

FACULTE DES SCIENCES
Département de Chimie
Laboratoire de Chimie des Matériaux Inorganiques (C.M.I.)

Encapsulation de cellules animales au sein de billes inorganiques poreuses minéralisées : vers la création d'organes artificiels

- Version finale -

Dissertation présentée par

Philippe DANDOY

en vue de l'obtention du grade
de Docteur en Sciences Chimiques

Composition du Jury :

Prof. Carmela Aprile (Présidente du jury, FUNDP, Namur)
Prof. Alain Krief (FUNDP, Namur)
Dr. Alexandre Léonard (ULg, Liège)
Dr. Christophe Meunier (FUNDP, Namur)
Prof. Johan Wouters (FUNDP, Namur)
Prof. Carine Michiels (Co-promotrice, FUNDP, Namur)
Prof. Bao-Lian Su (Promoteur, FUNDP, Namur)

Mai 2011

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix (FUNDP)
FACULTES DES SCIENCES
Rue de Bruxelles, 61
5000 Namur

**Encapsulation de cellules animales au sein de billes inorganiques
poreuses minéralisées : vers la création d'organes artificiels**

Philippe Dandoy

Le désir d'élaborer de nouveaux traitements face aux maladies non-infectieuses comme le diabète pousse la médecine moderne à se tourner vers les nouvelles technologies. La greffe d'organe étant aussi contraignante que l'insulinothérapie, la création d'organes artificiels pour suppléer un jour les organes déficients fait partie des rêves les plus convoités berçant l'imagination du praticien.

Si la transplantation de cellules est une solution envisageable et déjà couronnée d'un certain succès, ce traitement n'a malheureusement que peu d'efficacité à long terme et impose de développer une méthode qui permettrait de protéger les nouvelles cellules du rejet sans recourir à la prise de médicaments immunosuppresseurs.

Devant les progrès obtenus pour l'immobilisation d'entités biologiques comme les bactéries, les levures ou les cellules végétales, celle de cellules animales est une nouvelle voie pour le traitement de pathologies causées par un dysfonctionnement de l'organisme. En l'occurrence, un diabétique de type 1 chez qui des cellules β immobilisées dans un matériau poreux, biocompatible et robuste lui seraient implantées, pourrait être traité par cette technologie et avoir son quotidien grandement soulagé.

L'objectif de cette thèse fut de créer ce matériau, substitut d'un organe déficient pour nourrir les nouveaux espoirs sur lesquels se fonde la thérapie cellulaire. Les travaux correspondants à la conception d'une matrice qui pourra à terme servir de modèle pour la création d'un organe artificiel sont détaillés dans ce manuscrit. A l'aide de multiples techniques, les matrices ont été caractérisées pour mettre en évidence leurs propriétés ainsi que leur faculté à accueillir des cellules animales, tout en montrant le maintien de la viabilité cellulaire après plusieurs semaines.

La matrice la plus aboutie ayant été jusqu'à faire l'objet d'études *in vivo* pour évaluer sa biocompatibilité dans un organisme et pointer la présence d'une éventuelle réponse inflammatoire consécutive à son implantation sous-cutanée chez des animaux de laboratoire.

Au terme de ces recherches, nous sommes parvenus à synthétiser un matériau robuste et biocompatible dont le diamètre poreux se rapproche des critères requis pour l'immuno-isolation des cellules et n'ayant pas provoqué de désordre dans les tissus conjonctifs des animaux opérés au cours du mois que dura l'expérience *in vivo*.

Dissertation présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences
Mai 2011

Promoteur : Prof. Bao-Lian Su
Co-promotrice : Prof. Carine Michiels

The University of Namur (FUNDP)
FACULTY OF SCIENCE
Rue de Bruxelles, 61
B-5000 Namur

**Animal cells within biocompatible hybrid beads:
towards the design of “artificial organs”**

Philippe Dandoy

The desire to find new treatments against non-infectious diseases like diabetes leads modern medicine to look towards emerging technologies. Current solutions to treat diabetes, such as organ graft and insulin therapy, present major drawbacks, thus when considering the limited supply of live organs for transplantation, the development of artificial organs to replace deficient ones becomes a principle goal for clinicians.

Cell transplants are an adequate solution and have already proved to be successful. However, this method only offers short time relief. This drives the need to develop a method where cells are protected against rejection without the continual use of immunosuppressive drugs.

Considering the progress in biological entities immobilisation from bacteria, yeasts and plant cells, animal cell immobilisation shows great potential in the treatment of pathological disorders. For example a type 1 diabetic patient could be offered an implant comprised of live beta-cells immobilised within a porous, biocompatible and robust material, which could improve their day-to-day life.

The aim of this project was to create a hybrid material which could act as a surrogate organ in place of the deficient one, offering new hope in the domain of cell therapy. In this thesis, research on the design of an artificial organ and the materials developed are described. With the aid of a suite of techniques, these matrices have been characterised to outline their properties and highlight their affinity with animal cells. Results show that cells were alive several weeks post-immobilisation.

In vivo experiments using the most promising matrix were performed to study the integration of hybrid beads within a whole body, highlighting that very low to no inflammatory response in laboratory animals was caused by the subcutaneous implant.

Final results suggest that an appropriate material, which was both robust and biocompatible, was successfully synthesised with a porous diameter fulfilling the requirements for cell immuno-isolation. Moreover, it did not provoke inflammation in the connective tissues surrounding the implant during the one-month *in vivo* study.

Thesis submitted for the Degree of Doctor of Philosophy (Ph.D.)
May 2011

Supervisor: Prof. Bao-Lian Su
Co-supervisor : Prof. Carine Michiels

Remerciements

J'aime m'entourer de personnes et je suis ravi d'avoir pu en rencontrer autant et travailler en harmonie avec elles au cours de cette thèse. Il y en aura sûrement d'oubliés... n'en soyez pas vexés !

Je tiens à remercier Bao-Lian Su pour m'avoir accueilli dans son laboratoire avec Isabelle, permis d'effectuer mon mémoire et proposé de rester pour poursuivre une thèse à ses côtés. Ce fut un plaisir d'être encadré par Carine Michiels, avec qui chaque discussion dans son bureau fut très instructive et décontractée où le dialogue était bien établi ce qui m'a souvent revigoré quand je m'égarais, je suis ravi d'avoir pu apprendre de vous. Ce fut un grand soulagement d'avoir pu continuellement compter sur vous et sur vos contributions à mes recherches.

Parmi les membres du C.M.I., il y en a qui ont largement contribué à ce que l'ambiance donne le goût du travail et d'autres qui officièrent plutôt comme un frein, mais tout ça ensemble fait le quotidien d'un laboratoire et j'y ai passé d'excellents moments, tant relationnels que scientifiques. Le laboratoire a toujours compté beaucoup de chercheurs et il n'est pas évident de les citer tous. J'aurai donc une première pensée envers les anciens, Claire, Noan et Sam principalement, les presque-anciens que sont Timothée, Arnaud et Alex, et les toujours présents Emeric, Bignole, John, Joanna, LiHua et Christophe. Un petit mot pour mes mémorants, Charline et Jérémie, qui ont dû souffrir de mon absence pendant mon séjour en Chine, mais qui ont essayé de contribuer à ce type de recherche bien spécifique aux croisées de la chimie, de la biologie et de la médecine.

Qui serais-je si je ne saluais les filles de l'URPhyM. Merci pour toute l'aide que vous m'avez apportée et votre accueil dans votre laboratoire ! Nathalie, Isa, Laetitia, Virginie, Lucie et Vanessa, merci.

Les membres de l'URBC qui ont toujours eu la courtoisie de m'expliquer l'une ou l'autre manip quotidiennement effectuées dans le labo et de me réapprovisionner en cellules le cas échéant. Lionel, Manu, Audrey, Seb, Guillaume, merci.

Daniel pour son œil et sa pédagogie qui m'ont permis de mieux saisir l'art de la coloration des tissus et l'histologie en général, merci pour la passion dont tu as fait preuve.

Vient le moment des extérieurs aux FUNDP... et là, c'est encore plus difficile de se remémorer tous ceux qui se sont montrés intéressés par le but final de cette recherche. Certes, déballer le titre du projet en a fait reculer plus d'un, mais après explications, tout le monde en saisisait les enjeux. A commencer par les amis, les vrais, ceux qui sont et seront toujours là : Ben et Sylvie, qui n'ont jamais manqué d'attention et d'écoute. Yacine s'ajoute pleinement à vous. Heureusement que le tennis était là pour me permettre de changer de monde et de rafraîchir mes idées ! [Je vais pas remercier Sampras quand même ?! si ?? Il est antérieur à la thèse, mais bon, qui va lire jusqu'ici toute façon ? La plupart du temps les gens cherchent leur nom et ça s'arrête là.]

Gil, Big Ben, Karma, Greg, Cora autant de membres de VV qui, sans y toucher, me souhaitaient le meilleur dans mes recherches, surtout avant les camps où il y avait ces terribles rapports à clôturer.

La famille dans tout ça ! Qu'est-ce que mes parents n'ont pas fait pour me rendre la vie plus facile ?! Cette phrase résume à elle seule l'idée de tout l'investissement et les sacrifices qu'ils ont faits pendant ces 4 ans, mais depuis toujours également. Merci, merci beaucoup ! Merci des coups de pouce de mon frère quand il a fallu améliorer le graphisme de certaines images, ça donne très bien dans les articles de journaux. Bravo !

