K.; Takei, I.; Kojima, I. A Simple Method to Induce Differentiation of Murine Bone Marrow Mesenchymal Cells to Insulin-Producing Cells Using Conophylline and Betacellulin-Delta4. *Endocr. J.* **2008**, *55* (3), 535–543. <https://doi.org/10.1507/endocrj.k07e-173>.
- (41) Zhang, Y.; Shen, W.; Hua, J.; Lei, A.; Lv, C.; Wang, H.; Yang, C.; Gao, Z.; Dou, Z. Pancreatic Islet-like Clusters from Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells of Human First-Trimester Abortus Can Cure Streptozocin-Induced Mouse Diabetes. *Rejuvenation Res.* **2010**, *13* (6), 695–706. <https://doi.org/10.1089/rej.2009.1016>.
- (42) Rezania, A.; Bruin, J. E.; Riedel, M. J.; Mojibian, M.; Asadi, A.; Xu, J.; Gauvin, R.; Narayan, K.; Karanu, F.; O’Neil, J. J.; et al. Maturation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Pancreatic Progenitors Into Functional Islets Capable of Treating Pre-Existing Diabetes in Mice. *Diabetes* **2012**, *61* (8), 2016–2029. <https://doi.org/10.2337/db11-1711>.
- (43) Kunisada, Y.; Tsubooka-Yamazoe, N.; Shoji, M.; Hosoya, M. Small Molecules Induce Efficient Differentiation into Insulin-Producing Cells from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Res.* **2012**, *8* (2), 274–284. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2011.10.002>.
- (44) Millman, J. R.; Xie, C.; Van Dervort, A.; Gürtler, M.; Pagliuca, F. W.; Melton, D. A. Generation of Stem Cell-Derived β -Cells from Patients with Type 1 Diabetes. *Nat. Commun.* **2016**, *7*. <https://doi.org/10.1038/ncomms11463>.
- (45) Kroon, E.; Martinson, L. A.; Kadoya, K.; Bang, A. G.; Kelly, O. G.; Eliazar, S.; Young, H.; Richardson, M.; Smart, N. G.; Cunningham, J.; et al. Pancreatic Endoderm Derived from Human Embryonic Stem Cells Generates Glucose-Responsive Insulin-Secreting Cells in Vivo. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26* (4), 443–452. <https://doi.org/10.1038/nbt1393>.
- (46) Li, H.-C.; Stoicov, C.; Rogers, A. B.; Houghton, J. Stem Cells and Cancer: Evidence for Bone Marrow Stem Cells in Epithelial Cancers. *World J. Gastroenterol. WJG* **2006**, *12* (3), 363–371. <https://doi.org/10.3748/wjg.v12.i3.363>.
- (47) Werbowetski-Ogilvie, T. E.; Bossé, M.; Stewart, M.; Schnerch, A.; Ramos-Mejia, V.; Rouleau, A.; Wynder, T.; Smith, M.-J.; Dingwall, S.; Carter, T.; et al. Characterization of Human Embryonic Stem Cells with Features of Neoplastic Progression. *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27* (1), 91–97. <https://doi.org/10.1038/nbt.1516>.
- (48) Amariglio, N.; Hirshberg, A.; Scheithauer, B. W.; Cohen, Y.; Loewenthal, R.; Trakhtenbrot, L.; Paz, N.; Koren-Michowitz, M.; Waldman, D.; Leider-Trejo, L.; et al. Donor-Derived Brain Tumor Following Neural Stem Cell Transplantation in an Ataxia Telangiectasia Patient. *PLoS Med.* **2009**, *6* (2). <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000029>.
- (49) Okita, K.; Ichisaka, T.; Yamanaka, S. Generation of Germline-Competent Induced Pluripotent Stem Cells. *Nature* **2007**, *448* (7151), 313–317. <https://doi.org/10.1038/nature05934>.
- (50) Shih, C.-C.; Forman, S. J.; Chu, P.; Slovak, M. Human Embryonic Stem Cells Are Prone to Generate Primitive, Undifferentiated Tumors in Engrafted Human Fetal Tissues in Severe Combined Immunodeficient Mice. *Stem Cells Dev.* **2007**, *16* (6), 893–902. <https://doi.org/10.1089/scd.2007.0070>.
- (51) Knoepfler, P. S. Deconstructing Stem Cell Tumorigenicity: A Roadmap to Safe Regenerative Medicine. *Stem Cells Dayt. Ohio* **2009**, *27* (5), 1050–1056. <https://doi.org/10.1002/stem.37>.
- (52) Houghton, J.; Stoicov, C.; Nomura, S.; Rogers, A. B.; Carlson, J.; Li, H.; Cai, X.; Fox, J. G.; Goldenring, J. R.; Wang, T. C. Gastric Cancer Originating from Bone Marrow-Derived Cells. *Science* **2004**, *306* (5701), 1568–1571. <https://doi.org/10.1126/science.1099513>.

- (53) Stark, A.; Aparisi, T.; Ericsson, J. L. Human Osteogenic Sarcoma: Fine Structure of the Osteoblastic Type. *Ultrastruct. Pathol.* **1983**, *4* (4), 311–329. <https://doi.org/10.3109/01913128309140584>.
- (54) Barozzi, P.; Luppi, M.; Facchetti, F.; Mecucci, C.; Alù, M.; Sarid, R.; Rasini, V.; Ravazzini, L.; Rossi, E.; Festa, S.; et al. Post-Transplant Kaposi Sarcoma Originates from the Seeding of Donor-Derived Progenitors. *Nat. Med.* **2003**, *9* (5), 554–561. <https://doi.org/10.1038/nm862>.
- (55) Aractingi, S.; Kanitakis, J.; Euvrard, S.; Le Danff, C.; Peguillet, I.; Khosrotehrani, K.; Lantz, O.; Carosella, E. D. Skin Carcinoma Arising from Donor Cells in a Kidney Transplant Recipient. *Cancer Res.* **2005**, *65* (5), 1755–1760. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2783>.
- (56) Janin, A.; Murata, H.; Leboeuf, C.; Cayuela, J.-M.; Gluckman, E.; Legrès, L.; Desveaux, A.; Varna, M.; Ratajczak, P.; Soulier, J.; et al. Donor-Derived Oral Squamous Cell Carcinoma after Allogeneic Bone Marrow Transplantation. *Blood* **2009**, *113* (8), 1834–1840. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-171702>.
- (57) Adès, L.; Guardiola, P.; Sociè, G. Second Malignancies after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: New Insight and Current Problems. *Blood Rev.* **2002**, *16* (2), 135–146. <https://doi.org/10.1054/blre.2002.0010>.
- (58) Toyoda, T.; Mae, S.-I.; Tanaka, H.; Kondo, Y.; Funato, M.; Hosokawa, Y.; Sudo, T.; Kawaguchi, Y.; Osafune, K. Cell Aggregation Optimizes the Differentiation of Human ESCs and iPSCs into Pancreatic Bud-like Progenitor Cells. *Stem Cell Res.* **2015**, *14* (2), 185–197. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2015.01.007>.
- (59) Hrvatin, S.; O'Donnell, C. W.; Deng, F.; Millman, J. R.; Pagliuca, F. W.; DiIorio, P.; Rezanian, A.; Gifford, D. K.; Melton, D. A. Differentiated Human Stem Cells Resemble Fetal, Not Adult, β Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111* (8), 3038–3043. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400709111>.
- (60) Ernst, A. U.; Wang, L.-H.; Ma, M. Islet Encapsulation. *J. Mater. Chem. B* **2018**, *6* (42), 6705–6722. <https://doi.org/10.1039/C8TB02020E>.
- (61) Steiner, D. J.; Kim, A.; Miller, K.; Hara, M. Pancreatic Islet Plasticity: Interspecies Comparison of Islet Architecture and Composition. *Islets* **2010**, *2* (3), 135–145.
- (62) Safley, S. A.; Cui, H.; Cauffiel, S.; Tucker-Burden, C.; Weber, C. J. Biocompatibility and Immune Acceptance of Adult Porcine Islets Transplanted Intraperitoneally in Diabetic NOD Mice in Calcium Alginate Poly-L-Lysine Microcapsules versus Barium Alginate Microcapsules without Poly-L-Lysine. *J. Diabetes Sci. Technol. Online* **2008**, *2* (5), 760–767.
- (63) Dufrane, D.; Gianello, P. Pig Islets for Clinical Islet Xenotransplantation. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **2009**, *18* (6), 495. <https://doi.org/10.1097/MNH.0b013e328331a8e3>.
- (64) Potter, K. J.; Abedini, A.; Marek, P.; Klimek, A. M.; Butterworth, S.; Driscoll, M.; Baker, R.; Nilsson, M. R.; Warnock, G. L.; Oberholzer, J.; et al. Islet Amyloid Deposition Limits the Viability of Human Islet Grafts but Not Porcine Islet Grafts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107* (9), 4305–4310. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909024107>.
- (65) Transplantation of Porcine Fetal Pancreas to Diabetic Patients. *The Lancet* **1994**, *344* (8934), 1402–1404. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(94\)90570-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(94)90570-3).
- (66) Matsumoto, S.; Tomiya, M.; Sawamoto, O. Current Status and Future of Clinical Islet Xenotransplantation. *J. Diabetes* **2016**, *8* (4), 483–493. <https://doi.org/10.1111/1753-0407.12395>.
- (67) Good, A.; Cooper, D.; Malcolm, A.; Ippolito, R.; Koren, E.; Neethling, F.; Ye, Y.; Zuhdi, N.; Lamontagne, L. Identification of Carbohydrate Structures That Bind Human Antiporcine Antibodies: Implications for Discordant Xenografting in Humans. *Transplant. Proc.* **1992**, *24* (2), 559–562.
- (68) Kourtzelis, I.; Magnusson, P. U.; Kotlabova, K.; Lambris, J. D.; Chavakis, T. Regulation of Instant Blood Mediated Inflammatory Reaction (IBMIR) in Pancreatic Islet Xenotransplantation: Points for Therapeutic Interventions. In *Immune Responses to Biosurfaces*; Lambris, J. D., Ekdahl, K. N., Ricklin, D., Nilsson, B., Eds.; Springer International

- Publishing: Cham, 2015; Vol. 865, pp 171–188. https://doi.org/10.1007/978-3-319-18603-0_11.
- (69) Wiley, J. Dissecting the Instant Blood-Mediated Inflammatory Reaction in Islet Xenotransplantation. *Xenotransplantation* **2008**, *15* (4), 225–234. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3089.2008.00482.x>.
- (70) Van Der Windt, D. J.; Marigliano, M.; He, J.; Votyakova, T. V.; Echeverri, G. J.; Ekser, B.; Ayares, D.; Lakkis, F. G.; Cooper, D. K. C.; Trucco, M.; et al. Early Islet Damage after Direct Exposure of Pig Islets to Blood: Has Humoral Immunity Been Underestimated? *Cell Transplant* **2012**, *21* (8), 1791–1802. <https://doi.org/10.3727/096368912X653011>.
- (71) Deschamps, J.-Y.; Roux, F. A.; Saï, P.; Gouin, E. History of Xenotransplantation. *Xenotransplantation* **2005**, *12* (2), 91–109. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3089.2004.00199.x>.
- (72) Wang, T.; Birsoy, K.; Hughes, N. W.; Krupczak, K. M.; Post, Y.; Wei, J. J.; Lander, E. S.; Sabatini, D. M. Identification and Characterization of Essential Genes in the Human Genome. *Science* **2015**, *350* (6264), 1096–1101. <https://doi.org/10.1126/science.aac7041>.
- (73) Lebreton, F. Signaux électriques des îlots pancréatiques enregistrés sur matrices de microélectrodes: caractérisation et application au phénotypage d'animaux transgéniques. 222.
- (74) Ludwig, B.; Ludwig, S. Transplantable Bioartificial Pancreas Devices: Current Status and Future Prospects. *Langenbecks Arch. Surg.* **2015**, *400* (5), 531–540. <https://doi.org/10.1007/s00423-015-1314-y>.
- (75) Iacovacci, V.; Ricotti, L.; Menciacchi, A.; Dario, P. The Bioartificial Pancreas (BAP): Biological, Chemical and Engineering Challenges. *Biochem. Pharmacol.* **2016**, *100*, 12–27. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.08.107>.
- (76) Prochorov, A.; Tretjak, S.; Goranov, V.; Glinnik, A.; Goltsev, M. Treatment of Insulin Dependent Diabetes Mellitus with Intravascular Transplantation of Pancreatic Islet Cells without Immunosuppressive Therapy. *Adv. Med. Sci.* **2008**, *53* (2). <https://doi.org/10.2478/v10039-008-0045-5>.
- (77) MailPan @ BioArtificial Pancreas | Defymed, advanced therapies inspired for you <https://www.defymed.com/mailpan/> (accessed Aug 13, 2019).
- (78) Pepper, A. R.; Gala-Lopez, B.; Ziff, O.; Shapiro, A. M. J. Revascularization of Transplanted Pancreatic Islets and Role of the Transplantation Site. *Clin. Dev. Immunol.* **2013**, *2013*, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2013/352315>.
- (79) Jansson, L. The Regulation of Pancreatic Islet Blood Flow. *Diabetes. Metab. Rev.* **1994**, *10* (4), 407–416. <https://doi.org/10.1002/dmr.5610100405>.
- (80) Lifson, N.; Kramlinger, K. G.; Mayrand, R. R.; Lender, E. J. Blood Flow to the Rabbit Pancreas with Special Reference to the Islets of Langerhans. *Gastroenterology* **1980**, *79* (3), 466–473.
- (81) Kim, J.; Park, H. S.; Yoon, K.-H.; Lee, E. Y. Development of Perfluorodecalin Contained Microcapsules for Islet Survival and Function. *Diabetes* **2018**, *67* (Supplement 1), 1743-P. <https://doi.org/10.2337/db18-1743-P>.
- (82) Rodriguez-BrotonsAida; BietigerWilliam; PeronetClaude; LangloisAllan; MagissonJordan; MuraCarole; SookhareeaCynthia; PolardValerie; JeandidierNathalie; ZalFranck; et al. Comparison of Perfluorodecalin and HEMOXCell as Oxygen Carriers for Islet Oxygenation in an In Vitro Model of Encapsulation. *Tissue Eng. Part A* **2016**. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2016.0064>.
- (83) Barkai, U.; Weir, G. C.; Colton, C. K.; Ludwig, B.; Bornstein, S. R.; Brendel, M. D.; Neufeld, T.; Bremer, C.; Leon, A.; Evron, Y.; et al. Enhanced Oxygen Supply Improves Islet Viability in a New Bioartificial Pancreas. *Cell Transplant.* **2013**, *22* (8), 1463–1476. <https://doi.org/10.3727/096368912X657341>.
- (84) Ludwig, B.; Rotem, A.; Schmid, J.; Weir, G. C.; Colton, C. K.; Brendel, M. D.; Neufeld, T.; Block, N. L.; Yavriyants, K.; Steffen, A.; et al. Improvement of Islet Function in a Bioartificial Pancreas by Enhanced Oxygen Supply and Growth Hormone Releasing Hormone Agonist.

- Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109* (13), 5022–5027. <https://doi.org/10.1073/pnas.1201868109>.
- (85) Neufeld, T.; Ludwig, B.; Barkai, U.; Weir, G. C.; Colton, C. K.; Evron, Y.; Balyura, M.; Yavriyants, K.; Zimermann, B.; Azarov, D.; et al. The Efficacy of an Immunoisolating Membrane System for Islet Xenotransplantation in Minipigs. *PLoS ONE* **2013**, *8* (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070150>.
- (86) Ludwig, B.; Zimerman, B.; Steffen, A.; Yavriants, K.; Azarov, D.; Reichel, A.; Vardi, P.; German, T.; Shabtay, N.; Rotem, A.; et al. A Novel Device for Islet Transplantation Providing Immune Protection and Oxygen Supply. *Horm. Metab. Res.* **2010**, *42* (13), 918–922. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1267916>.
- (87) Ludwig, B.; Reichel, A.; Steffen, A.; Zimerman, B.; Schally, A. V.; Block, N. L.; Colton, C. K.; Ludwig, S.; Kersting, S.; Bonifacio, E.; et al. Transplantation of Human Islets without Immunosuppression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2013**, *110* (47), 19054–19058. <https://doi.org/10.1073/pnas.1317561110>.
- (88) Beta-O2 Technologies Ltd. | Clinical Trials <https://beta-o2.com/clinical-trials/#> (accessed Jul 3, 2019).
- (89) Beta-O2 Technologies Ltd. | Product <https://beta-o2.com/living-with-sair/#> (accessed Jul 3, 2019).
- (90) Song, S.; Roy, S. Progress and Challenges in Macroencapsulation Approaches for Type 1 Diabetes (T1D) Treatment: Cells, Biomaterials, and Devices: Progress and Challenges in Macroencapsulation. *Biotechnol. Bioeng.* **2016**, *113* (7), 1381–1402. <https://doi.org/10.1002/bit.25895>.
- (91) Scharp, D. W.; Marchetti, P. Encapsulated Islets for Diabetes Therapy: History, Current Progress, and Critical Issues Requiring Solution. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, *67–68*, 35–73. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.07.018>.
- (92) Lanza, R. P.; Borland, K. M.; Lodge, P.; Carretta, M.; Sullivan, S. J.; Muller, T. E.; Solomon, B. A.; Maki, T.; Monaco, A. P.; Chick, W. L. Treatment of Severely Diabetic Pancreatectomized Dogs Using a Diffusion-Based Hybrid Pancreas. *Diabetes* **1992**, *41* (7), 886–889. <https://doi.org/10.2337/diab.41.7.886>.
- (93) Prochorov, A.; Tretjak, S.; Goranov, V.; Glinnik, A.; Goltsev, M. Treatment of Insulin Dependent Diabetes Mellitus with Intravascular Transplantation of Pancreatic Islet Cells without Immunosuppressive Therapy. *Adv. Med. Sci.* **2008**, *53* (2). <https://doi.org/10.2478/v10039-008-0045-5>.
- (94) Chang, T. M. Semipermeable Microcapsules. *Science* **1964**, *146* (3643), 524–525.
- (95) O’Shea, G. M.; Goosen, M. F. A.; Sun, A. M. Prolonged Survival of Transplanted Islets of Langerhans Encapsulated in a Biocompatible Membrane. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1984**, *804* (1), 133–136. [https://doi.org/10.1016/0167-4889\(84\)90107-1](https://doi.org/10.1016/0167-4889(84)90107-1).
- (96) Zimmermann, H.; Zimmermann, D.; Reuss, R.; Feilen, P. J.; Manz, B.; Katsen, A.; Weber, M.; Ihmig, F. R.; Ehrhart, F.; Gefßner, P.; et al. Towards a Medically Approved Technology for Alginate-Based Microcapsules Allowing Long-Term Immunoisolated Transplantation. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2005**, *16* (6), 491–501. <https://doi.org/10.1007/s10856-005-0523-2>.
- (97) Soon-Shiong, P.; Feldman, E.; Nelson, R. Successful Reversal of Spontaneous Diabetes in Dogs by Intraperitoneal Microencapsulated Islets. *Transplantation* **1992**, *54* (5), 769–774.
- (98) Lanza, R. P.; Ecker, D. M.; Kühtreiber, W. M.; Marsh, J. P.; Ringeling, J.; Chick, W. L. Transplantation of Islets Using Microencapsulation: Studies in Diabetic Rodents and Dogs. *J. Mol. Med.* **1999**, *77* (1), 206–210.
- (99) Dufrane, D.; Gianello, P. Macro- or Microencapsulation of Pig Islets to Cure Type 1 Diabetes. *World J. Gastroenterol. WJG* **2012**, *18* (47), 6885–6893. <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i47.6885>.
- (100) Opara, E. C.; McQuilling, J. P.; Farney, A. C. Microencapsulation of Pancreatic Islets for Use in a Bioartificial Pancreas. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **2013**, *1001*, 261–266. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-363-3_21.

- (101) Steele, J. A. M.; Hallé, J.-P.; Poncelet, D.; Neufeld, R. J. Therapeutic Cell Encapsulation Techniques and Applications in Diabetes. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, *67–68*, 74–83. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.09.015>.
- (102) Merani, S.; Toso, C.; Emamaullee, J.; Shapiro, A. M. J. Optimal Implantation Site for Pancreatic Islet Transplantation. *Br. J. Surg.* **2008**, *95* (12), 1449–1461. <https://doi.org/10.1002/bjs.6391>.
- (103) Zhu, H.; Li, W.; Liu, Z.; Li, W.; Chen, N.; Lu, L.; Zhang, W.; Wang, Z.; Wang, B.; Pan, K.; et al. Selection of Implantation Sites for Transplantation of Encapsulated Pancreatic Islets. *Tissue Eng. Part B Rev.* **2018**, *24* (3), 191–214. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2017.0311>.
- (104) Teramura, Y.; Iwata, H. Bioartificial Pancreas. Microencapsulation and Conformal Coating of Islet of Langerhans. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62* (7–8), 827–840. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.01.005>.
- (105) Paredes Juárez, G. A.; Spasojevic, M.; Faas, M. M.; de Vos, P. Immunological and Technical Considerations in Application of Alginate-Based Microencapsulation Systems. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2014**, *2*. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2014.00026>.
- (106) Calafiore, R.; Basta, G. Clinical Application of Microencapsulated Islets: Actual Prospectives on Progress and Challenges. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, *67–68*, 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.09.020>.
- (107) Lablanche, S.; Borot, S.; Wojtuszczyzn, A.; Bayle, F.; Tétaz, R.; Badet, L.; Thivolet, C.; Morelon, E.; Frimat, L.; Penfornis, A.; et al. Five-Year Metabolic, Functional, and Safety Results of Patients With Type 1 Diabetes Transplanted With Allogenic Islets Within the Swiss-French GRAGIL Network. *Diabetes Care* **2015**, *38* (9), 1714–1722. <https://doi.org/10.2337/dc15-0094>.
- (108) Mazaheri, R.; Atkison, P.; Stiller, C.; Dupré, J.; Vose, J.; O’Shea, G. Transplantation of Encapsulated Allogeneic Islets into Diabetic BB/W Rats. Effects of Immunosuppression. *Transplantation* **1991**, *51* (4), 750–754.
- (109) Duvivier-Kali, V. F.; Omer, A.; Parent, R. J.; O’Neil, J. J.; Weir, G. C. Complete Protection of Islets Against Allorejection and Autoimmunity by a Simple Barium-Alginate Membrane. *Diabetes* **2001**, *50* (8), 1698–1705. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.8.1698>.
- (110) Omer, A.; Duvivier-Kali, V.; Fernandes, J.; Tchishopvili, V.; Colton, C. K.; Weir, G. C. Long-Term Normoglycemia in Rats Receiving Transplants with Encapsulated Islets: *Transplantation* **2005**, *79* (1), 52–58. <https://doi.org/10.1097/01.TP.0000149340.37865.46>.
- (111) Soon-Shiong, P.; Feldman, E.; Nelson, R.; Heintz, R.; Yao, Q.; Yao, Z.; Zheng, T.; Merideth, N.; Skjak-Braek, G.; Espevik, T. Long-Term Reversal of Diabetes by the Injection of Immunoprotected Islets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90* (12), 5843–5847.
- (112) Wang, T.; Adcock, J.; Kühtreiber, W.; Qiang, D.; Salleng, K. J.; Trenary, I.; Williams, P. Successful Allotransplantation of Encapsulated Islets in Pancreatectomized Canines for Diabetic Management Without the Use of Immunosuppression: *Transplantation* **2008**, *85* (3), 331–337. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181629c25>.
- (113) Basta, G.; Montanucci, P.; Luca, G.; Boselli, C.; Noya, G.; Barbaro, B.; Qi, M.; Kinzer, K. P.; Oberholzer, J.; Calafiore, R. Long-Term Metabolic and Immunological Follow-Up of Nonimmunosuppressed Patients With Type 1 Diabetes Treated With Microencapsulated Islet Allografts: Four Cases. *Diabetes Care* **2011**, *34* (11), 2406–2409. <https://doi.org/10.2337/dc11-0731>.
- (114) Calafiore, R.; Basta, G.; Luca, G.; Lemmi, A.; Montanucci, M. P.; Calabrese, G.; Racanicchi, L.; Mancuso, F.; Brunetti, P. Microencapsulated Pancreatic Islet Allografts Into Nonimmunosuppressed Patients With Type 1 Diabetes. *2*.
- (115) Tuch, B. E.; Keogh, G. W.; Williams, L. J.; Wu, W.; Foster, J. L.; Vaithilingam, V.; Philips, R. Safety and Viability of Microencapsulated Human Islets Transplanted Into Diabetic Humans. *Diabetes Care* **2009**, *32* (10), 1887–1889. <https://doi.org/10.2337/dc09-0744>.
- (116) Chintinne, M.; Ling, Z.; Gillard, P.; Schoonjans, L.; Delvaux, G.; Strand, B. L.; Gorus, F.; Keymeulen, B.; Pipeleers, D.; tulleeneers-Thevissen, J. Sustained Function of Alginate-

- Encapsulated Human Islet Cell Implants in the Peritoneal Cavity of Mice Leading to a Pilot Study in a Type 1 Diabetic Patient. *Diabetologia* **2013**, *56* (7), 1605–1614. <https://doi.org/10.1007/s00125-013-2906-0>.
- (117) Matsumoto, S.; Tan, P.; Baker, J.; Durbin, K.; Tomiya, M.; Azuma, K.; Doi, M.; Elliott, R. B. Clinical Porcine Islet Xenotransplantation Under Comprehensive Regulation. *Transplant. Proc.* **2014**, *46* (6), 1992–1995. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2014.06.008>.
- (118) Teramura, Y.; Kaneda, Y.; Iwata, H. Islet-Encapsulation in Ultra-Thin Layer-by-Layer Membranes of Poly(Vinyl Alcohol) Anchored to Poly(Ethylene Glycol)–Lipids in the Cell Membrane. *Biomaterials* **2007**, *28* (32), 4818–4825. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.07.050>.
- (119) Zhi, Z. -I.; Kerby, A.; King, A. J. F.; Jones, P. M.; Pickup, J. C. Nano-Scale Encapsulation Enhances Allograft Survival and Function of Islets Transplanted in a Mouse Model of Diabetes. *Diabetologia* **2012**, *55* (4), 1081–1090. <https://doi.org/10.1007/s00125-011-2431-y>.
- (120) Yun Lee, D.; Hee Nam, J.; Byun, Y. Functional and Histological Evaluation of Transplanted Pancreatic Islets Immunoprotected by PEGylation and Cyclosporine for 1 Year. *Biomaterials* **2007**, *28* (11), 1957–1966. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.12.015>.
- (121) Orive, G.; Santos, E.; Poncelet, D.; Hernández, R. M.; Pedraz, J. L.; Wahlberg, L. U.; De Vos, P.; Emerich, D. Cell Encapsulation: Technical and Clinical Advances. *Trends Pharmacol. Sci.* **2015**, *36* (8), 537–546. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.05.003>.
- (122) Krol, S.; del Guerra, S.; Grupillo, M.; Diaspro, A.; Gliozzi, A.; Marchetti, P. Multilayer Nanoencapsulation. New Approach for Immune Protection of Human Pancreatic Islets. *Nano Lett.* **2006**, *6* (9), 1933–1939. <https://doi.org/10.1021/nl061049r>.
- (123) Wilson, J. T.; Cui, W.; Chaikof, E. L. Layer-by-Layer Assembly of a Conformal Nanothin PEG Coating for Intraportal Islet Transplantation. *Nano Lett.* **2008**, *8* (7), 1940–1948. <https://doi.org/10.1021/nl080694q>.
- (124) Tse, H. M.; Kozlovskaya, V.; Kharlampieva, E.; Hunter, C. S. Minireview: Directed Differentiation and Encapsulation of Islet β -Cells—Recent Advances and Future Considerations. *Mol. Endocrinol.* **2015**, *29* (10), 1388–1399. <https://doi.org/10.1210/me.2015-1085>.
- (125) Elliott, R. B.; Escobar, L.; Tan, P. L. J.; Muzina, M.; Zwain, S.; Buchanan, C. Live Encapsulated Porcine Islets from a Type 1 Diabetic Patient 9.5 Yr after Xenotransplantation: Porcine Islets 9.5 Yr after Implant. *Xenotransplantation* **2007**, *14* (2), 157–161. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3089.2007.00384.x>.
- (126) Open-label Investigation of the Safety and Effectiveness of DIABECCELL® in Patients With Type 1 Diabetes Mellitus <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01739829> (accessed Jul 3, 2019).
- (127) Hillberg, A. L.; Kathirgamanathan, K.; Lam, J. B. B.; Law, L. Y.; Garkavenko, O.; Elliott, R. B. Improving Alginate-Poly-L-Ornithine-Alginate Capsule Biocompatibility through Genipin Crosslinking. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **2013**, *101B* (2), 258–268. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.32835>.
- (128) Dolgin, E. Encapsulate This. *Nat. Med.* **2014**, *20* (1), 9–11. <https://doi.org/10.1038/nm0114-9>.
- (129) An Open Label, Pilot Investigation, to Assess the Safety and Efficacy of Transplantation of Macro-encapsulated Human Islets Within the Bioartificial Pancreas Beta-Air in Patients With Type 1 Diabetes Mellitus - Full Text View - ClinicalTrials.gov <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02064309> (accessed Jul 4, 2019).
- (130) Kriz, J.; Vilk, G.; Mazzuca, D. M.; Toleikis, P. M.; Foster, P. J.; White, D. J. G. A Novel Technique for the Transplantation of Pancreatic Islets within a Vascularized Device into the Greater Omentum to Achieve Insulin Independence. *Am. J. Surg.* **2012**, *203* (6), 793–797. <https://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2011.02.009>.

- (131) A Safety, Tolerability and Efficacy Study of Sernova's Cell Pouch™ for Clinical Islet Transplantation <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03513939> (accessed Jul 5, 2019).
- (132) Sernova - Press Release <https://www.sernova.com/press/release/?id=256> (accessed Jul 5, 2019).
- (133) mkulwiec. PEC-Encap™ (VC-01™). *Viacyte, Inc.*
- (134) One-Year Follow-up Safety Study in Subjects Previously Implanted With VC-01™ <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02939118> (accessed Jul 5, 2019).
- (135) A Safety, Tolerability, and Efficacy Study of VC-02™ Combination Product in Subjects With Type 1 Diabetes Mellitus and Hypoglycemia Unawareness <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03163511> (accessed Jul 5, 2019).
- (136) Storrs, R.; Dorian, R.; King, S. R.; Lakey, J.; Rilo, H. Preclinical Development of the Islet Sheet. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2001**, *944* (1), 252–266. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb03837.x>.
- (137) Schweicher, J.; Nyitray, C.; Desai, T. A. Membranes to Achieve Immunoprotection of Transplanted Islets. *Front. Biosci. Landmark Ed.* **2014**, *19*, 49–76.
- (138) de Vos, P.; Lazarjani, H. A.; Poncelet, D.; Faas, M. M. Polymers in Cell Encapsulation from an Enveloped Cell Perspective. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, *67–68*, 15–34. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.11.005>.
- (139) Williams, D. F. On the Mechanisms of Biocompatibility. *Biomaterials* **2008**, *29* (20), 2941–2953. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.04.023>.
- (140) Rokstad, A. M.; Brekke, O.-L.; Steinkjer, B.; Ryan, L.; Kolláriková, G.; Strand, B. L.; Skjåk-Braek, G.; Lacík, I.; Espevik, T.; Mollnes, T. E. Alginate Microbeads Are Complement Compatible, in Contrast to Polycation Containing Microcapsules, as Revealed in a Human Whole Blood Model. *Acta Biomater.* **2011**, *7* (6), 2566–2578. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.03.011>.
- (141) Rokstad, A. M. A.; Lacík, I.; de Vos, P.; Strand, B. L. Advances in Biocompatibility and Physico-Chemical Characterization of Microspheres for Cell Encapsulation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, *67–68*, 111–130. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.07.010>.
- (142) Hilborn, J.; Bjursten, L. M. A New and Evolving Paradigm for Biocompatibility. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2007**, *1* (2), 110–119. <https://doi.org/10.1002/term.4>.
- (143) Lacík, I. Polymer Chemistry in Diabetes Treatment by Encapsulated Islets of Langerhans: Review to 2006. *Aust. J. Chem.* **2006**, *59* (8), 508–524. <https://doi.org/10.1071/CH06197>.
- (144) de Vos, P.; Bučko, M.; Gemeiner, P.; Navrátil, M.; Švitel, J.; Faas, M.; Strand, B. L.; Skjåk-Braek, G.; Morch, Y. A.; Vikartovská, A. Multiscale Requirements for Bioencapsulation in Medicine and Biotechnology. *Biomaterials* **2009**, *30* (13), 2559–2570. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.01.014>.
- (145) Webb, K.; Hlady, V.; Tresco, P. A. Relative Importance of Surface Wettability and Charged Functional Groups on NIH 3T3 Fibroblast Attachment, Spreading, and Cytoskeletal Organization. *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, *41* (3), 422–430.
- (146) van Wachem, P. B.; Beugeling, T.; Feijen, J.; Bantjes, A.; Detmers, J. P.; van Aken, W. G. Interaction of Cultured Human Endothelial Cells with Polymeric Surfaces of Different Wettabilities. *Biomaterials* **1985**, *6* (6), 403–408. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(85\)90101-2](https://doi.org/10.1016/0142-9612(85)90101-2).
- (147) van Wachem, P. B.; Hogt, A. H.; Beugeling, T.; Feijen, J.; Bantjes, A.; Detmers, J. P.; van Aken, W. G. Adhesion of Cultured Human Endothelial Cells onto Methacrylate Polymers with Varying Surface Wettability and Charge. *Biomaterials* **1987**, *8* (5), 323–328. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(87\)90001-9](https://doi.org/10.1016/0142-9612(87)90001-9).
- (148) Vogler, E. A. Protein Adsorption in Three Dimensions. *Biomaterials* **2012**, *33* (5), 1201–1237. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.10.059>.
- (149) Gasperini, L.; Mano, J. F.; Reis, R. L. Natural Polymers for the Microencapsulation of Cells. *J. R. Soc. Interface* **2014**, *11* (100), 20140817–20140817. <https://doi.org/10.1098/rsif.2014.0817>.

- (150) Strand, B. L.; Ryan, L.; Veld, P. I.; Kulseng, B.; Rokstad, A. M.; Skjåk-Bræk, G.; Espevik, T. Poly-L-Lysine Induces Fibrosis on Alginate Microcapsules via the Induction of Cytokines. *Cell Transplant.* **2001**, *10* (3), 263–275. <https://doi.org/10.3727/000000001783986800>.
- (151) R. Bhatia, S.; F. Khatkhat, S.; Roberts, S. Polyelectrolytes for Cell Encapsulation. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2005**, *10*, 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2005.05.004>.
- (152) Oliva, A.; Fariña, J.; Llabrés, M. Development of Two High-Performance Liquid Chromatographic Methods for the Analysis and Characterization of Insulin and Its Degradation Products in Pharmaceutical Preparations. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* **2000**, *749* (1), 25–34. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)00374-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)00374-1).
- (153) Calafiore, R.; Basta, G.; Luca, G.; Boselli, C.; Bufalari, A.; Giustozzi, G. M.; Moggi, L.; Brunetti, P. Alginate/Polyaminoacidic Coherent Microcapsules for Pancreatic Islet Graft Immunoisolation in Diabetic Recipients. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2006**, *831* (1), 313–322. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1997.tb52206.x>.
- (154) De Vos, P.; Van Straaten, J. F.; Nieuwenhuizen, A. G.; de Groot, M.; Ploeg, R. J.; De Haan, B. J.; Van Schilfgaarde, R. Why Do Microencapsulated Islet Grafts Fail in the Absence of Fibrotic Overgrowth? *Diabetes* **1999**, *48* (7), 1381–1388. <https://doi.org/10.2337/diabetes.48.7.1381>.
- (155) Lekka, M.; Sainz-Serp, D.; Kulik, A. J.; Wandrey, C. Hydrogel Microspheres: Influence of Chemical Composition on Surface Morphology, Local Elastic Properties, and Bulk Mechanical Characteristics. *Langmuir* **2004**, *20* (23), 9968–9977. <https://doi.org/10.1021/la048389h>.
- (156) Bünger, C. M.; Gerlach, C.; Freier, T.; Schmitz, K. P.; Pilz, M.; Werner, C.; Jonas, L.; Schareck, W.; Hopt, U. T.; de Vos, P. Biocompatibility and Surface Structure of Chemically Modified Immunoisolating Alginate-PLL Capsules: Biocompatibility of Chemically Modified Capsules. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2003**, *67A* (4), 1219–1227. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.10094>.
- (157) Li, R. H. Materials for Immunoisolated Cell Transplantation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1998**, *23*.
- (158) Mikos, A. G.; Papadaki, M. G.; Kouvroutoglou, S.; Ishaug, S. L.; Thomson, R. C. Mini-Review: Islet Transplantation to Create a Bioartificial Pancreas. *Biotechnol. Bioeng.* **1994**, *43* (7), 673–677. <https://doi.org/10.1002/bit.260430717>.
- (159) de Vos, P.; Hamel, A. F.; Tatarkiewicz, K. Considerations for Successful Transplantation of Encapsulated Pancreatic Islets. *Diabetologia* **2002**, *45* (2), 159–173. <https://doi.org/10.1007/s00125-001-0729-x>.
- (160) Řřhová, B. Immunocompatibility and Biocompatibility of Cell Delivery Systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2000**, *42* (1–2), 65–80. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00054-5](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00054-5).
- (161) Nafea, E. H.; Poole-Warren, A. M., L. A.; Martens, P. J. Immunoisolating Semi-Permeable Membranes for Cell Encapsulation: Focus on Hydrogels. *J. Controlled Release* **2011**, *154* (2), 110–122. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.04.022>.
- (162) Olabisi, R. M. Cell Microencapsulation with Synthetic Polymers: Synthetic Cell Microencapsulation. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2015**, *103* (2), 846–859. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35205>.
- (163) Malafaya, P. B.; Silva, G. A.; Reis, R. L. Natural-Origin Polymers as Carriers and Scaffolds for Biomolecules and Cell Delivery in Tissue Engineering Applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, *59* (4–5), 207–233. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.03.012>.
- (164) Jang, J. Y.; Lee, D. Y.; Park, S. J.; Byun, Y. Immune Reactions of Lymphocytes and Macrophages against PEG-Grafted Pancreatic Islets. *Biomaterials* **2004**, *25* (17), 3663–3669. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.10.062>.
- (165) Nuttelman, C. R.; Rice, M. A.; Rydholm, A. E.; Salinas, C. N.; Shah, D. N.; Anseth, K. S. Macromolecular Monomers for the Synthesis of Hydrogel Niches and Their Application in Cell Encapsulation and Tissue Engineering. *Prog. Polym. Sci.* **2008**, *33* (2), 167–179. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.09.006>.
- (166) Lutolf, M. P.; Hubbell, J. A. Synthetic Biomaterials as Instructive Extracellular Microenvironments for Morphogenesis in Tissue Engineering. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23* (1), 47–55. <https://doi.org/10.1038/nbt1055>.