Enfin, *last but not least* : Charlotte ! Tu n'as dû supporter cette thèse que pendant 2 ans, ce n'est rien en prévision du nombre d'années qui nous attendent encore. Encouragements, soutiens, commentaires, aides, conseils, compréhension, complaisance... bref un aperçu de l'avenir. Merci de me pousser et d'améliorer mon quotidien.

Merci à vous tous, ce fut une grande aventure !

Table des matières

1	Introduction générale	
1.1	Préambule	1
1.2	Le diabète	2
1.2.1	Le pancréas	5
1.2.2	L'insuline	7
1.2.3	Les différentes formes du diabète	10
1.2.4	Les complications liées au diabète	11
1.2.5	Les traitements	12
1.2.5.1	L'insulinothérapie	12
1.2.5.2	Les alternatives à la prise d'insuline	15
1.3	Elaboration d'un pancréas artificiel	18
1.3.1	Les différents types d'immobilisation	20
1.3.2	L'immobilisation <i>in situ</i>	23
1.3.2.1	Le procédé sol-gel	23
1.3.2.2	Le procédé Biosil	26
1.3.2.3	Le freeze-casting	27
2	Objectifs et stratégie de réalisation	
2.1	Objectifs de la thèse	29
2.2	Stratégie scientifique	30
2.2.1	La cellule-modèle : la cellule HepG2	31
2.2.2	Choix des matrices	32
2.2.3	Voie de synthèse	32

3	Techniques de caractérisation employées au cours de cette thèse	
3.1	Caractérisation des précurseurs de silice	35
3.2	Caractérisation multi-techniques des matériaux synthétisés	36
3.2.1	Le séchage par CO ₂ supercritique	36
3.2.2	L'analyse par adsorption-désorption d'azote (BET)	37
3.2.3	La microscopie électronique à balayage (MEB)	38
3.2.4	La spectrofluorimétrie	38
3.3	Caractérisation biologique des matériaux « vivants »	40
3.3.1	L'oxymétrie	40
3.3.2	La microscopie à fluorescence	40
3.4	Le test ELISA	41
4	Conception d'une matrice adaptée à l'immobilisation de cellules animales	
4.1	Culture cellulaire et préparation des cellules pour l'immobilisation	44
4.2	Test de cytotoxicité des produits présents dans le sol	46
4.2.1	Choix des composés à tester	47
4.2.2	Principe et élaboration du test de cytotoxicité	49
4.2.3	Cytotoxicité des composés	49
4.3	Synthèse d'une matrice silicée	51
4.3.1	Vers une voie biocompatible	52
4.3.1.1	Le diglycérylsilane	52
4.3.1.2	Le dibutylsilane	53
4.3.2	Vers une voie aqueuse	54
4.4	Caractérisation des gels de silice	55
4.4.1	La porosité	55
4.4.1.1	L'analyse par adsorption-désorption d'azote	56
4.4.1.2	La microscopie électronique à balayage	58
4.4.2	Viabilité des cellules HepG2 immobilisées dans des gels de silice	58

4.5	Conception d'une capsule d'alginate	59
4.5.1	L'alginate de sodium	59
4.5.2	Pré-encapsulation des cellules dans l'alginate	61
4.5.2.1	Purification de l'alginate	61
4.5.2.2	Obtention d'une capsule d'alginate	62
4.5.2.3	Caractérisation des capsules d'alginate	63
4.5.2.4	Viabilité des cellules HepG2 immobilisées dans les capsules d'alginate	67
4.6	Conception de billes hybrides alginate-silice/alginate	69
5	Etudes des réactions <i>in vivo</i> engendrées par les matrices	
5.1	Essais à la Wuhan University of Technology (WUT)	99
5.2	Etude <i>in vivo</i> de la bille alginate-silice/alginate	101
6	Conclusions générales & Perspectives	122
	Annexes	
	Annexe A : Les matériaux sol-gel	128
	Annexe B : L'adsorption-désorption d'azote (BET)	131
	Annexe C : La microscopie électronique à balayage (MEB)	136
	Annexe D : L'oxymètre	139
	Annexe E : La chambre de Neubauer	142
	Annexe F : Le dosage de la LDH	145

Liste des publications issues de cette thèse

1. **Encapsulation of cells within silica matrixes: Towards a new advance in the conception of "living hybrid materials"**
Journal of Colloid and Interface Science 342(2), **2009**, 211-224.
C.F. Meunier, P. Dandoy, B.-L. Su

2. **Whole-cell based hybrid materials for green energy production, environmental remediation and smart cell-therapy**
Chemical Society Reviews 40(2), **2011**, 860-885.
A. Léonard, P. Dandoy, E. Danloy, G. Leroux, C.F. Meunier, J.C. Rooke, B.-L. Su

3. **Hybrid shell engineering of animal cells for immune protections and regulation of drug delivery: towards the design of "artificial organs"**
PLoS One (soumise)
P. Dandoy, C.F. Meunier, C. Michiels, B.-L. Su

4. **A model of artificial organ by encapsulation of human cells within mineralised beads: *in vivo* biocompatibility study**
Biomaterials (soumise)
P. Dandoy, C.F. Meunier, L. Giordano, N. Caron, C. Michiels, B.-L. Su

Liste des abréviations, acronymes et symboles utilisés dans cet ouvrage

AS	: Bille alginate-silice
ASA	: Bille alginate-silice/alginate
ATP	: Adénosine triphosphate
BET	: Brunauer, Emmett et Teller – Méthode d'analyse par adsorption-désorption d'azote
Ø	: Diamètre
DBS	: Dibutylsilane
DGS	: Diglycérylsilane
DMEM	: Dubelcco's modified eagle medium
EDTA	: Acide éthylène diamine tétraacétique
EDX	: Energy-dispersive X-ray spectroscopy
EGTA	: Acide éthylèneglycol-tetraacétique
ELISA	: Enzyme-like immunosorbent assay
FDA	: Diacétate de fluorescéine
Figure x.n	: Figure où x correspond au numéro de chapitre et n au numéro de figure
FITC	: Isothiocyanate de fluorescéine
GLUT	: Transporteur de glucose
HepG2	: Hépatome G2
HOMO	: Highest occupied molecular orbital
IgG	: Immunoglobuline G
IL-8	: Interleukine 8
kDa	: Kilo Dalton
keV	: Kilo électron-volt
LDH	: Lactate déshydrogénase
LUMO	: Lowest unoccupied molecular orbital
m	: Minute
MAS	: Magic-angle spinning

MEB	: Microscopie électronique à balayage
PBS	: Phosphate buffer solution
PDMPO	: 2-(4-pyridyl)-5-((4-(2-dimethylaminocarbamoyl)methoxy)-phenyl)oxazole
RMN	: Résonance magnétique nucléaire
rpm	: Rotation par minute
s	: Seconde
TEOS	: Tétrahétoxysilane
TMOS	: Tétraméthoxysilane
TMS	: Tétraméthylsilane
UV-visible	: Ultra-violet - Visible

Chapitre 1.

Introduction générale

« Imagination is more important than knowledge. For knowledge is limited, whereas imagination embraces the entire world, stimulating progress, giving birth to evolution. »

Albert Einstein, physicien, 1929.

Introduction générale

1.1 Préambule

La chimie est omniprésente. Son importance dans la société actuelle n'est plus à démontrer et son développement est sans conteste un des principaux facteurs de l'amélioration de la qualité de vie et du confort quel que soit le secteur d'activité. Aussi loin que l'on remonte, la chimie a toujours laissé des traces indélébiles, preuves que son évolution est un paramètre incontournable de progrès. Certes, l'amélioration des techniques y a largement contribué mais la maîtrise et la conception des matériaux nouveaux en dépendent de façon insécable. N'est-ce pas comme cela que les historiens subdivisent les temps quand ils citent l'âge du Cuivre, du Bronze et du Fer ? Cependant à travers ces âges, les visées de la chimie se sont largement diversifiées : des Egyptiens qui maîtrisaient déjà très tôt l'embaumement¹ ou l'art du maquillage², en passant par les Incas³ via les Romains⁴, les progrès réalisés par l'Homme sont en étroite relation avec la compréhension des réactions et des procédés chimiques, aussi archaïques soient-ils. En 4500 avant Jésus-Christ, les Sumériens fabriquent le premier savon à base de graisse et de carbonate de potassium. A la même époque, en Inde et en Chine, les sages commençaient à prodiguer les plantes comme moyens de médication. La chimie se développe dans toutes les directions et rend de plus en plus de services. Bien plus tard, les Incas exploitaient l'essence des plantes en y extrayant le curare des lianes de certains arbres pour la chasse ou se soigner. Cependant, jusqu'au XVI^e siècle, le rôle de la chimie n'occupait que peu de place en médecine. Les vertus curatives des plantes étaient mises en évidence de façon purement empirique, par observation de leurs effets sur les symptômes d'une maladie. Jusqu'à ce que Paracelse préconise de ne plus employer que la partie curative de la plante pour un problème de santé plutôt que la plante tout entière. Pour exemple, les curares sont toujours exploités en anesthésie dans les hôpitaux. Cependant, ce n'est plus l'extrait de la plante qui est injecté au

¹ Le Papyrus d'Ebers (1600 ACN).

² P. Walter, P. Martinetto, G. Tsoucaris, R. Bréniaux, M.A. Lefebvre, G. Richard, J. Talabot, E. Dooryhée (1999), *Nature* 397, 483-484.

³ J. Nabby (1997), Broché, « Le serpent cosmique, l'ADN et les origines du savoir ».

⁴ Plinie L'Ancien (77 ACN), « Naturalis Historia ».

patient, mais l'agent actif uniquement. Succédant aux trésors ramenés du Nouveau Monde par Christophe Colomb et ses pairs, le coca, l'ipéca ou le café furent largement employés pour les soins. Par la suite, les développements en chimie et physiologie ont marqué le XIX^e siècle avec l'isolement des principes actifs. Ainsi, la morphine et la codéine furent isolées de l'opium, l'acide acétylsalicylique de l'écorce de saule, etc. Avec les années, chaque scientifique apporte sa pierre à l'édifice pour mettre en évidence le principe actif qui engendre les processus biochimiques permettant de guérir l'homme, les animaux, les plantes et ensuite le synthétiser en laboratoire. La tendance actuelle consiste à les synthétiser en masse. Cependant, une telle entreprise a demandé des années d'expériences et de travaux pour l'isoler, le synthétiser en petite quantité et en optimiser le mode opératoire pour la production industrielle. Il s'est écoulé 47 ans entre la synthèse de l'acide acétylsalicylique par Gerhardt (1853) et la première commercialisation de l'aspirine (1900) par Bayer. Mais plus encore, même si le salut peut se trouver parmi toutes les plantes qui tapissent la Terre, il existe des maladies qui ne seront jamais guéries par un traitement pharmaceutique. Ces maladies qui ne sont pas dues à un virus, une bactérie ou un microbe mais qui sont la conséquence d'un dysfonctionnement de l'organisme et contre lesquelles les médicaments sont impuissants.

1.2 Le diabète

Des maladies comme la légionellose, le SIDA, la grippe sont toutes dues à un agent infectieux qui va perturber le fonctionnement du corps. A l'opposé, se trouvent des maladies non-infectieuses comme la maladie de Parkinson, d'Alzheimer, l'hémophilie ou le diabète. Ce dernier en particulier fut déjà l'objet d'interrogations depuis plusieurs siècles. A l'origine, le terme "diabète" désignait tous les troubles liés à une miction importante, une déshydratation et une soif intense, sans pour autant que cela soit forcément lié au taux de sucre dans le sang. La très grande majorité des cas ayant une urine sucrée, le diabète *mellitus* (signifiant sucré en latin) est le plus souvent évoqué quand on parle de diabète quotidiennement. C'est pourquoi sa définition est étroitement liée à la glycémie, c'est-à-dire au taux de sucre (glucose) sanguin. Quand ce taux est trop élevé, on souffre d'hyperglycémie; à l'inverse, trop faible, il s'agira d'hypoglycémie; et l'élimination du glucose par les reins est la glycosurie.

Le diabète est au centre de plusieurs sujets d'actualité depuis un siècle, mais il a probablement toujours existé sans que les médecins ne puissent l'identifier. Déjà deux mille ans avant Jésus-Christ les médecins de l'époque en rapportaient les symptômes et les observations où qu'ils soient dans le monde. Les Egyptiens consignent dans le Papyrus d'Ebers¹ (une référence médicale de l'Egypte ancienne) une maladie étrange qui entraîne *une soif intense et un dépérissement du corps amenant la mort*. Plus tard, en Grèce, Hippocrate s'estimait capable de pointer du doigt les diabétiques sur l'Agora parce que ces derniers étaient assaillis *d'abeilles voltigeant autour de leur entrejambe probablement imprégné de glucose*. Au cours du II^e siècle après Jésus-Christ, Galien le nomma "le mal de la soif". Alors qu'Apollonius de Mephis lui donna son nom actuel de "diabète" en 230 avant Jésus-Christ, signifiant "passer ($\delta\iota\alpha$ -) au travers ($-\beta\eta\tau\eta\varsigma$)", c'est Aretée de Cappadoce qui est considéré comme l'inventeur de ce mot en décrivant le diabète comme *une liquéfaction des chairs et des parties solides du corps dans l'urine* à la fin du III^e siècle après Jésus-Christ. En Inde, Suçrata et Charaka considérés comme les pères de la médecine indienne faisaient mention d'urine au miel en voyant fourmis et mouches se presser autour de celle de certains de leurs malades. En outre, ils étaient déjà parvenus à mettre en évidence deux types de diabète sucré en ces termes *"il est deux types de maladie avec les urines sucrées, l'une chez le jeune enfant qui est rapidement mortelle et l'autre chez l'adulte obèse qui est plus lentement mortelle"*. En Chine, les écrits de Chen Chuan (634 PCN) relatent que des chiens s'abreuvaient d'urine suite à son goût sucré, au point qu'en chinois, coréen et japonais l'idéogramme se rapportant au diabète signifie « maladie des urines à sucre »⁵. Face aux progrès en médecine et principalement de l'intérêt pour l'anatomie, le diabète ne fut plus parmi les troubles les plus étudiés. Il fallut attendre le XVII^e siècle où Thomas Willis, exerçant pour le roi Charles II d'Angleterre, confirma les dires de Suçrata et Charaka en parlant pour la première fois de diabète mellitus : *very much sweet, loaded with sugar and honey*, par opposition à l'urine salée associée au diabète insipide. Plus tard, Michel Chevreul eut l'idée d'évaporer l'urine pour en obtenir de petits cristaux blancs qui s'avéraient être du glucose. C'est ainsi qu'on s'aperçut qu'en diminuant la consommation de sucre des patients, on diminuait également leurs symptômes. En 1869, Paul Langerhans soutint sa thèse intitulée « Beiträge zur mikroskopischen Anatomie der Bauchspeicheldrüse » ("Contributions sur l'anatomie microscopique du pancréas") en y précisant qu'à côté des cellules sécrétant le suc pancréatique, le pancréas contenait des cellules regroupées en petits îlots. Il n'avait pas la prétention de leur donner son nom, mais

¹ Le Papyrus d'Ebers (1600 ACN).

⁵ L. Gwei-Djen, J. Needham (1976), *Am. J. Chin. Med.* 4, 3-16.

en 1893, Gustave Laguesse lui rendit hommage en appelant ces amas de cellules : des îlots de Langerhans. Des chercheurs allemands, Minkowski et Von Mering, ont prouvé que le pancréas était responsable du contrôle du sucre en enlevant son pancréas à un chien qui devint diabétique. « *Cet organe doit donc sécréter une hormone antidiabétique* », qu'ils nommèrent insuline, tiré du mot "insula" (« île » en latin). Le Dr. Eugène Opie autopsie des diabétiques en 1901 et remarque que leurs îlots de Langerhans sont détruits. En 1921, sous la direction de Charles Banting, des chercheurs canadiens parvinrent à l'isoler et reçurent le Prix Nobel de Physiologie ou Médecine en 1923 suite à la réussite de leur test sur un jeune garçon de 14 ans à l'article de la mort qui eut la vie sauvée grâce à l'apport d'insuline. Dès cet instant, les résultats pour le traitement du diabète de type 1 commencèrent à affluer de partout et la maladie pu enfin être comprise et traitée.

Le glucose est la principale source d'énergie de notre corps. Il provient essentiellement de notre alimentation mais le foie participe grandement à nous en fournir – pendant les périodes de jeun par exemple. Pour que nos cellules puissent utiliser ce glucose et fonctionner, il faut impérativement qu'il puisse y entrer. C'est le rôle de l'insuline. Elle est la clé qui permet au glucose de traverser la membrane des cellules. Sans cette hormone, le corps est incapable de trouver l'énergie nécessaire à son métabolisme. Or, chez le diabétique cette hormone est absente ou inopérante suivant le type de diabète, le glucose n'est plus suffisamment absorbé par les cellules (il n'y a dès lors plus de fonctions métaboliques), sa concentration dans le sang augmente considérablement. Pire encore, comme il n'y a plus de glucose dans les cellules, le foie imaginant être en état de jeun en synthétise de plus en plus, aggravant davantage l'hyperglycémie. Normalement, les reins absorbent le glucose contenu dans les déchets liquides, mais l'excès de sucre bloque ce processus. Il va alors se répandre dans l'urine. La quantité du volume urinaire va largement augmenter afin d'en évacuer davantage jusqu'à déshydrater l'organisme. Il s'ensuit une soif constante (polydipsie) mais aussi un besoin de sucre puisque tous les éléments nutritifs ont été excrétés avant d'être assimilés. A partir du moment où l'organisme perd cette capacité et que la nourriture n'est plus transformée en énergie par le métabolisme, le diabète est avéré.

En accord avec les dernières considérations publiées par l'Organisation Mondiale de la Santé⁶:

- est diabétique tout individu dont la glycémie obtenue à jeun est à deux reprises supérieure ou égale à 7 mmol/L (1,26 g/L de glucose);

ou

- est diabétique tout individu qui, en présence de signes cliniques évocateurs du diabète, présente une glycémie supérieure à 11 mmol/L (2 g/L de glucose), quelles que soient les conditions de prélèvement.

Une étude publiée en 2008 par l'INAMI⁷ montre que 5,55 % des Belges sont atteints de diabète, quelle que soit sa forme, ce qui est supérieur à la moyenne européenne estimée à 4 %. Il représente la 4ème cause de mortalité dans la plupart des pays développés. La glycémie est donc étroitement liée aux fonctions du pancréas et à l'intégrité des cellules qui le composent.