- (167) Cruise, G. M.; Hegre, O. D.; Lamberti, F. V.; Hager, S. R.; Hill, R.; Scharp, D. S.; Hubbell, J. A. In Vitro and in Vivo Performance of Porcine Islets Encapsulated in Interfacially Photopolymerized Poly(Ethylene Glycol) Diacrylate Membranes. *Cell Transplant.* **1999**, *8* (3), 293–306. <https://doi.org/10.1177/096368979900800310>.
- (168) Qi, M.; Gu, Y.; Sakata, N.; Kim, D.; Shirouzu, Y.; Yamamoto, C.; Hiura, A.; Sumi, S.; Inoue, K. PVA Hydrogel Sheet Macroencapsulation for the Bioartificial Pancreas. *Biomaterials* **2004**, *25* (27), 5885–5892. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.01.050>.
- (169) Qi, Z.; Shen, Y.; Yanai, G.; Yang, K.; Shirouzu, Y.; Hiura, A.; Sumi, S. The in Vivo Performance of Polyvinyl Alcohol Macro-Encapsulated Islets. *Biomaterials* **2010**, *31* (14), 4026–4031. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.01.088>.
- (170) Burczak, K.; Gamian, E.; Kochman, A. Long-Term in Vivo Performance and Biocompatibility of Poly(Vinyl Alcohol) Hydrogel Macrocapsules for Hybrid-Type Artificial Pancreas. **1996**, *17* (24), 6.
- (171) Cascone, M. G.; Tricoli, M.; Cerrai, P.; Del Guerra, R. S. Cell Cultures in the Biocompatibility Study of Synthetic Materials. *Cytotechnology* **1993**, *11* (1), S137–S139. <https://doi.org/10.1007/BF00746079>.
- (172) Seymour, R. B.; Kauffman, G. B. Polyurethanes: A Class of Modern Versatile Materials. *J. Chem. Educ.* **1992**. <https://doi.org/10.1021/ed069p909>.
- (173) Soldani, G.; Losi, P.; Bernabei, M.; Burchielli, S.; Chiappino, D.; Kull, S.; Briganti, E.; Spiller, D. Long Term Performance of Small-Diameter Vascular Grafts Made of a Poly(Ether)Urethane–Polydimethylsiloxane Semi-Interpenetrating Polymeric Network. *Biomaterials* **2010**, *31* (9), 2592–2605. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.12.017>.
- (174) Khandwekar, A. P.; Patil, D. P.; Hardikar, A. A.; Shouche, Y. S.; Doble, M. In Vivo Modulation of Foreign Body Response on Polyurethane by Surface Entrapment Technique. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2010**, *95A* (2), 413–423. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32852>.
- (175) George, S.; Nair, P. D.; Risbud, M. V.; Bhonde, R. R. Nonporous Polyurethane Membranes as Islet Immunoisolation Matrices – Biocompatibility Studies. *J. Biomater. Appl.* **2002**, *16* (4), 327–340. <https://doi.org/10.1106/088532802024249>.
- (176) Sefton, M. V.; May, M. H.; Lahooti, S.; Babensee, J. E. Making Microencapsulation Work: Conformal Coating, Immobilization Gels and in Vivo Performance. *J. Controlled Release* **2000**, *14*.
- (177) Lahooti, S.; Sefton, M. V. Methods for Microencapsulation with HEMA-MMA. *Methods Mol. Med.* **1999**, *18*, 331–348. <https://doi.org/10.1385/0-89603-516-6:331>.
- (178) Stevenson, W. T. K.; Sefton, M. V. Graft Copolymer Emulsions of Sodium Alginate with Hydroxyalkyl Methacrylates for Microencapsulation. *Biomaterials* **1987**, *8*.
- (179) Sabnis, A.; Rahimi, M.; Chapman, C.; Nguyen, K. T. Cytocompatibility Studies of an in Situ Photopolymerized Thermoresponsive Hydrogel Nanoparticle System Using Human Aortic Smooth Muscle Cells. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2009**, *91A* (1), 52–59. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32194>.
- (180) Nguyen, K. T.; West, J. L. Photopolymerizable Hydrogels for Tissue Engineering Applications. *Biomaterials* **2002**, *23* (22), 4307–4314. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00175-8](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00175-8).
- (181) Prakash, S.; Chang, T. M. S. Preparation and in Vitro Analysis of Microencapsulated Genetically Engineered E. Coli DH5 Cells for Urea and Ammonia Removal. *Biotechnol. Bioeng.* **1995**, *46* (6), 621–626. <https://doi.org/10.1002/bit.260460615>.
- (182) Hoffman, A. S. Hydrogels for Biomedical Applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.010>.
- (183) Slaughter, B. V.; Khurshid, S. S.; Fisher, O. Z.; Khademhosseini, A.; Peppas, N. A. Hydrogels in Regenerative Medicine. *Adv. Mater.* **2009**, *21* (32–33), 3307–3329. <https://doi.org/10.1002/adma.200802106>.
- (184) Lanza, R. P.; Ecker, D. M. A Simple Method for Transplanting Discordant Islets into Rats Using Alginate Gel Spheres. *Transplantation* **1995**, *59* (10), 1485–1487.

- (185) Aslani, P.; Kennedy, R. A. Studies on Diffusion in Alginate Gels. I. Effect of Cross-Linking with Calcium or Zinc Ions on Diffusion of Acetaminophen. *J. Controlled Release* **1996**, *42* (1), 75–82. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(96\)01369-7](https://doi.org/10.1016/0168-3659(96)01369-7).
- (186) Tanaka, H.; Matsumura, M.; Veliky, I. A. Diffusion Characteristics of Substrates in Ca-Alginate Gel Beads. *Biotechnol. Bioeng.* **1984**, *26* (1), 53–58. <https://doi.org/10.1002/bit.260260111>.
- (187) Kuo, C. K.; Ma, P. X. Ionically Crosslinked Alginate Hydrogels as Scaffolds for Tissue Engineering: Part 1. Structure, Gelation Rate and Mechanical Properties. **2001**, 11.
- (188) Miyoshi, Y.; Date, I.; Ohmoto, T.; Iwata, H. Histological Analysis of Microencapsulated Dopamine-Secreting Cells in Agarose/Poly(Styrene Sulfonic Acid) Mixed Gel Xenotransplanted into the Brain. *Exp. Neurol.* **1996**, *138* (1), 169–175. <https://doi.org/10.1006/exnr.1996.0055>.
- (189) Lahaye, M.; Rochas, C. Chemical Structure and Physico-Chemical Properties of Agar. *Hydrobiologia* **1991**, *221* (1), 137–148. <https://doi.org/10.1007/BF00028370>.
- (190) L. Indovina, P.; Tettamanti, E.; S. Micciancio-Giammarinaro, M.; U. Palma, M. Thermal Hysteresis and Reversibility of Gel-Sol Transition in Agarose-Water Systems. *Chem. Phys. - CHEM PHYS* **1979**, *70*, 2841–2847. <https://doi.org/10.1063/1.437817>.
- (191) Tun, T. A Newly Developed Three-Layer Agarose Microcapsule for a Promising Biohybrid Artificial Pancreas: Rat to Mouse Xenotransplantation. *Cell Transplant.* **1996**, *5* (5), S59–S63. [https://doi.org/10.1016/0963-6897\(96\)00042-5](https://doi.org/10.1016/0963-6897(96)00042-5).
- (192) Gin, H.; Dupuy, B.; Baquey, A.; Baquey, C. H.; Ducassou, D. Lack of Responsiveness to Glucose of Microencapsulated Islets of Langerhans after Three Weeks' Implantation in the Rat--Influence of the Complement. *J. Microencapsul.* **1990**, *7* (3), 341–346. <https://doi.org/10.3109/02652049009021844>.
- (193) Yang, H.; Zhao, K.; Ye, Y.; Deng, S. Study of macroencapsulated islet xenografts for treatment of diabetes in mice. *Hua Xi Yi Ke Xue Xue Bao J. West China Univ. Med. Sci. Huaxi Yike Daxue Xuebao* **1998**, *29* (2), 132–135.
- (194) Hunziker, E. B. Articular Cartilage Repair: Basic Science and Clinical Progress. A Review of the Current Status and Prospects. *Osteoarthritis Cartilage* **2002**, *10* (6), 432–463. <https://doi.org/10.1053/joca.2002.0801>.
- (195) Uludag, H.; Vos, P. D.; Tresco, P. A. Technology of Mammalian Cell Encapsulation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2000**, 36.
- (196) Kim, H. J.; Lee, H. C.; Oh, J. S.; Shin, B. A.; Oh, C. S.; Park, R. D.; Yang, K. S.; Cho, C. S. Polyelectrolyte Complex Composed of Chitosan and Sodium Alginate for Wound Dressing Application. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **1999**, *10* (5), 543–556.
- (197) Wang, T.; Lacik, I.; Brissova, M.; Anilkumar, A. V.; Prokop, A.; Hunkeler, D. An Encapsulation System for the Immunoisolation of Pancreatic Islets. **1997**, *15*, 5.
- (198) Risbud, M. V.; Bhargava, S.; Bhonde, R. R. In Vivo Biocompatibility Evaluation of Cellulose Macrocapsules for Islet Immunoisolation: Implications of Low Molecular Weight Cut-Off. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2003**, *66A* (1), 86–92. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.10522>.
- (199) Miyamoto, T.; Takahashi, S.; Ito, H.; Inagaki, H.; Noishiki, Y. Tissue Biocompatibility of Cellulose and Its Derivatives. *J. Biomed. Mater. Res.* **1989**, *23* (1), 125–133. <https://doi.org/10.1002/jbm.820230110>.
- (200) Dautzenberg, H.; Schuldt, U.; Grasnack, G.; Karle, P.; Müller, P.; Löhr, M.; Pelegrin, M.; Piechaczyk, M.; Rombs, K. V.; Günzburg, W. H.; et al. Development of Cellulose Sulfate-based Polyelectrolyte Complex Microcapsules for Medical Applications. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1999**. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb08493.x>.
- (201) Matthew, H. W.; Salley, S. O.; Peterson, W. D.; Klein, M. D. Complex Coacervate Microcapsules for Mammalian Cell Culture and Artificial Organ Development. *Biotechnol. Prog.* **1993**, *9* (5), 510–519. <https://doi.org/10.1021/bp00023a010>.
- (202) Helenius, G.; Bäckdahl, H.; Bodin, A.; Nannmark, U.; Gatenholm, P.; Risberg, B. In Vivo Biocompatibility of Bacterial Cellulose. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2006**, *76A* (2), 431–438. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30570>.