1.2.1 Le pancréas

Le pancréas est une glande de 12 à 15 cm de long en moyenne logée à l'arrière du corps, sous l'estomac, pour une épaisseur de 3 cm (figure 1.1). La quasi-totalité (99 %) des cellules pancréatiques se regroupent pour former des amas appelés « acinus ». Le pourcent restant est les îlots de Langerhans qui sont dénombrés entre 1 à 2 millions.

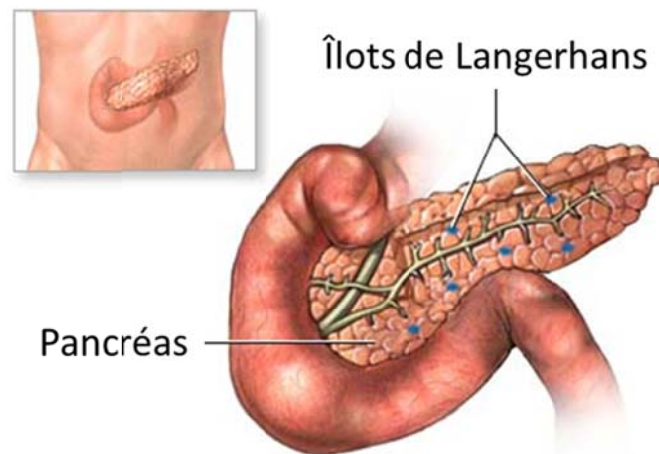


Figure 1.1 : Le pancréas dans le corps avec ses îlots de Langerhans (points bleus)⁸.

⁶ Organisation Mondiale de la Santé (OMS), <http://www.who.int>, consulté le 23 février 2011.

⁷ Institut National d'Assurance Maladie-Invalidité (INAMI), <http://www.inami.fgov.be/information/fr/studies>, consulté le 23 février 2011.

⁸ <http://www.nlm.nih.gov>

Chacun de ces îlots est composé d'environ 3000 cellules bien spécifiques de quatre types différents :

- Les cellules α (20 %), en périphérie de l'îlot, sont responsables de la sécrétion du glucagon ;
- Les cellules β (70 %) vont libérer l'insuline (figure 1.2);
- Les cellules δ (5 %) synthétisent la gastrine et la somatostatine, inhibitrices des fonctions des cellules α et β ;
- Les cellules PP ou F inhibent quant à elles la sécrétion de somatostatine grâce au polypeptide pancréatique.

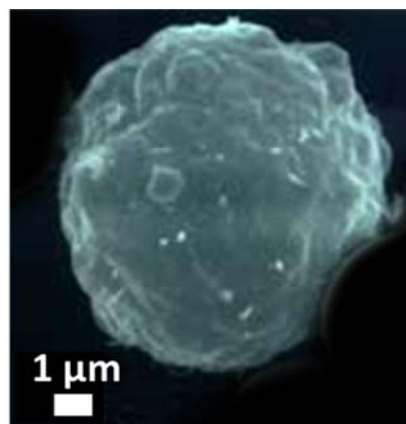


Figure 1.2 : Image obtenue par microscopie électronique d'une cellule β .

Après un repas, le taux de sucre dans le sang augmente. En relation directe avec le sang, une cellule β possède sur sa membrane un transporteur GLUT-2 non-saturable qui permet l'entrée de glucose, plus il y a de glucose dans le sang, plus ce transporteur en fera rentrer dans la cellule β . Le métabolisme du glucose dans cette cellule va permettre la production d'ATP. Or, dans une cellule β , il n'y a pas de régulation de la production d'ATP, par conséquent plus la glycémie est élevée plus de l'ATP sera produit. Cette augmentation engendre la fermeture d'un canal potassique ATP-dépendant. En temps normal, du potassium est constamment importé dans la cellule. Quand il y a beaucoup d'ATP, ce canal se ferme et la concentration intracellulaire en potassium décroît énormément, ce qui dépolarise la cellule. Face à cela, elle réagit en ouvrant un canal calcique voltage-dépendant faisant entrer du calcium. La haute concentration en calcium intracellulaire qui en résulte favorise l'exocytose des petites vésicules dans lesquelles se trouve l'insuline. Elle est donc libérée dans le sang où elle favorisera l'entrée du glucose dans les cellules du corps (figure 1.3).

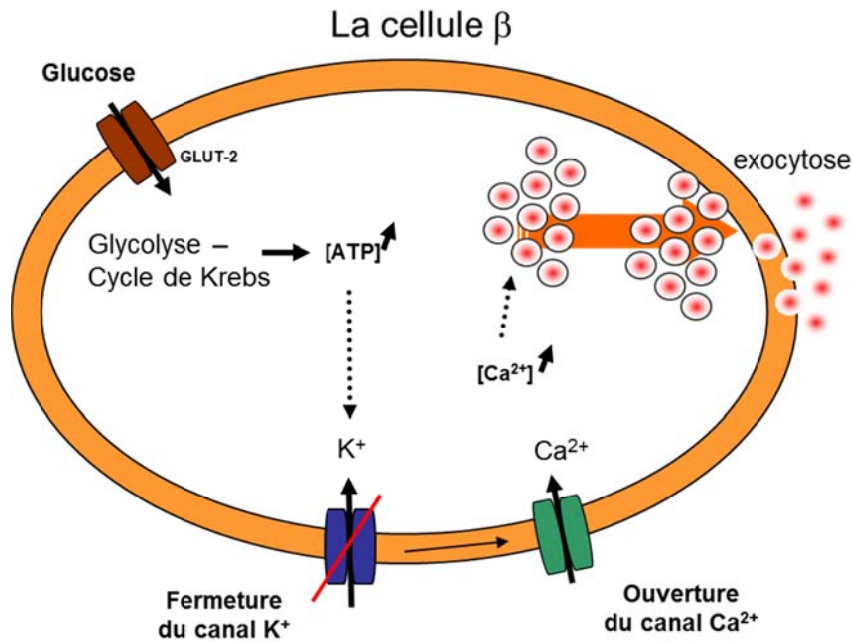


Figure 1.3 : Cascade consécutive à l'augmentation du glucose dans le sang libérant l'insuline à partir de cellules β logées dans les îlots de Langerhans.

1.2.2 L'insuline

L'insuline est une hormone hypoglycémisante sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. Elle est synthétisée sous la forme d'un précurseur qui sera clivé deux fois pour libérer un polypeptide de 51 acides aminés formé de deux chaînes reliées par des ponts disulfures, pour un poids moléculaire de 5,8 kDa (figure 1.4).

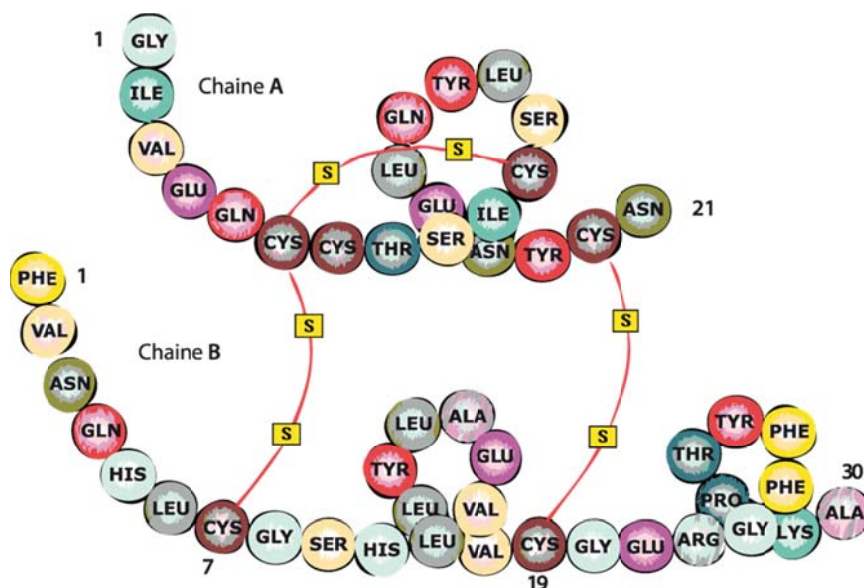


Figure 1.4 : La molécule d'insuline constituée de 51 acides aminés sous forme de 2 chaînes reliées par 3 ponts disulfures.

Dans une cellule β , la prépro-insuline (11,5 kDa) est synthétisée au niveau du réticulum endoplasmique rugueux. Elle est ensuite clivée pour donner la pro-insuline (9,5 kDa) dans laquelle le peptide C va mettre en place les chaînes de la future insuline. Une fois que les ponts disulfures joignent les chaînes A et B, ce peptide est scindé dans l'appareil de Golgi pour donner la forme active de l'insuline. Elle est alors stockée dans de petites vésicules qui demeurent dans le cytoplasme de la cellule β jusqu'à ce que les besoins en insuline se fassent sentir et que sa sécrétion soit initiée (figure 1.5). Le cas échéant, ces vésicules fusionnent avec la membrane plasmique pour libérer l'insuline dans le sang, par exocytose, comme schématisé par la figure 1.3.