- (203) Schneider, S.; Feilen, P. J.; Sloty, V.; Kampfner, D.; Preuss, S.; Berger, S.; Beyer, J.; Pommersheim, R. Multilayer Capsules: A Promising Microencapsulation System for Transplantation of Pancreatic Islets. *Biomaterials* **2001**, *22* (14), 1961–1970. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00380-X](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00380-X).
- (204) Pelegrin, M.; Marin, M.; Noël, D.; Rio, M. D.; Saller, R.; Stange, J.; Mitzner, S.; Günzburg, W.; Piechaczyk, M. Systemic Long-Term Delivery of Antibodies in Immunocompetent Animals Using Cellulose Sulphate Capsules Containing Antibody-Producing Cells. *Gene Ther.* **1998**, *5* (6), 828–834. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3300632>.
- (205) Xu, T.; Molnar, P.; Gregory, C.; Das, M.; Boland, T.; Hickman, J. J. Electrophysiological Characterization of Embryonic Hippocampal Neurons Cultured in a 3D Collagen Hydrogel. *Biomaterials* **2009**, *30* (26), 4377–4383. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.04.047>.
- (206) Lee, C. H.; Singla, A.; Lee, Y. Biomedical Applications of Collagen. *Int. J. Pharm.* **2001**, *221* (1–2), 1–22. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(01\)00691-3](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00691-3).
- (207) Edamura, K.; Ohgawara, H.; Nasu, K.; Iwami, Y.; Sato, A.; Ishikawa, S.; Matsuki, N.; Ono, K.; Ogawa, H.; Sasaki, N. Effect of the Extracellular Matrix on Pancreatic Endocrine Cell Function and Its Biocompatibility in Dogs. *Cell Transplant.* **2001**, *10* (4–5), 493–498. <https://doi.org/10.3727/000000001783986639>.
- (208) Jorge-Herrero, E.; Fernández, P.; Turnay, J.; Olmo, N.; Calero, P.; García, R.; Freile, I.; Castillo-Olivares, J. L. Influence of Different Chemical Cross-Linking Treatments on the Properties of Bovine Pericardium and Collagen. *Biomaterials* **1999**, *20* (6), 539–545. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(98\)90205-8](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(98)90205-8).
- (209) Kobayashi, T.; Aomatsu, Y.; Iwata, H.; Kin, T.; Kanehiro, H.; Hisanaga, M.; Ko, S.; Nagao, M.; Nakajima, Y. Indefinite Islet Protection from Autoimmune Destruction in Nonobese Diabetic Mice by Agarose Microencapsulation without Immunosuppression. *Transplantation* **2003**, *75* (5), 619–625. <https://doi.org/10.1097/01.TP.0000053749.36365.7E>.
- (210) Kobayashi, T.; Aomatsu, Y.; Kanehiro, H.; Hisanaga, M.; Nakajima, Y. Protection of NOD Islet Isograft from Autoimmune Destruction by Agarose Microencapsulation. *Transplant. Proc.* **2003**, *35* (1), 484–485. [https://doi.org/10.1016/S0041-1345\(02\)03829-0](https://doi.org/10.1016/S0041-1345(02)03829-0).
- (211) Sakai, S.; Kawakami, K. Synthesis and Characterization of Both Ionically and Enzymatically Cross-Linkable Alginate. *Acta Biomater.* **2007**, *3* (4), 495–501. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2006.12.002>.
- (212) Sakai, S.; Hashimoto, I.; Kawakami, K. Agarose–Gelatin Conjugate for Adherent Cell-Enclosing Capsules. *Biotechnol. Lett.* **2007**, *29* (5), 731–735. <https://doi.org/10.1007/s10529-007-9312-y>.
- (213) Stadlbauer, V.; Stiegler, P. B.; Schaffellner, S.; Hauser, O.; Halwachs, G.; Iberer, F.; Tscheliessnigg, K. H.; Lackner, C. Morphological and Functional Characterization of a Pancreatic β -Cell Line Microencapsulated in Sodium Cellulose Sulfate/Poly(Diallyldimethylammonium Chloride). *Xenotransplantation* **2006**, *13* (4), 337–344. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3089.2006.00315.x>.
- (214) Marinucci, L.; Lilli, C.; Guerra, M.; Belcastro, S.; Becchetti, E.; Stabellini, G.; Calvi, E. M.; Locci, P. Biocompatibility of Collagen Membranes Crosslinked with Glutaraldehyde or Diphenylphosphoryl Azide: An in Vitro Study. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2003**, *67A* (2), 504–509. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.10082>.
- (215) Morch, Y. A. Novel Alginate Microcapsules for Cell Therapy, Norwegian University of Science and Technology, Trondheim, 2008.
- (216) Bhujbal, S. V.; de Haan, B.; Niclou, S. P.; de Vos, P. A Novel Multilayer Immunoisolating Encapsulation System Overcoming Protrusion of Cells. *Sci. Rep.* **2015**, *4* (1), 6856. <https://doi.org/10.1038/srep06856>.
- (217) Mørch, Y. A.; Donati, I.; Strand, B. L. Effect of Ca²⁺, Ba²⁺, and Sr²⁺ on Alginate Microbeads. *Biomacromolecules* **2006**, *7* (5), 1471–1480. <https://doi.org/10.1021/bm060010d>.
- (218) Grant, G. T.; Mon, E. R.; Rees, S. D. A. Biological Interactions Between Polysaccharides and Divalent Cations: The Egg-Box Model. *FEBS Lett.* **1973**, *32* (1), 4.

- (219) Kohn, R.; Larsen, B. 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 Chem. Scand.* **1972**, *26* (6), 2455–2468.
- (220) Stokke, B. T.; Smidsrod, O. Distribution of Uronate Residues in Alginate Chains in Relation to Alginate Gelling Properties -- 2: Enrichment of Fl-D-Mannuronic Acid and Depletion of a-L-Guluronic Acid in Sol Fraction. 8.
- (221) Poncelet, D.; Lencki, R.; Beaulieu, C.; Halle, J. P.; Neufeld, R. J.; Fournier, A. Production of Alginate Beads by Emulsification/Internal Gelation. I. Methodology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1992**, *38* (1). <https://doi.org/10.1007/BF00169416>.
- (222) Poncelet, D.; Smet, B. P. D.; Beaulieu, C.; Huguet, M. L.; Fournier, A.; Neufeld, R. J. Production of Alginate Beads by Emulsification/Internal Gelation. I1. Physicochemistry. **1995**, *7*.
- (223) Liu, X. D.; Yu, W. Y.; Zhang, Y.; Xue, W. M.; Yu, W. T.; Xiong, Y.; Ma, X. J.; Chen, Y.; Yuan, Q. Characterization of Structure and Diffusion Behaviour of Ca-Alginate Beads Prepared with External or Internal Calcium Sources. *J. Microencapsul.* **2002**, *19* (6), 775–782. <https://doi.org/10.1080/0265204021000022743>.
- (224) Chan, L. W.; Lee, H. Y.; Heng, P. W. S. Mechanisms of External and Internal Gelation and Their Impact on the Functions of Alginate as a Coat and Delivery System. *Carbohydr. Polym.* **2006**, *63* (2), 176–187. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.07.033>.
- (225) Mancini, M.; Moresi, M.; Rancini, R. Mechanical Properties of Alginate Gels: Empirical Characterisation. *J. Food Eng.* **1999**, *39* (4), 369–378. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(99\)00022-9](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(99)00022-9).
- (226) Drury, J. L.; Dennis, R. G.; Mooney, D. J. The Tensile Properties of Alginate Hydrogels. *Biomaterials* **2004**, *25* (16), 3187–3199. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.10.002>.
- (227) Szekalska, M.; Puciłowska, A.; Szymańska, E.; Ciosek, P.; Winnicka, K. Alginate: Current Use and Future Perspectives in Pharmaceutical and Biomedical Applications. *Int. J. Polym. Sci.* **2016**, *2016*, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2016/7697031>.
- (228) Draget, K. I.; Simensen, M. K.; Onsøyen, E.; Smidsrød, O. Gel Strength of Ca-Limited Alginate Gels Made in Situ. *Hydrobiologia* **1993**, *260/261*, 563–565.
- (229) Fu, S.; Thacker, A.; Sperger, D. M.; Boni, R. L.; Buckner, I. S.; Velankar, S.; Munson, E. J.; Block, L. H. Relevance of Rheological Properties of Sodium Alginate in Solution to Calcium Alginate Gel Properties. *AAPS PharmSciTech* **2011**, *12* (2), 453–460. <https://doi.org/10.1208/s12249-011-9587-0>.
- (230) Jørgensen, T. E.; Sletmoen, M.; Draget, K. I.; Stokke, B. T. Influence of Oligoguluronates on Alginate Gelation, Kinetics, and Polymer Organization. *Biomacromolecules* **2007**, *8* (8), 2388–2397. <https://doi.org/10.1021/bm070208d>.
- (231) Augst, A. D.; Kong, H. J.; Mooney, D. J. Alginate Hydrogels as Biomaterials. *Macromol. Biosci.* **2006**, *6* (8), 623–633. <https://doi.org/10.1002/mabi.200600069>.
- (232) Al-Shamkhani, A.; Duncan, R. Radioiodination of Alginate via Covalently-Bound Tyrosinamide Allows Monitoring of Its Fate In Vivo. *J. Bioact. Compat. Polym.* **1995**, *10* (1), 4–13. <https://doi.org/10.1177/088391159501000102>.
- (233) Otterlei, M.; Ostgaard, K.; Skjåk-Braek, G.; Smidsrød, O.; Soon-Shiong, P.; Espevik, T. Induction of Cytokine Production from Human Monocytes Stimulated with Alginate. *J. Immunother. Off. J. Soc. Biol. Ther.* **1991**, *10* (4), 286–291.
- (234) Zimmermann, U.; Klöck, G.; Federlin, K.; Hannig, K.; Kowalski, M.; Bretzel, R. G.; Horcher, A.; Entenmann, H.; Sieber, U.; Zekorn, T. Production of Mitogen-Contamination Free Alginates with Variable Ratios of Mannuronic Acid to Guluronic Acid by Free Flow Electrophoresis. *Electrophoresis* **1992**, *13* (5), 269–274.
- (235) Biocompatibility of Microcapsules for Cell Immobilization Elaborated with Different Type of Alginates. *Biomaterials* **2002**, *23* (18), 3825–3831. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00118-7](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00118-7).
- (236) Lee, J.; Lee, K. Y. Local and Sustained Vascular Endothelial Growth Factor Delivery for Angiogenesis Using an Injectable System. *Pharm. Res.* **2009**, *26* (7), 1739–1744. <https://doi.org/10.1007/s11095-009-9884-4>.

- (237) Smidsrød, O.; Skjåk-Braek, G. Alginate as Immobilization Matrix for Cells. *Trends Biotechnol.* **1990**, *8* (3), 71–78.
- (238) Martinsen, A.; Skjåk-Braek, G.; Smidsrød, O. Alginate as Immobilization Material: I. Correlation between Chemical and Physical Properties of Alginate Gel Beads: ALGINATE AS IMMOBILIZATION MATERIAL. *Biotechnol. Bioeng.* **1989**, *33* (1), 79–89. <https://doi.org/10.1002/bit.260330111>.
- (239) Yang, J.-S.; Xie, Y.-J.; He, W. Research Progress on Chemical Modification of Alginate: A Review. *Carbohydr. Polym.* **2011**, *84* (1), 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.11.048>.
- (240) Gattás-Asfura, K. M.; Fraker, C. A.; Stabler, C. L. Covalent Stabilization of Alginate Hydrogel Beads via Staudinger Ligation: Assessment of Poly(Ethylene Glycol) and Alginate Cross-Linkers. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2011**, *99A* (1), 47–57. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.33162>.
- (241) Hall, K. K.; Gattás-Asfura, K. M.; Stabler, C. L. Microencapsulation of Islets within Alginate/Poly(Ethylene Glycol) Gels Cross-Linked via Staudinger Ligation. *Acta Biomater.* **2011**, *7* (2), 614–624. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.07.016>.
- (242) Mazumder, M. A. J.; Burke, N. A. D.; Shen, F.; Potter, M. A.; Stöver, H. D. H. Core-Cross-Linked Alginate Microcapsules for Cell Encapsulation. *Biomacromolecules* **2009**, *10* (6), 1365–1373. <https://doi.org/10.1021/bm801330j>.
- (243) Shen, F.; Mazumder, M. a. J.; Burke, N. a. D.; Stöver, H. D. H.; Potter, M. A. Mechanically Enhanced Microcapsules for Cellular Gene Therapy. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **2009**, *90B* (1), 350–361. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31292>.
- (244) Bidoret, A.; Martins, E.; De Smet, B. P.; Poncelet, D. Cell Microencapsulation: Dripping Methods. In *Cell Microencapsulation*; Opara, E. C., Ed.; Springer New York: New York, NY, 2017; Vol. 1479, pp 43–55. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6364-5_3.
- (245) Poncelet, D.; Tam, S. K. 3 Microencapsulation Technologies for a Bioartificial Endocrine Pancreas. 14.
- (246) Prüße, U. Bead Production with JetCutting and Rotating Disk/Nozzle Technologies. *Landbauforsch. Völkenrode* **2002**, 11.
- (247) Poncelet, D.; Neufeld, R. J.; Goosen, M. F. A.; Burgarski, B.; Babak, V. Formation of Microgel Beads by Electric Dispersion of Polymer Solutions. *AIChE J.* **1999**, *45* (9), 2018–2023. <https://doi.org/10.1002/aic.690450918>.
- (248) Manojlovic, V.; Djonlagic, J.; Obradovic, B.; Nedovic, V.; Bugarski, B. Immobilization of Cells by Electrostatic Droplet Generation: A Model System for Potential Application in Medicine. *Int. J. Nanomedicine* **2006**, *1* (2), 163–171.
- (249) Branko, B.; Li, Q.; Goosen, M.; Poncelet, D.; J. Neufeld, R.; Vunjak-Novakovic, G. Electrostatic Droplet Generation: Mechanism of Polymer Droplet Formation. *AIChE J.* **1994**, *40*, 1026–1031. <https://doi.org/10.1002/aic.690400613>.
- (250) Rayleigh, Lord. On The Instability Of Jets. *Proc. Lond. Math. Soc.* **1878**, *s1-10* (1), 4–13. <https://doi.org/10.1112/plms/s1-10.1.4>.
- (251) Prüße, U.; Dalluhn, J.; Breford, J.; Vorlop, K.-D. Production of Spherical Beads by JetCutting. *Chem. Eng. Technol.* **2000**, *23* (12), 1105–1110. [https://doi.org/10.1002/1521-4125\(200012\)23:12<1105::AID-CEAT1105>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/1521-4125(200012)23:12<1105::AID-CEAT1105>3.0.CO;2-V).
- (252) Schwinger, C.; Koch, S.; Jahnz, U.; Wittlich, P.; Rainov, N. G.; Kressler, J. High Throughput Encapsulation of Murine Fibroblasts in Alginate Using the JetCutter Technology. *J. Microencapsul.* **2002**, *19* (3), 273–280. <https://doi.org/10.1080/02652040110105328>.
- (253) *Handbook of Encapsulation and Controlled Release*; Mishra, M., Ed.; CRC Press, 2015. <https://doi.org/10.1201/b19038>.
- (254) Pruesse, U.; Vorlop, K. D. The JetCutter Technology. *Fundam. Cell Immobil. Biotechnol.* **2004**, 295–309.
- (255) Whitesides, G. M. The Origins and the Future of Microfluidics. *Nature* **2006**, *442* (7101), 368–373. <https://doi.org/10.1038/nature05058>.
- (256) Manz, A.; Harrison, D. J.; Verpoorte, E. M. J.; Fettingner, James. C.; Paulus, A.; Lüdi, H.; Widmer, H. M. Planar Chips Technology for Miniaturization and Integration of Separation

- Techniques into Monitoring Systems: Capillary Electrophoresis on a Chip. *J. Chromatogr. A* **1992**, 593 (1), 253–258. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(92\)80293-4](https://doi.org/10.1016/0021-9673(92)80293-4).
- (257) Microfluidics. *Wikipedia*; 2019.
- (258) Link, D. R.; Anna, S. L.; Weitz, D. A.; Stone, H. A. Geometrically Mediated Breakup of Drops in Microfluidic Devices. *Phys. Rev. Lett.* **2004**, 92 (5), 054503. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.92.054503>.
- (259) Anna, S. L.; Bontoux, N.; Stone, H. A. Formation of Dispersions Using “Flow Focusing” in Microchannels. *Appl. Phys. Lett.* **2003**, 82 (3), 364–366. <https://doi.org/10.1063/1.1537519>.
- (260) Thorsen, T.; Roberts, R. W.; Arnold, F. H.; Quake, S. R. Dynamic Pattern Formation in a Vesicle-Generating Microfluidic Device. *Phys. Rev. Lett.* **2001**, 86 (18), 4163–4166. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.86.4163>.
- (261) Liu, Z.-M.; Yang, Y.; Du, Y.; Pang, Y. Advances in Droplet-Based Microfluidic Technology and Its Applications. *Chin. J. Anal. Chem.* **2017**, 45 (2), 282–296. [https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(17\)60994-0](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(17)60994-0).
- (262) Gu, H.; Duits, M. H. G.; Mugele, F. Droplets Formation and Merging in Two-Phase Flow Microfluidics. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, 12 (4), 2572–2597. <https://doi.org/10.3390/ijms12042572>.
- (263) Zhu, P.; Wang, L. Passive and Active Droplet Generation with Microfluidics: A Review. *Lab. Chip* **2016**, 17 (1), 34–75. <https://doi.org/10.1039/C6LC01018K>.
- (264) Teh, S.-Y.; Lin, R.; Hung, L.-H.; Lee, A. P. Droplet Microfluidics. *Lab. Chip* **2008**, 8 (2), 198. <https://doi.org/10.1039/b715524g>.
- (265) Vladislavjević, G. T.; Khalid, N.; Neves, M. A.; Kuroiwa, T.; Nakajima, M.; Uemura, K.; Ichikawa, S.; Kobayashi, I. Industrial Lab-on-a-Chip: Design, Applications and Scale-up for Drug Discovery and Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, 65 (11), 1626–1663. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.07.017>.
- (266) Chen, J.-S.; Jiang, J.-H. Droplet Microfluidic Technology: Mirodroplets Formation and Manipulation. *Chin. J. Anal. Chem.* **2012**, 40 (8), 1293–1300. [https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(11\)60567-7](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(11)60567-7).
- (267) Lin, B.-C.; Su, Y.-C. On-Demand Liquid-in-Liquid Droplet Metering and Fusion Utilizing Pneumatically Actuated Membrane Valves. *J. Micromechanics Microengineering* **2008**, 18 (11), 115005. <https://doi.org/10.1088/0960-1317/18/11/115005>.
- (268) Lee, W. S.; Jambovane, S.; Kim, D.; Hong, J. W. Predictive Model on Micro Droplet Generation through Mechanical Cutting. *Microfluid. Nanofluidics* **2009**, 7 (3), 431. <https://doi.org/10.1007/s10404-009-0412-y>.
- (269) Yamanishi, Y.; Feng, L.; Arai, F. On-Demand and Size-Controlled Production of Emulsion Droplets by Magnetically Driven Microtool; 2010; pp 4094–4099. <https://doi.org/10.1109/ROBOT.2010.5509589>.
- (270) Murshed, S. M. S.; Tan, S. H.; Nguyen, N. T.; Wong, T. N.; Yobas, L. Microdroplet Formation of Water and Nanofluids in Heat-Induced Microfluidic T-Junction. *Microfluid. Nanofluidics* **2009**, 6 (2), 253–259. <https://doi.org/10.1007/s10404-008-0323-3>.
- (271) Steegmans, M. L. J.; Schroën, K. G. P. H.; Boom, R. M. Characterization of Emulsification at Flat Microchannel Y Junctions. *Langmuir* **2009**, 25 (6), 3396–3401. <https://doi.org/10.1021/la8035852>.
- (272) Steegmans, M. L. J.; Warmerdam, A.; Schroën, K. G. P. H.; Boom, R. M. Dynamic Interfacial Tension Measurements with Microfluidic Y-Junctions. *Langmuir* **2009**, 25 (17), 9751–9758. <https://doi.org/10.1021/la901103r>.
- (273) Hong, J.; Choi, M.; Edel, J. B.; deMello, A. J. Passive Self-Synchronized Two-Droplet Generation. *Lab. Chip* **2010**, 10 (20), 2702–2709. <https://doi.org/10.1039/C005136E>.
- (274) Liu, H.; Zhang, Y. Droplet Formation in Microfluidic Cross-Junctions. *Phys. Fluids* **2011**, 23 (8), 082101. <https://doi.org/10.1063/1.3615643>.
- (275) Hoa, P.-C.; Yap, Y.-F.; Nguyen, N.-T.; Chee-Kiong Chai, J. Thermally Mediated Droplet Formation at a Microfluidic T-Junction. *Micro Nanosyst.* **2011**, 3 (1), 65–75. <https://doi.org/10.2174/1876402911103010065>.

- (276) Cramer, C.; Fischer, P.; Windhab, E. J. Drop Formation in a Co-Flowing Ambient Fluid. *Chem. Eng. Sci.* **2004**, *59* (15), 3045–3058. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2004.04.006>.
- (277) Garstecki, P.; Gañán-Calvo, A.; M. Whitesides, G. Formation of Bubbles and Droplets in Microfluidic Systems. *Bull. Pol. Acad. Sci. Tech. Sci.* **2005**, *53*, 361. https://doi.org/10.1007/978-90-481-9029-4_9.
- (278) Lewis, P. C.; Graham, R. R.; Nie, Z.; Xu, S.; Seo, M.; Kumacheva, E. Continuous Synthesis of Copolymer Particles in Microfluidic Reactors. *Macromolecules* **2005**, *38* (10), 4536–4538. <https://doi.org/10.1021/ma050101n>.
- (279) Xu, Q.; Nakajima, M. The Generation of Highly Monodisperse Droplets through the Breakup of Hydrodynamically Focused Microthread in a Microfluidic Device. *Appl. Phys. Lett.* **2004**, *85* (17), 3726–3728. <https://doi.org/10.1063/1.1812380>.
- (280) Gañán-Calvo, A. M. Generation of Steady Liquid Microthreads and Micron-Sized Monodisperse Sprays in Gas Streams. *Phys. Rev. Lett.* **1998**, *80* (2), 285–288. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.80.285>.
- (281) Gañán-Calvo, A. M.; Gordillo, J. M. Perfectly Monodisperse Microbubbling by Capillary Flow Focusing. *Phys. Rev. Lett.* **2001**, *87* (27), 274501. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.87.274501>.
- (282) Schneider, T.; Chapman, G. H.; Häfeli, U. O. Effects of Chemical and Physical Parameters in the Generation of Microspheres by Hydrodynamic Flow Focusing. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2011**, *87* (2), 361–368. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.05.040>.
- (283) Takeuchi, S.; Garstecki, P.; Weibel, D. B.; Whitesides, G. M. An Axisymmetric Flow-Focusing Microfluidic Device. *Adv. Mater.* **2005**, *17* (8), 1067–1072. <https://doi.org/10.1002/adma.200401738>.
- (284) Anna, S. L.; Mayer, H. C. Microscale Tipstreaming in a Microfluidic Flow Focusing Device. *Phys. Fluids* **2006**, *18* (12), 121512. <https://doi.org/10.1063/1.2397023>.
- (285) Taylor Geoffrey Ingram. The Formation of Emulsions in Definable Fields of Flow. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. Contain. Pap. Math. Phys. Character* **1934**, *146* (858), 501–523. <https://doi.org/10.1098/rspa.1934.0169>.
- (286) Martz, T. D.; Bardin, D.; Sheeran, P. S.; Lee, A. P.; Dayton, P. A. Microfluidic Generation of Acoustically Active Nanodroplets. *Small Wein. Bergstr. Ger.* **2012**, *8* (12), 1876–1879. <https://doi.org/10.1002/sml.201102418>.
- (287) Jeong, W.-C.; Lim, J.-M.; Choi, J.-H.; Kim, J.-H.; Lee, Y.-J.; Kim, S.-H.; Lee, G.; Kim, J.-D.; Yi, G.-R.; Yang, S.-M. Controlled Generation of Submicron Emulsion Droplets via Highly Stable Tip-Streaming Mode in Microfluidic Devices. *Lab. Chip* **2012**, *12* (8), 1446–1453. <https://doi.org/10.1039/C2LC00018K>.
- (288) Suryo, R.; Basaran, O. A. Tip Streaming from a Liquid Drop Forming from a Tube in a Co-Flowing Outer Fluid. *Phys. Fluids* **2006**, *18* (8), 082102. <https://doi.org/10.1063/1.2335621>.
- (289) Gordillo, J.; Sevilla, A.; Campo-Cortés, F. Global Stability of Stretched Jets: Conditions for the Generation of Monodisperse Micro-Emulsions Using Coflows. *J. Fluid Mech.* **2013**, *738*. <https://doi.org/10.1017/jfm.2013.600>.
- (290) Basaran, O. A.; Suryo, R. Fluid Dynamics: The Invisible Jet. *Nat. Phys.* **3** (10), 679–680.
- (291) Castro-Hernández, E.; Campo-Cortés, F.; Gordillo, J. M. Slender-Body Theory for the Generation of Micrometre-Sized Emulsions through Tip Streaming. *J. Fluid Mech.* **2012**, *698*, 423–445. <https://doi.org/10.1017/jfm.2012.100>.
- (292) Shim, J.; Ranasinghe, R. T.; Smith, C. A.; Ibrahim, S. M.; Hollfelder, F.; Huck, W. T. S.; Klenerman, D.; Abell, C. Ultrarapid Generation of Femtoliter Microfluidic Droplets for Single-Molecule-Counting Immunoassays. *ACS Nano* **2013**, *7* (7), 5955–5964. <https://doi.org/10.1021/nn401661d>.
- (293) Tan, Y.-C.; Cristini, V.; Lee, A. P. Monodispersed Microfluidic Droplet Generation by Shear Focusing Microfluidic Device. *Sens. Actuators B Chem.* **2006**, *114* (1), 350–356. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2005.06.008>.