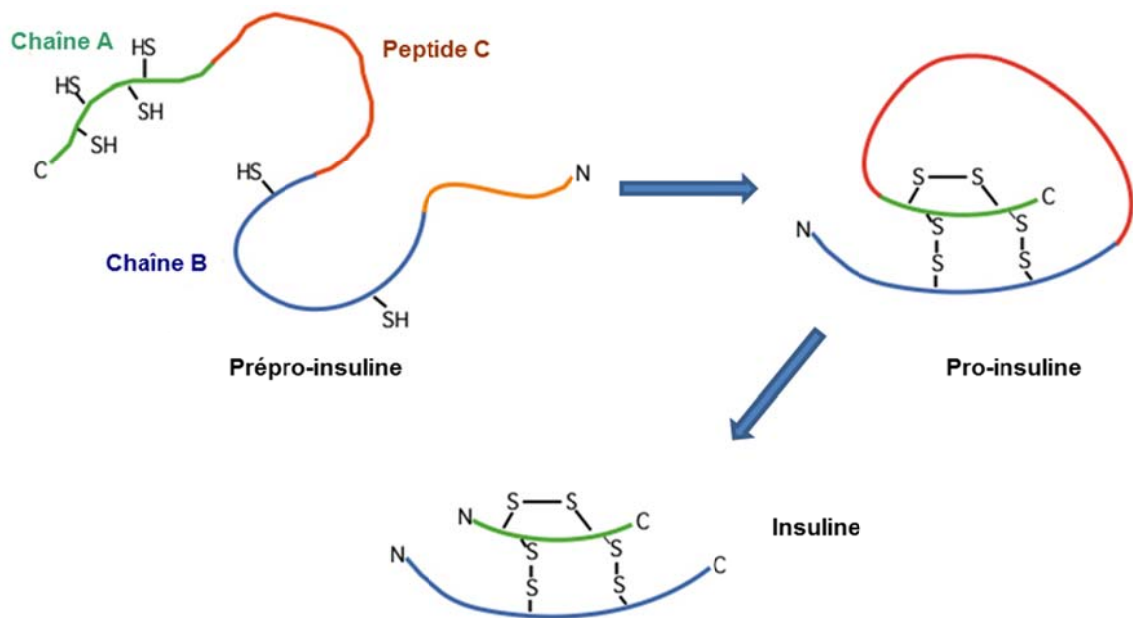


Figure 1.5 : Schéma de maturation de l'insuline sous sa forme active.

L'insuline induit la mise en réserve du glucose et agit sur les 3 métabolismes (glucides, protides, lipides), avec une prédominance sur celui des glucides. En se fixant à des récepteurs de surface (InsR) reconnaissant spécifiquement ce peptide, l'insuline stimule la capture du glucose par les cellules via des transporteurs spécifiques GLUT-4 et son incorporation dans les hydrates de carbone⁹.

⁹ C.A. Janeway (2005), De Boeck, « Immunobiologie ».

1. Métabolisme des glucides :

- au niveau du foie, elle favorise la synthèse du glycogène hépatique à partir du glucose. Elle inhibe la glycogénolyse et la néoglucogenèse (synthèse du glucose à partir de précurseurs non glucidiques);
- au niveau des muscles, elle favorise la pénétration du glucose sanguin dans la cellule et la formation du glycogène musculaire. Il en est de même pour les autres tissus consommateurs du glucose, le tissu adipeux et le foie;
- au niveau des reins, elle favorise la réabsorption active du glucose.

2. Métabolisme des protides :

L'insuline s'oppose au catabolisme protidique et à la néoglucogenèse protidique par :

- augmentation du passage des acides aminés dans la cellule ;
- stimulation de l'anabolisme protidique.

3. Métabolisme des lipides :

L'insuline s'oppose à la lipolyse et à la néoglucogenèse lipidique par inhibition de la libération des acides gras par le tissu adipeux.

L'insuline est sécrétée en permanence par le corps, de jour comme de nuit, avec des pics de production après le repas qui induisent la mise en réserve du glucose dans les muscles et le foie (figure 1.6).

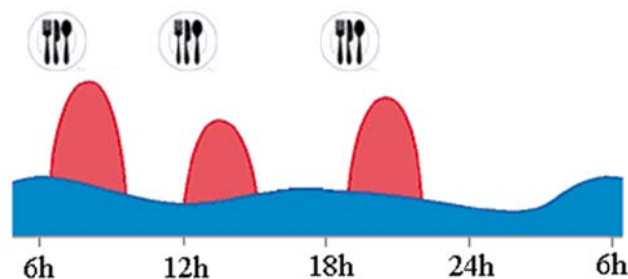


Figure 1.6 : Profil de sécrétion de l'insuline au cours d'une journée chez un patient sain. Le niveau basal de l'insuline est représenté en bleu avec des pics de production après les repas en rouge.

1.2.3 Les différentes formes de diabète

Il existe diverses formes de diabète dont les origines et leurs conséquences dépassent largement le cadre de cet ouvrage¹⁰. Retenons que parmi les plus fréquentes se trouvent les diabètes sucrés de type 1 et de type 2, le diabète insipide et le diabète insipide gestationnel. Les autres formes ne représentant chacune que quelques dixièmes de pourcents des cas reconnus.

– Le diabète sucré de type 1

Le diabète sucré de type 1 aussi connu sous le nom de diabète *insulino-dépendant* ou diabète *jeune* est une maladie auto-immune caractérisée par une destruction progressive des cellules β . Pour des raisons encore obscures actuellement, l'organisme ne fait plus la distinction entre les cellules du soi et du non-soi et le système immunitaire détruit progressivement les cellules β . Un individu sain en possède approximativement un milliard. Cette quantité dépasse largement les besoins de l'organisme grâce à la grande disponibilité d'insuline. Cependant, s'il en reste moins de 20 %, la quantité d'insuline sécrétable ne couvre plus les besoins quotidiens et la personne est déclarée diabétique. Cette abondance préalable de cellules β explique pourquoi le diabète ne se déclare qu'après plusieurs années. Ce n'est qu'à partir du moment où le pancréas ne produit plus assez d'insuline que les premiers symptômes apparaissent. En moyenne, le diagnostic du diabète est établi seulement 5 à 7 ans après la première glycémie anormalement élevée, ce qui coïncide avec le moment où les premières complications se font sentir.

– Le diabète sucré de type 2

Ce diabète également appelé diabète *insulino-indépendant* ou diabète *gras* affecte généralement les personnes de plus de 40 ans, mais des cas extrêmes de type 2 ont déjà été relevés chez de jeunes enfants obèses dont l'alimentation était très grasse et sucrée. La cause des symptômes diffère du type 1 puisque dans ce cas les cellules β sont présentes en quantité suffisantes. Le souci vient du fait qu'avec le temps (ou suite à des abus), soit le pancréas produit trop peu d'insuline, soit les cellules du foie, des muscles et des tissus adipeux n'y répondent plus. On parle de résistance à l'insuline. Le type 2 est le plus fréquent chez les personnes inactives, en surpoids et présentant un épais tablier adipeux. La glycémie est

¹⁰ L. Perlemuter, J.-L. Sélam, G. Collin de l'Hortet (2003), Ed. Masson, « Diabète et maladies métaboliques ».

tellement élevée qu'elle n'engendre pas les symptômes classiques d'amaigrissement, de soif abondante mais provoque la prise de poids.

- Le diabète insipide

Il porte ce qualificatif parce que les urines du patient n'ont pas de goût contrairement à son homologue sucré. Les symptômes ne se déclarent pas suite au dysfonctionnement du pancréas mais suite au désordre hormonal d'une zone de l'hypophyse : la post-hypophyse. Dans des conditions normales, cette dernière synthétise une hormone antidiurétique appelée ADH qui permet au rein de concentrer l'urine avant d'entrer dans la vessie. Ce diabète peut se décliner en diverses pathologies mais dans chaque cas, le patient ressent le besoin impérieux de boire toute la journée et la nuit allant jusqu'à 10 litres par jour.

- Le diabète insipide gestationnel

Le diabète gestationnel est issu d'une intolérance au glucose diagnostiquée au cours de la grossesse. Cinq à dix pourcents de femmes l'ayant eu souffrent immédiatement de diabète de type 2 après leur accouchement, et la moitié d'entre elles le développent dans la décennie.

1.2.4 Les complications liées aux diabètes

Le diabète est source d'un très grand nombre de complications réparties en trois classes^{6,11} :

1. Complications aiguës : Perte de conscience par excès ou par manque de sucre.
2. Complications chroniques :
 - Maladies oculaires : rétinopathie diabétique, cataracte;
 - Maladies rénales : altération progressive des reins menant à l'insuffisance rénale;
 - Maladies cardio-vasculaires : obstruction d'artères (notamment les petites des pieds et des orteils forçant à l'amputation), infarctus;
 - Maladies neurologiques : polyneuropathie, impuissance.

⁶ Organisation Mondiale de la Santé (OMS), <http://www.who.int>, consulté le 23 février 2011.

¹¹ Institut Belge pour l'Economie de la Santé (IBES), <http://www.diabete-abd.be>, consulté le 23 février 2011.

3. Complications accrues aux infections déjà présentes comme l'athérosclérose allant jusqu'au décès par :
- angine de poitrine et infarctus du myocarde ;
 - artériopathie des membres inférieurs ;
 - accidents vasculaires cérébraux.

Il faut noter que le diabète est la première cause de rétinopathie et de gangrène dans le monde.