- (294) Zhang, H.; Tumarkin, E.; Sullan, R. M. A.; Walker, G. C.; Kumacheva, E. Exploring Microfluidic Routes to Microgels of Biological Polymers. *Macromol. Rapid Commun.* **2007**, *28* (5), 527–538. <https://doi.org/10.1002/marc.200600776>.
- (295) Tan, W.-H.; Takeuchi, S. Monodisperse Alginate Hydrogel Microbeads for Cell Encapsulation. *Adv. Mater.* **2007**, *19* (18), 2696–2701. <https://doi.org/10.1002/adma.200700433>.
- (296) Akbari, S.; Pirbodaghi, T. Microfluidic Encapsulation of Cells in Alginate Particles via an Improved Internal Gelation Approach. *Microfluid. Nanofluidics* **2014**, *16* (4), 773–777. <https://doi.org/10.1007/s10404-013-1264-z>.
- (297) Hong, J. S.; Shin, S.-J.; Lee, S.-H.; Wong, E. H.; Cooper-White, J. Spherical and Cylindrical Microencapsulation of Living Cells Using Microfluidic Devices. *Korea-Aust. Rheol. J.* **2007**, *19* (3), 157–164.
- (298) Shintaku, H.; Kuwabara, T.; Kawano, S.; Suzuki, T.; Kanno, I.; Kotera, H. Micro Cell Encapsulation and Its Hydrogel-Beads Production Using Microfluidic Device. *Microsyst. Technol.* **2007**, *13* (8–10), 951–958. <https://doi.org/10.1007/s00542-006-0291-z>.
- (299) Liu, K.; Ding, H.; Chen, Y.; Zhao, X.-Z. Droplet-Based Synthetic Method Using Microflow Focusing and Droplet Fusion. *Microfluid. Nanofluidics* **2007**, *3* (2), 239–243. <https://doi.org/10.1007/s10404-006-0121-8>.
- (300) Rondeau, E.; Cooper-White, J. J. Biopolymer Microparticle and Nanoparticle Formation within a Microfluidic Device. *Langmuir* **2008**, *24* (13), 6937–6945. <https://doi.org/10.1021/la703339u>.
- (301) Choi, C.-H.; Jung, J.-H.; Rhee, Y. W.; Kim, D.-P.; Shim, S.-E.; Lee, C.-S. Generation of Monodisperse Alginate Microbeads and in Situ Encapsulation of Cell in Microfluidic Device. *Biomed. Microdevices* **2007**, *9* (6), 855–862. <https://doi.org/10.1007/s10544-007-9098-7>.
- (302) Kim, C.; Lee, K. S.; Kim, Y. E.; Lee, K.-J.; Lee, S. H.; Kim, T. S.; Kang, J. Y. Rapid Exchange of Oil-Phase in Microencapsulation Chip to Enhance Cell Viability. *Lab. Chip* **2009**, *9* (9), 1294. <https://doi.org/10.1039/b819044e>.
- (303) Kim, C.; Chung, S.; Kim, Y. E.; Lee, K. S.; Lee, S. H.; Oh, K. W.; Kang, J. Y. Generation of Core-Shell Microcapsules with Three-Dimensional Focusing Device for Efficient Formation of Cell Spheroid. *Lab Chip* **2011**, *11* (2), 246–252. <https://doi.org/10.1039/C0LC00036A>.
- (304) Lee, D.-H.; Lee, W.; Um, E.; Park, J.-K. On-Chip Gelation of Temporally Controlled Alginate Microdroplets. In *2011 16th International Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems Conference*; IEEE: Beijing, China, 2011; pp 234–237. <https://doi.org/10.1109/TRANSDUCERS.2011.5969413>.
- (305) Passemard, S.; Staedler, D.; Učňová, L.; Schneiter, G. S.; Kong, P.; Bonacina, L.; Juillerat-Jeanneret, L.; Gerber-Lemaire, S. Convenient Synthesis of Heterobifunctional Poly(Ethylene Glycol) Suitable for the Functionalization of Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23* (17), 5006–5010. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.06.037>.
- (306) Passemard, S.; Szabó, L.; Noverraz, F.; Montanari, E.; Gonelle-Gispert, C.; Bühler, L. H.; Wandrey, C.; Gerber-Lemaire, S. Synthesis Strategies to Extend the Variety of Alginate-Based Hybrid Hydrogels for Cell Microencapsulation. *Biomacromolecules* **2017**, *18* (9), 2747–2755. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b00665>.
- (307) Szabó, L.; Gonelle-Gispert, C.; Montanari, E.; Noverraz, F.; Bornet, A.; Bühler, L. H.; Gerber-Lemaire, S. Cross-Reactive Alginate Derivatives for the Production of Dual Ionic-Covalent Hydrogel Microspheres Presenting Tunable Properties for Cell Microencapsulation. *ACS Appl. Polym. Mater.* **2019**, *1* (6), 1326–1333. <https://doi.org/10.1021/acsapm.9b00139>.
- (308) Noverraz, F.; Montanari, E.; Pimenta, J.; Szabó, L.; Ortiz, D.; Gonelle-Gispert, C.; Bühler, L. H.; Gerber-Lemaire, S. Antifibrotic Effect of Ketoprofen-Grafted Alginate Microcapsules in the Transplantation of Insulin Producing Cells. *Bioconjug. Chem.* **2018**, *29* (6), 1932–1941. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00190>.
- (309) Bjørnøy, S. H.; Mandaric, S.; Bassett, D. C.; Åslund, A. K. O.; Ucar, S.; Andreassen, J.-P.; Strand, B. L.; Sikorski, P. Gelling Kinetics and in Situ Mineralization of Alginate Hydrogels:

- A Correlative Spatiotemporal Characterization Toolbox. *Acta Biomater.* **2016**, *44*, 243–253. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.07.046>.
- (310) Basics of rheology:: Anton Paar Wiki <https://wiki.anton-paar.com/en/basics-of-rheology/> (accessed Sep 16, 2019).
- (311) Husny, J.; Cooper-White, J. J. The Effect of Elasticity on Drop Creation in T-Shaped Microchannels. *J. Non-Newton. Fluid Mech.* **2006**, *137* (1–3), 121–136. <https://doi.org/10.1016/j.jnnfm.2006.03.007>.
- (312) Qiu, D.; Silva, L.; Tonkovich, A. L.; Arora, R. Micro-Droplet Formation in Non-Newtonian Fluid in a Microchannel. *Microfluid. Nanofluidics* **2010**, *8* (4), 531–548. <https://doi.org/10.1007/s10404-009-0487-5>.
- (313) Tirtaatmadja, V.; McKinley, G. H.; Cooper-White, J. J. Drop Formation and Breakup of Low Viscosity Elastic Fluids: Effects of Molecular Weight and Concentration. *Phys. Fluids* **2006**, *18* (4), 043101. <https://doi.org/10.1063/1.2190469>.
- (314) Arratia, P. E.; Cramer, L.-A.; Gollub, J. P.; Durian, D. J. The Effects of Polymer Molecular Weight on Filament Thinning and Drop Breakup in Microchannels. *New J. Phys.* **2009**, *11* (11), 115006. <https://doi.org/10.1088/1367-2630/11/11/115006>.
- (315) Gu, Z. Experimental and Theoretical Study of Droplet Formation at a T-Junction with Xanthan Gum Solutions, University of New South Wales, 2013.
- (316) Wong, V.-L.; Loizou, K.; Lau, P.-L.; Graham, R. S.; Hewakandamby, B. Non-Newtonian Effects on Droplet Breakup Dynamics in a T-Junction Microfluidic Channel; Melbourne, Victoria, 2015.
- (317) Wong, V.-L.; Loizou, K.; Lau, P.-L.; Graham, R. S.; Hewakandamby, B. N. Numerical Simulation of the Effect of Rheological Parameters on Shear-Thinning Droplet Formation. In *Volume 2, Fora: Cavitation and Multiphase Flow; Fluid Measurements and Instrumentation; Microfluidics; Multiphase Flows: Work in Progress; Fluid-Particle Interactions in Turbulence*; American Society of Mechanical Engineers: Chicago, Illinois, USA, 2014; p V002T19A002. <https://doi.org/10.1115/FEDSM2014-21363>.
- (318) Ma, J.; Lin, Y.; Chen, X.; Zhao, B.; Zhang, J. Flow Behavior, Thixotropy and Dynamical Viscoelasticity of Sodium Alginate Aqueous Solutions. *Food Hydrocoll.* **2014**, *38*, 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.11.016>.
- (319) Gómez-Díaz, D.; Navaza, J. M. Rheology of Aqueous Solutions of Food Additives: Effect of Concentration, Temperature and Blending. *J. Food Eng.* **2003**, *56* (4), 387–392. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(02\)00211-X](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(02)00211-X).
- (320) Marcotte, M.; Taherian Hoshahili, A. R.; Ramaswamy, H. S. Rheological Properties of Selected Hydrocolloids as a Function of Concentration and Temperature. *Food Res. Int.* **2001**, *34* (8), 695–703. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(01\)00091-6](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00091-6).
- (321) Jabbarzadeh, A.; Atkinson, J. D.; Tanner, R. I. Effect of Molecular Shape on Rheological Properties in Molecular Dynamics Simulation of Star, H, Comb, and Linear Polymer Melts. *Macromolecules* **2003**, *36* (13), 5020–5031. <https://doi.org/10.1021/ma025782q>.
- (322) Kim, J. M.; Baig, C. Communication: Role of Short Chain Branching in Polymer Structure and Dynamics. *J. Chem. Phys.* **2016**, *144* (8), 081101. <https://doi.org/10.1063/1.4942351>.
- (323) Tsamopoulos, A. J.; Katsarou, A. F.; Tsalikis, D. G.; Mavrantzas, V. G. Shear Rheology of Unentangled and Marginally Entangled Ring Polymer Melts from Large-Scale Nonequilibrium Molecular Dynamics Simulations. *Polymers* **2019**, *11* (7). <https://doi.org/10.3390/polym11071194>.
- (324) García-Franco, C. A.; Harrington, B. A.; Lohse, D. J. Effect of Short-Chain Branching on the Rheology of Polyolefins. *Macromolecules* **2006**, *39* (7), 2710–2717. <https://doi.org/10.1021/ma052581o>.
- (325) Gotsis, A. D.; Zeevenhoven, B. L. F.; Tsenoglou, C. Effect of Long Branches on the Rheology of Polypropylene. *J. Rheol.* **2004**, *48* (4), 895–914. <https://doi.org/10.1122/1.1764823>.
- (326) Combs, R. L.; Slonaker, D. F.; Coover, H. W. Effects of Molecular Weight Distribution and Branching on Rheological Properties of Polyolefin Melts. *J. Appl. Polym. Sci.* **1969**, *13* (3), 519–534. <https://doi.org/10.1002/app.1969.070130312>.