1.2.5 Les traitements

Bien loin de l'avis de Galien qui préconisait les aliments resserrant les tissus et retenant l'eau comme les lentilles et le vin, ou des conseils des médecins du XVIII^e siècle selon lesquels les patients devaient manger des viandes grasses et faisandées au déjeuner et au dîner, différents traitements sont possibles. Ces thérapies se basent sur la prise d'insuline sous forme d'injection sous-cutanée par piqûre ou pompe mécanique. Néanmoins, les récentes avancées en biologie cellulaire et science des matériaux permettent d'envisager de nouveaux traitements révolutionnaires.

Après avoir montré les avantages et les inconvénients des traitements actuels que sont l'insulinothérapie et l'allogreffe, de nouvelles approches prometteuses seront présentées dans ce chapitre.

1.2.5.1 L'insulinothérapie

Les deux grands choix qui sont proposés au patient sont la piqûre d'insuline, ou l'emploi d'une pompe à insuline à porter en permanence pour assurer sa normoglycémie (figure 1.7).

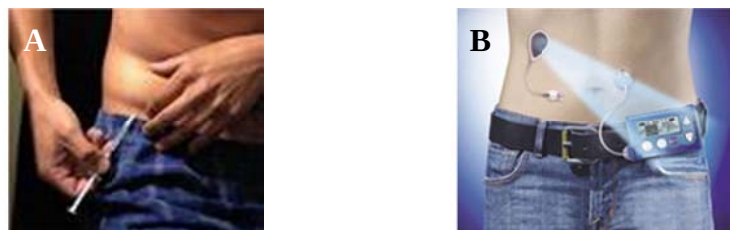


Figure 1.7 : L'injection sous-cutanée d'insuline : (A) par piqûre, (B) par pompe à insuline.

A l'origine, l'insuline était extraite du pancréas de bœuf dans laquelle seuls trois acides aminés diffèrent de la nôtre. Puis ce fut au tour de l'insuline de porc qui ne diffère que d'un seul acide aminé. Ces insulines étaient imparfaitement purifiées et nécessitaient trois à quatre injections par jour. Ces deux origines de l'insuline ne sont plus commercialisées depuis 1999 et leur usage a très nettement baissé dans le monde, et ce parce qu'en 1965, la synthèse chimique d'insuline fut développée par Katsoyannis¹². A partir de là, l'insuline commença à être produite en laboratoire, mais depuis les années 80, l'insuline est obtenue par deux méthodes, soient :

- L'hémisynthèse : par traitement *in vitro*, l'insuline de porc est modifiée pour correspondre exactement à celle de l'homme ;
- La biosynthèse : par des bactéries génétiquement modifiées. Le gène de l'insuline a été identifié sur le bras court du chromosome 11¹³, il a ensuite été cloné chez ces bactéries afin de produire de l'insuline recombinante qui est administrée aux patients.

L'insuline a un délai d'action de 30 minutes et une durée pouvant atteindre 6 heures. Mais les progrès amenés par la biosynthèse rendent désormais possible de synthétiser des insulines possédant de nouvelles caractéristiques, apportant plus de confort aux diabétiques grâce aux modes d'action différents de l'insuline qu'ils s'injectent^{10,14,15,16}. Trois classes cinétiques d'insuline ont ainsi été développées : rapide, intermédiaire et lente. Elles varient, soient en fonction de la séquence des acides aminés, soient en fonction de l'excipient avec lequel l'insuline est mélangée.

L'insuline à action rapide

Le mode action de ce type d'insuline se fait très rapidement ce qui entraîne un effet peu prolongé. En réalité, il ne s'agit pas exactement d'insuline mais d'une protéine identique à quelques acides aminés près. En modifiant la séquence d'acides aminés, par génie génétique, les interactions qui existent entre les molécules d'insuline naturelle sont

¹² P.G. Katsoyannis (1966), *Science* 23, 1509-1514.

¹³ H.S. Tager (1984), *Diabetes* 33, 693-699.

¹⁰ L. Perlemuter, J.-L. Sélam, G. Collin de l'Hortet (2003), Ed. Masson, « Diabète et maladies métaboliques ».

¹⁴ <http://www.diabete.fr>, consulté le 3 mai 2011.

¹⁵ W.D. Kohn, R. Micanovic, S.L. Myers, A.M. Vick, S.D. Kahl, L. Zhang, B.A. Striffler, S. Li, J. Shang, J.M. Beals, J.P. Mayer, R.D. DiMarchi (2007), *Peptides* 28, 935-948.

¹⁶ M. Lepore, S. Pampanelli, C. Fanelli, F. Porcellati, L. Bartocci, A. Di Vincenzo, C. Cordonì, E. Costa, P. Brunetti, G.B. Bolli (2000), *Diabetes* 49, 2142-2148.

déstabilisées. Cette modification a lieu sur la proline en position 28 de la chaîne B, et elle peut s'opérer de deux manières différentes pour fournir deux protéines distinctes dont les modes d'action en injection sous-cutanée sont similaires :

- La première protéine « LisPro » est née de l'inversion entre la proline et la lysine (acide aminé 29) de la chaîne B de l'insuline. Cela a pour conséquence d'éliminer les interactions hydrophobes entre molécules d'insuline ordinaire. Cette élimination permettant une absorption plus rapide, cette protéine débute ses effets dans les 20 minutes qui suivent l'injection et perdurent de 4 à 6 heures ;

- La seconde protéine « Aspart » provient de la substitution de la proline par un acide aspartique. Dans ce cas, il y a alors davantage de répulsions entre les molécules d'insuline qui sont plus rapidement assimilées. Leur durée d'action est la même que pour la protéine « LisPro ».

L'insuline à action intermédiaire

Cette fois, c'est l'excipient associé à l'insuline qui va intervenir sur l'absorption et la durée d'action de l'insuline. Il en existe également deux types :

- Le premier type débute son action une heure après l'injection sous-cutanée et agit toute la journée, du matin au soir. Il est connu sous le nom « d'insuline NPH » (pour Neutral Protamine Hagedorn en l'honneur de son inventeur, 1935). La protamine est la protéine responsable de l'effet retard puisqu'elle permet d'avoir une insuline neutre, moins soluble. Auparavant, celle extraite des animaux était conservée à un pH très acide (pH = 3).

- Le second type, « l'insuline Zinc » a également été employée mais son usage, moins efficace que la NPH, a été abandonné. Une forte concentration en cet atome permettant de retarder l'action de l'insuline puisqu'il maintient l'insuline sous forme d'hexamère. Or seul le monomère peut se fixer aux récepteurs à insuline des cellules, ce qui retarde son assimilation (2 à 3 heures) et sa durée d'action (environ 20 heures).

L'insuline à action prolongée

Ce dernier type a pour but d'apporter l'insuline nécessaire en dehors des repas. Cette fois encore ce n'est pas la molécule d'insuline naturelle qui est commercialisée. La molécule injectée varie de l'insuline humaine suivant trois points : l'ajout de deux arginines en fin de la chaîne B et la substitution d'une asparagine (acide aminé 21 de la chaîne A) par une glycine. Nommée « insuline glargine », sa solubilité est modifiée suite à ces changements. Après l'injection, cette insuline précipite, ce qui entraîne une absorption plus lente et une

durée d'action prolongée. Elle entame son action après 4 à 5 heures, qui peut se prolonger jusqu'à 36 h, mais cette forme d'insuline semble apporter un moins bon contrôle glycémique¹⁷.

Ces types d'insuline sont les plus commercialisées et les plus utilisées par les diabétiques. Couramment, les injections sont composées d'un mélange de deux d'entre elles pour avoir un effet à la fois immédiat et préventif à plus long terme.

L'insulinothérapie soulage les patients mais contraint toujours leur quotidien. L'injection sous-cutanée impose au patient d'être attentif à tout ce qu'il ingère, à calculer le sucre apporté par le repas et en fonction de cela à s'injecter la juste dose d'hormone. Une erreur, même si elle n'est pas grave engendre tout de même de forts désagréments.

Devoir continuellement se surveiller et faire attention à tout n'est pas agréable à vivre. La pompe à insuline possède l'avantage de pouvoir s'affranchir de tout calcul ou de prévisions de ses injections :

Un dispositif est relié à l'organisme pour lui permettre de connaître à tout moment sa glycémie. Quand le corps a besoin d'insuline, un mécanisme s'enclenche automatiquement de façon à répondre à ses besoins. C'est une merveilleuse invention mais qui pose toujours le problème d'avoir en permanence un dispositif collé au corps, duquel une aiguille est continuellement insérée dans la peau, ce qui contraint certains moments de la vie de tous les jours, même si le dispositif est très bien miniaturisé. En outre, cette aiguille provoque à la longue des lésions autour du site d'injection, ce qui impose de changer de site régulièrement et laisse des traces visibles sur la peau.

1.2.5.2 Les alternatives à la prise d'insuline

L'insulinothérapie nécessitant une vigilance quotidienne de ses besoins, les recherches se sont dirigées vers de nouvelles méthodes comme la transplantation d'organes pour simplifier le quotidien des diabétiques. Il y a 10 ans, une étude menée sur 15.000 patients à travers le monde a montré qu'un an après une transplantation de pancréas, le

¹⁷ E.A. Doyle, S.A. Weinzimer, A.T. Steffen, J.A.H. Ahern, M. Vincent, W.V. Tamborlane (2004), *Diab. Care* 27, 1554-1558.

taux de réussite de la greffe atteignait 85 %¹⁸. Cette méthode a montré les avantages d'une thérapie fondée sur le remplacement de cellules par rapport à des injections sous-cutanées journalières d'insuline. Des observations suggèrent même que cette opération peut limiter la progression des complications liées au diabète¹⁹, elle améliore la qualité de vie²⁰, augmente la survie des diabétiques et est rentable²¹. Les conséquences du diabète menant régulièrement à un épuisement des reins, la transplantation du pancréas est généralement associée à celles des reins également. Il faut cependant noter que ces opérations imposent par la suite la prise de médicaments immunosuppresseurs qui affaiblissent les défenses immunitaires de l'organisme de façon à ce que la greffe soit tolérée par l'organisme afin d'être réussie.

Une autre alternative est la transplantation d'îlots de cellules β plutôt que de l'organe entier. La thérapie cellulaire se montre plus simple puisqu'elle est un moyen peu invasif de restaurer une normoglycémie. Cette opération évite les complications chirurgicales associées à la vascularisation d'un nouveau pancréas, réduit donc les risques et le coût de l'opération, ce qui ouvre un plus large panel de patients susceptibles de subir cette intervention. Tristement, les données enregistrées en 1999 par l'International Islet Transplantation Registry (ITR) ont révélé que seuls 12 % des patients ayant subi une allogreffe d'îlots étaient insulino-indépendants après 7 jours, et 8 % au bout d'un an²² et ce sans traitement thérapeutique complémentaire. Bien loin de la réussite des greffes de pancréas au complet, la transplantation de cellules β est possible mais montre un succès encore trop faible. Cependant, en 2000, une équipe de chercheurs canadiens de l'université d'Alberta à Edmonton a mis au point un savant mélange d'immunosuppresseurs pris antérieurement à l'opération et l'a testé sur 7 patients. Tous maintinrent une normoglycémie pendant 11 mois sans effets secondaires prouvant que l'allogreffe pouvait être efficace²³. Cette étude, qui a démontré que la transplantation de cellules β saines dans le pancréas d'un diabétique pouvait mener à une solution durable, a énormément contribué à multiplier les recherches dans ce domaine après sa publication.

¹⁸ D.E.R. Sutherland, R.W.G. Gruessner, D.L. Dunn, A.J. Matas, A. Humar, R. Kandaswamy (2001), *Ann. Surg.* 233, 463-501.

¹⁹ X. Navarro, D.F. Sutherland, W.R. Kennedy (1997), *Ann. Neurol.* 42, 727-736.

²⁰ C.R. Gross, C. Limwattananou, B.J. Mathees (1998), *Clin. Transplant.* 12, 351-361.

²¹ V. Douzdjian, D. Ferrara, G. Silvestri (1998), *Am. J. Kidney Dis.* 30, 280-281.

²² International Islet Transplant Registry (ITR), Newsletter 8, page 10.

²³ A.M.J. Shapiro, J.R.T. Lakey, E.A. Ryan, G.S. Korbitt, E. Toth, G.L. Warnock, N.M. Kneteman, R.V. Rajotte (2000), *N. England J. Med.* 343, 230-237.

Même si la greffe d'un pancréas ou de cellules est une alternative qui amènerait un grand soulagement, le faible nombre de donneurs ou surtout la nécessité de suivre un régime médicamenteux immunosuppresseur pour éviter le rejet, fait que la majeure partie des diabétiques opte pour la solution de l'injection (par piqûre ou pompe). Cependant, cette possibilité de greffe a ouvert de remarquables perspectives. Le protocole d'Edmonton a depuis sauvé 60 autres patients. Mais il ne reste abordable qu'à une très faible poignée de personnes, tant les coûts qu'il engendre sont importants. Néanmoins, ces résultats se sont avérés particulièrement importants parce que ce sont les premiers travaux qui prouvent que l'on peut traiter le diabète de type 1 à l'aide d'une transplantation de cellules et pas de l'organe complet. L'étape logique suivante est d'éliminer la prise d'immunosuppresseurs.

Face aux greffes qui n'offrent le salut qu'à un nombre limité de patients, il faut développer de nouvelles méthodes pour parvenir à guérir véritablement du diabète. Deux stratégies intéressantes et complémentaires sont en voie de développement. L'exploitation de cellules souches et la conception d'une barrière immuno-protectrice qui isolerait les nouvelles cellules des attaques du système immunitaire. Il y a bientôt 10 ans, les travaux de Drukker²⁴ et Mammolenti²⁵ ont mis en évidence que les cellules souches indifférenciées n'expriment pas de marqueurs de l'immunité, alors que c'est le cas une fois qu'elles sont différenciées. Cette information permet donc de contourner le problème de rejet puisqu'il suffit de greffer des cellules souches non-différenciées pour mettre un maximum de chances de son côté. Des travaux sur ce sujet sont actuellement menés au GIGA, à l'ULg pour élucider les mécanismes de différenciation de cellules²⁶. Quant à la conception d'un bouclier protecteur, il fait l'objet de cette thèse et sera détaillé dans la suite de ce document.

En conséquence, les médecins se destinent à la mise au point d'un organe artificiel qui consiste à implanter un substitut du pancréas dans le corps même du patient. Le but de ces développements est de parvenir à réduire ou supprimer complètement la nécessité d'une intervention humaine dans la prise en charge du diabète et d'un contrôle glycémique amélioré puisque cet organe sera en relation directe avec les besoins du patient.

²⁴ M. Drukker, G. Katz, A. Urbach, M. Schuldiner, G. Markel, J. Itskovitz, B. Reubinoff, O. Mandelboim, N. Benvenisty (2002), *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 9864-9869.

²⁵ M. Mammolenti, S. Gajavelli, P. Tsoulfas, R. Levy (2004), *Stem Cells* 22, 1101-1110.

²⁶ http://reflexions.ulg.ac.be/cms/c_27268/un-drole-de-zebre-pour-lutter-contre-le-diabete, consulté le 18 mars 2011.

1.3 Elaboration d'un pancréas artificiel

Confrontée au problème du nombre de donneurs insuffisant, ajouté à la complexité d'en trouver un qui soit compatible, la médecine moderne voudrait développer de nouvelles approches visant la création d'organes artificiels pour soulager ses patients, sans qu'ils aient de régime immunosuppressif très lourd à assumer. Un organe est une partie du corps qui remplit une ou plusieurs fonctions bien déterminées. Par exemple, les reins filtrent le sang pour l'épurer et régulent la quantité d'eau dans le corps, le cœur est responsable de la circulation sanguine, le foie est indispensable pour la digestion des aliments et la détoxification, etc. L'organe artificiel est donc un organe créé en laboratoire capable de reproduire les fonctions de celui qu'il remplace. Si les actions de certains organes comme le cœur peuvent être recréées par la mise au point d'un système de pompes qui « battent » comme le cœur, d'autres dont les fonctions proviennent de la spécificité des cellules qui le constituent font partie d'une autre classe d'organes artificiels. Dans ce cas, il s'agit d'utiliser des cellules étrangères, aux fonctions bien ciblées, qui vont substituer l'organe déficient pour remplir son rôle. Toutefois, un organe ne se limite pas aux cellules qui le constituent, mais à ces mêmes cellules enveloppées dans une structure supramoléculaire qui les maintient ensemble, les relie (entre elles et au corps) et les protège. En conséquence, la création d'organes artificiels impose au préalable de concevoir le matériau qui remplacera cette structure externe pour réunir les cellules, les envelopper et les protéger. Différentes pathologies seront susceptibles d'être traitées par cette technologie, ce qui montrent l'importance d'étendre les recherches dans ce domaine^{27,28}.

Prenons l'exemple du diabète où le pancréas est un organe constitué de 4 types cellulaires, mais dont un seul devient inopérant par suite de réactions auto-immunes. L'approche originale pour traiter le diabète de type 1 est de réimplanter des cellules β fraîches venant d'un donneur où elles sont totalement protégées du rejet. Ce matériau protecteur, ou matrice, doit respecter les règles essentielles de :

²⁷ P.M. Galletti, P. Aebischer, M.J. Lysaght (1995), *ASAIO* 41, 49-57.

²⁸ J.M. Schumacher, S.A. Ellias, E.P. Palmer, H.S. Kott, J. Dinsmore, P.K. Dempsey, A.J. Fischman, C. Thomas, R.G. Feldman, S. Kassissieh, R. Raineri, C. Manhart, D. Penney, J.S. Fink, O. Isacson (2000), *Neurology* 54, 1042-1050.

- ✓ biocompatibilité (envers les cellules dans un premier temps, mais vis-à-vis de l'organisme-hôte par la suite),
- ✓ diffusion des nutriments à travers la matrice (sucre, O₂, acides aminés, vitamines), mais aussi des métabolites sécrétés par les cellules,
- ✓ transparence immunitaire pour éviter le rejet (cellules inflammatoires, anticorps).

Cet ensemble de critères repris dans la figure 1.8 schématise la matrice idéale : un matériau inerte et poreux. Les pores sont suffisamment grands pour permettre les échanges, et suffisamment petits pour bloquer la rencontre du système immunitaire avec les « nouvelles » cellules implantées.