- (327) Stadler, F. J.; Mahmoudi, T. Understanding the Effect of Short-Chain Branches by Analyzing Viscosity Functions of Linear and Short-Chain Branched Polyethylenes. *Korea-Aust. Rheol. J.* **2011**, *23* (4), 185–193. <https://doi.org/10.1007/s13367-011-0023-5>.
- (328) Verani, M. Effects of Polymer Concentration and Molecular Weight on the Dynamics of Visco-Elasto-Capillary Breakup.
- (329) Lisy; Tothova; Zatoovsky. The Joint Rouse-Zimm Theory of the Dynamics of Polymers in Dilute Solutions. *Condens. Matter Phys.* **2006**, *9* (1), 95. <https://doi.org/10.5488/CMP.9.1.95>.
- (330) Amarouchene, Y. Etude de l'Interaction Polymère-Ecoulement, 2002.
- (331) Christopher, G. F.; Anna, S. L. Microfluidic Methods for Generating Continuous Droplet Streams. *J. Phys. Appl. Phys.* **2007**, *40* (19), R319–R336. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/40/19/R01>.
- (332) Nunes, J. K.; Tsai, S. S. H.; Wan, J.; Stone, H. A. Dripping and Jetting in Microfluidic Multiphase Flows Applied to Particle and Fiber Synthesis. *J. Phys. Appl. Phys.* **2013**, *46* (11). <https://doi.org/10.1088/0022-3727/46/11/114002>.
- (333) Lee, W.; Walker, L. M.; Anna, S. L. Role of Geometry and Fluid Properties in Droplet and Thread Formation Processes in Planar Flow Focusing. *Phys. Fluids* **2009**, *21* (3), 032103. <https://doi.org/10.1063/1.3081407>.
- (334) Nie, Z.; Seo, M.; Xu, S.; Lewis, P. C.; Mok, M.; Kumacheva, E.; Whitesides, G. M.; Garstecki, P.; Stone, H. A. Emulsification in a Microfluidic Flow-Focusing Device: Effect of the Viscosities of the Liquids. *Microfluid. Nanofluidics* **2008**, *5* (5), 585–594. <https://doi.org/10.1007/s10404-008-0271-y>.
- (335) Zhao, C.-X.; Middelberg, A. P. J. Two-Phase Microfluidic Flows. *Chem. Eng. Sci.* **2011**, *66* (7), 1394–1411. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2010.08.038>.
- (336) Wu, P.; Luo, Z.; Liu, Z.; Li, Z.; Chen, C.; Feng, L.; He, L. Drag-Induced Breakup Mechanism for Droplet Generation in Dripping within Flow Focusing Microfluidics. *Chin. J. Chem. Eng.* **2015**, *23* (1), 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2014.09.043>.
- (337) Dietrich, N.; Poncin, S.; Li, H. Z. Dynamical Deformation of a Flat Liquid–Liquid Interface. *Exp. Fluids* **2011**, *50* (5), 1293–1303. <https://doi.org/10.1007/s00348-010-0989-7>.
- (338) Chen, J.-D.; Hahn, P. S.; Slattery, J. C. Coalescence Time for a Small Drop or Bubble at a Fluid–Fluid Interface. *AIChE J.* **1984**, *30* (4), 622–630. <https://doi.org/10.1002/aic.690300413>.
- (339) Kemih, M.; Olmos, E.; Fei, W.; Poncin, S.; Li, H. Z. Passage of a Gas Bubble through a Liquid–Liquid Interface. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2007**, *46* (19), 6099–6104. <https://doi.org/10.1021/ie061549v>.
- (340) Lin, C.-Y.; Slattery, J. C. Thinning of a Liquid Film as a Small Drop or Bubble Approaches a Fluid–Fluid Interface. *AIChE J.* **1982**, *28* (5), 786–792. <https://doi.org/10.1002/aic.690280513>.
- (341) Charles, G. E.; Mason, S. G. The Coalescence of Liquid Drops with Flat Liquid/Liquid Interfaces. *J. Colloid Sci.* **1960**, *15* (3), 236–267. [https://doi.org/10.1016/0095-8522\(60\)90026-X](https://doi.org/10.1016/0095-8522(60)90026-X).
- (342) Hartland, S. The Approach of a Rigid Sphere to a Deformable Liquid/Liquid Interface. *J. Colloid Interface Sci.* **1968**, *26* (4), 383–394. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(68\)90285-3](https://doi.org/10.1016/0021-9797(68)90285-3).
- (343) Chan, D. Y. C.; Klaseboer, E.; Manica, R. Film Drainage and Coalescence between Deformable Drops and Bubbles. *Soft Matter* **2011**, *7* (6), 2235–2264. <https://doi.org/10.1039/C0SM00812E>.
- (344) Gourdon, C.; Casamatta, G. Influence of Mass Transfer Direction on the Operation of a Pulsed Sieve-Plate Pilot Column. *Chem. Eng. Sci.* **1991**, *46* (11), 2799–2808. [https://doi.org/10.1016/0009-2509\(91\)85149-R](https://doi.org/10.1016/0009-2509(91)85149-R).
- (345) Chen, D.; Pu, B. Studies on the Binary Coalescence Model: II. Effects of Drops Size and Interfacial Tension on Binary Coalescence Time. *J. Colloid Interface Sci.* **2001**, *243* (2), 433–443. <https://doi.org/10.1006/jcis.2001.7817>.

- (346) Lang, S. B.; Wilke, C. R. A Hydrodynamic Mechanism for the Coalescence of Liquid Drops. II. Experimental Studies. *Ind. Eng. Chem. Fundam.* **1971**, *10* (3), 341–352. <https://doi.org/10.1021/i160039a002>.
- (347) Stevens, G. W.; Pratt, H. R. C.; Tai, D. R. Droplet Coalescence in Aqueous Electrolyte Solutions. *J. Colloid Interface Sci.* **1990**, *136* (2), 470–479. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(90\)90394-4](https://doi.org/10.1016/0021-9797(90)90394-4).
- (348) Dickinson, E.; Murray, B. S.; Stainsby, G. Coalescence Stability of Emulsion-Sized Droplets at a Planar Oil–Water Interface and the Relationship to Protein Film Surface Rheology. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1 Phys. Chem. Condens. Phases* **1988**, *84* (3), 871. <https://doi.org/10.1039/f19888400871>.
- (349) Ivanov, I. B.; Kralchevsky, P. A. Stability of Emulsions under Equilibrium and Dynamic Conditions. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **1997**, *128* (1), 155–175. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(96\)03903-9](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(96)03903-9).
- (350) Ivanov, I. B.; Danov, K. D.; Kralchevsky, P. A. Flocculation and Coalescence of Micron-Size Emulsion Droplets. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **1999**, *152* (1), 161–182. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(98\)00620-7](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(98)00620-7).
- (351) Basheva, E. S.; Gurkov, T. D.; Ivanov, I. B.; Bantchev, G. B.; Campbell, B.; Borwankar, R. P. Size Dependence of the Stability of Emulsion Drops Pressed against a Large Interface. *Langmuir* **1999**, *15* (20), 6764–6769. <https://doi.org/10.1021/la990186j>.
- (352) Kamp, J.; Villwock, J.; Kraume, M. Drop Coalescence in Technical Liquid/Liquid Applications: A Review on Experimental Techniques and Modeling Approaches. *Rev. Chem. Eng.* **2017**, *33* (1), 1–47. <https://doi.org/10.1515/revce-2015-0071>.
- (353) Verdier, C.; Brizard, M. Understanding Droplet Coalescence and Its Use to Estimate Interfacial Tension. *Rheol. Acta* **2002**, *41* (6), 514–523. <https://doi.org/10.1007/s00397-002-0249-8>.
- (354) Propriétés physiques et chimiques <https://lotuus-95.websself.net/a-propos> (accessed Sep 27, 2019).
- (355) Shi, Y.; Tang, G. H.; Xia, H. H. Lattice Boltzmann Simulation of Droplet Formation in T-Junction and Flow Focusing Devices. *Comput. Fluids* **2014**, *90*, 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.compfluid.2013.11.025>.
- (356) Cubaud, T.; Mason, T. G. Capillary Threads and Viscous Droplets in Square Microchannels. *Phys. Fluids* **2008**, *20* (5), 053302. <https://doi.org/10.1063/1.2911716>.
- (357) Nie, Z.; Xu, S.; Seo, M.; Lewis, P. C.; Kumacheva, E. Polymer Particles with Various Shapes and Morphologies Produced in Continuous Microfluidic Reactors. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (22), 8058–8063. <https://doi.org/10.1021/ja042494w>.
- (358) Zhou, C.; Yue, P.; Feng, J. J. Formation of Simple and Compound Drops in Microfluidic Devices. *Phys. Fluids* **2006**, *18* (9), 092105. <https://doi.org/10.1063/1.2353116>.
- (359) Steinhaus, B.; Shen, A. Q.; Sureshkumar, R. Dynamics of Viscoelastic Fluid Filaments in Microfluidic Devices. *Phys. Fluids* **2007**, *19* (7), 073103. <https://doi.org/10.1063/1.2747660>.
- (360) Arratia, P. E.; Gollub, J. P.; Durian, D. J. Polymeric Filament Thinning and Breakup in Microchannels. *Phys. Rev. E* **2008**, *77* (3), 036309. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.77.036309>.
- (361) Blaeser, A.; Duarte Campos, D. F.; Puster, U.; Richtering, W.; Stevens, M. M.; Fischer, H. Controlling Shear Stress in 3D Bioprinting Is a Key Factor to Balance Printing Resolution and Stem Cell Integrity. *Adv. Healthc. Mater.* **2016**, *5* (3), 326–333. <https://doi.org/10.1002/adhm.201500677>.
- (362) Ning, L.; Betancourt, N.; Schreyer, D. J.; Chen, X. Characterization of Cell Damage and Proliferative Ability during and after Bioprinting. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2018**, *4* (11), 3906–3918. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.8b00714>.
- (363) Liu, M.; Su, L.; Li, J.; Chen, S.; Liu, Y.; Li, J.; Li, B.; Chen, Y.; Zhang, Z. Investigation of Spherical and Concentric Mechanism of Compound Droplets. *Matter Radiat. Extrem.* **2016**, *1* (4), 213–223. <https://doi.org/10.1016/j.mre.2016.07.002>.

- (364) Desai, T. A.; West, T.; Cohen, M.; Boiarski, T.; Rampersaud, A. Nanoporous Microsystems for Islet Cell Replacement. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, *13*.
- (365) Trivedi, N.; Steil, G. M.; Colton, C. K.; Bonner-Weir, S.; Weir, G. C. Improved Vascularization of Planar Membrane Diffusion Devices Following Continuous Infusion of Vascular Endothelial Growth Factor. *Cell Transplant.* **2000**, *9* (1), 115–124. <https://doi.org/10.1177/096368970000900114>.
- (366) Lanza, R. P.; Kühtreiber, W. M.; Ecker, D.; Staruk, J. E.; Chick, W. L. Xenotransplantation of Porcine and Bovine Islets without Immunosuppression Using Uncoated Alginate Microspheres. *Transplantation* **1995**, *59* (10), 1377–1384. <https://doi.org/10.1097/00007890-199505270-00003>.
- (367) Lin, C.-C.; Boyer, P. D.; Aimetti, A. A.; Anseth, K. S. Regulating MCP-1 Diffusion in Affinity Hydrogels for Enhancing Immuno-Isolation. *J. Controlled Release* **2010**, *142* (3), 384–391. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.11.022>.
- (368) Su, J.; Hu, B.-H.; Lowe, W. L.; Kaufman, D. B.; Messersmith, P. B. Anti-Inflammatory Peptide-Functionalized Hydrogels for Insulin-Secreting Cell Encapsulation. *Biomaterials* **2010**, *31* (2), 308–314. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.045>.
- (369) Strand, B. L.; Coron, A. E.; Skjak-Braek, G. Current and Future Perspectives on Alginate Encapsulated Pancreatic Islet. *Stem Cells Transl. Med.* **2017**, *6* (4), 1053–1058. <https://doi.org/10.1002/sctm.16-0116>.
- (370) O’Sullivan, E. S.; Vegas, A.; Anderson, D. G.; Weir, G. C. Islets Transplanted in Immunoisolation Devices: A Review of the Progress and the Challenges That Remain. *Endocr. Rev.* **2011**, *32* (6), 827–844. <https://doi.org/10.1210/er.2010-0026>.
- (371) Qi, M.; Mørch, Y.; Lacík, I.; Formo, K.; Marchese, E.; Wang, Y.; Danielson, K. K.; Kinzer, K.; Wang, S.; Barbaro, B.; et al. Survival of Human Islets in Microbeads Containing High Gyluronic Acid Alginate Cross-Linked with Ca²⁺ and Ba²⁺. *Xenotransplantation* **2012**, *19* (6), 355–364. <https://doi.org/10.1111/xen.12009>.
- (372) Duvivier-Kali, V. F.; Omer, A.; Lopez-Avalos, M. D.; O’Neil, J. J.; Weir, G. C. Survival of Microencapsulated Adult Pig Islets in Mice In Spite of an Antibody Response. *Am. J. Transplant.* **2004**, *4* (12), 1991–2000. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2004.00628.x>.
- (373) Mahou, R.; Borcard, F.; Crivelli, V.; Montanari, E.; Passemard, S.; Noverraz, F.; Gerber-Lemaire, S.; Bühler, L.; Wandrey, C. Tuning the Properties of Hydrogel Microspheres by Adding Chemical Cross-Linking Functionality to Sodium Alginate. *Chem. Mater.* **2015**, *27* (12), 4380–4389. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.5b01098>.