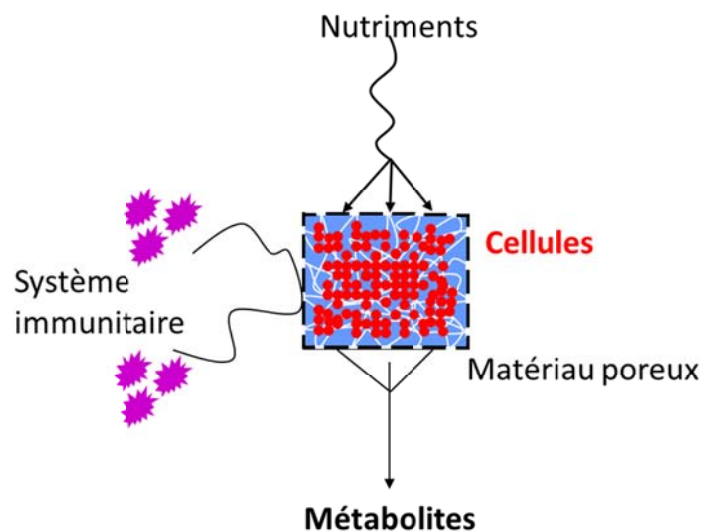


Figure 1.8 : Représentation schématique de l'organe artificiel idéal. Les cellules immobilisées dans un matériau sont isolées du système immunitaire qui ne peut les rejeter. La porosité bloque les cellules inflammatoires et les anticorps, mais autorise l'entrée des nutriments vers les cellules et l'évacuation de leurs métabolites vers le corps.

La première trace répertoriée où il est question d'implanter des cellules enfermées dans un matériau au sein d'un être vivant remonte à 1933 avec les travaux de Bisceglie²⁹. Au cours de sa thèse, il étudiait la survie des tissus en l'absence de vascularisation en les enveloppant d'une membrane immuno-protectrice. Déjà à cette époque, la nécessité d'obtenir un matériau semi-perméable autorisant la diffusion à travers celui-ci était

²⁹ V. Bisceglie (1933), *Ztschr. Krebsforsch* 40, 122-140.

impérieuse tout en évitant le rejet du greffon. C'est le groupe d'Algire³⁰, une décennie plus tard, qui fit mention d'immuno-isolation pour éviter les rejets de la greffe en développant « la technique de la chambre transparente » en référence aux échanges possibles au sein de cette chambre : entre deux membranes poreuses ($\varnothing = 1\mu\text{m}$), des cellules étaient disposées au milieu où l'objectif était d'étudier la réaction immunitaire de l'organisme-hôte envers celles-ci. Les deux membranes étaient maintenues, collées l'une à l'autre par deux bagues pour éviter que les cellules ne puissent s'échapper. Comme souvent, l'imagination du créateur est limitée par la liberté que lui offrent les techniques de l'époque, c'est pourquoi ce dispositif ne fut pas plus abouti. Ce n'est que bien plus tard lorsque les progrès ont permis de façonner un matériau par contact direct avec les cellules que leur encapsulation à des fins thérapeutiques a vraiment vu le jour. Les prémices ont débuté dans les années 80 avec les travaux de Sun³¹ en exploitant l'alginate. Une très large quantité de nouvelles méthodes ont alors vu le jour pour parvenir à immobiliser des cellules dans un environnement protecteur mais ouvert pour l'élimination des métabolites.

Tous ces systèmes biologiques furent incorporés dans une variété de supports remplissant les critères essentiels à une immobilisation réussie³². Le choix du support ne dépend pas seulement de sa nature chimique et son inertie envers ces fragiles entités, il convient de tenir compte de la méthode de synthèse qui doit s'opérer dans des conditions de synthèse qui s'écartent le moins possible de leurs conditions de vie quotidienne (température, pression atmosphérique). L'affinité du support au point de vue physique (contrainte mécanique et pression sur les membranes), chimique (intégrité des membranes, force ionique) et biologique (réactions inflammatoires, fibrose) doit être en adéquation avec les cellules et le corps. Son ouverture vers l'extérieur qui a déjà été détaillée mais surtout sa robustesse et sa stabilité dans le temps sont des facteurs essentiels de réussite.

1.3.1 Les différents types d'immobilisation

L'immobilisation de cellules vivantes dans un matériau inerte et biocompatible se présente comme la solution de choix pour la conception d'un organe artificiel. Tout le challenge résidant dans la conception de la matrice qui doit être en symbiose avec les besoins des cellules qui y sont enfermées (accès aux nutriments, évacuation des déchets) et les besoins du corps (transparence au système immunitaire et accès aux métabolites des

³⁰ R.T. Prehn, J.M. Weaver, G.H. Algire (1954), *J. Natl. Cancer Inst.* 15, 509-517.

³¹ F. Lim, A. Sun (1980), *Science* 210, 908-910.

³² C.F. Meunier, P. Dandoy, B.-L. Su (2010), *J. Colloid Interf. Sci.* 342, 211-224.

cellules). En effet, les cellules animales ne sont pas l'unique objet des recherches puisque la biotechnologie s'intéresse également :

- aux levures et bactéries pour synthétiser des médicaments^{33,34}, pour dépolluer^{35,36}, pour détoxifier les sols^{37,38}, etc...
- aux cellules végétales : également comme système de dépollution de nitrates³⁹ ou métaux^{40,41,42}, des pesticides^{43,44}, ...

Cette technique ayant montré que l'immobilisation pouvait améliorer leur productivité grâce à l'effet protecteur amené par le matériau et leur plus grande densité comparé à une dispersion dans leur milieu⁴⁵.

Aux côtés des premiers exemples d'immobilisation énoncés *supra*, différents matériaux furent l'objet de recherches comme l'agar^{46,47,48}, l'agarose⁴⁹ et le chitosan^{50,51,52} parmi les biopolymères mais leur robustesse est plutôt faible et leur préservation dans le temps n'est pas garantie. Des polymères synthétiques comme le polyvinyl alcool, le polyacrylamide et le polyuréthane qui se montrent plus résistants imposent des conditions de synthèse beaucoup plus drastiques qui ne sont pas en accord avec le vivant. De plus, ils ne sont pas poreux, voire ont tendance à gonfler avec le temps.

³³ I.S. Johnson (1983), *Science* 219, 632-637.

³⁴ A.L. Demain (2000), *Trends in Biotechnol.* 18, 26-31.

³⁵ A. Chauhan, A. Ogram (2005), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 327, 884-893.

³⁶ M. Petre, G. Zarnea, P. Adrian, E. Gheorghiu (1999), *Res. Conserv. Recycl.* 27, 309-332.

³⁷ C.J. Cunningham, I.B. Ivshina, V.I. Lozinsky, J.C. Philip (2004), *Int. Biodet. Biodegr.* 54, 167-174.

³⁸ M. Rietti-Shati, D. Ronen, R.T. Mandelbaum (1996), *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 7, 77-70.

³⁹ N. Mallick (2002), *BioMetals* 15, 377-390.

⁴⁰ L. Travieso, A. Pellon, F. Benitez, E. Sanchez, R. Borja, N. O'Farrill, P. Weiland (2002), *Biochem. Eng. J.* 12, 87-91.

⁴¹ S.P. McGrath, E. Lombi, C.W. Gray, N. Caille, S.J. Dunhan, F.J. Zhao (2006), *Environ. Sci. Technol.* 141, 115-125.

⁴² R.B. Meagher, A.C.P. Heaton (2005), *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32, 502-513.

⁴³ P.M. Kieran, P.F. MacLoughlin, D.M. Malone (1997), *J. Biotechnol.* 59, 39-52.

⁴⁴ H. Dörnenburg, D. Knorr (1995), *Enz. Microb. Technol.* 17, 674-684.

⁴⁵ H. Böttcher, U. Soltmann, M. Mertig, W. Pompe (2004), *J. Mater. Chem.* 14, 2176-2188.

⁴⁶ B.S. Rao, A.V. Pundle, A.A. Prabhune, V. Shankar, H. SivaRaman (1986), *Appl. Biochem. Biotech.* 12, 17-24.

⁴⁷ J.N. Nigam, B.K. Gogoi, R.L. Bezbaruah (1998), *W. J. Microbiol. Biotech* 14, 457-459.

⁴⁸ M.E. Stefanova, A.I. Tonkova, E.P. Dobрева, D.I. Spasova (1998), *Folia Microbiol.* 43, 42-46.

⁴⁹ J.M. Guisán, A. Bastida, R.M. Blanco, R. Fernández-Lafuente, E. García-Junceda (1996), *Immobil. Enz. Cells* 1, 277-287.

⁵⁰ F. Bissett, D. Sternberg (1978), *Appl. Environ. Microbiol.* 35, 750-755.

⁵¹ D. Knorr, R.A. Teutonico (1986), *J. Agric. Food Chem.* 34, 96-97.

⁵² A. Zhu, M. Zhang, J. Wu, J. Shen (2002), *Biomater.* 23, 4657-4665.

L'immobilisation de systèmes biologiques a pu être classée en deux axes majeurs, l'immobilisation *in situ* et *post-synthèse* qui respectent les concepts d'encapsulation ou d'adsorption passive et active.

- L'encapsulation consiste à entièrement recouvrir les cellules ou enzymes par la matrice. Cette méthode d'immobilisation *in situ* consiste à mélanger les entités biologiques avec les précurseurs du matériau qui, par modification des facteurs physico-chimiques, vont les immobiliser en les englobant complètement dans un réseau qui passe de l'état liquide (dans lequel baigne les cellules) à l'état solide. Il existe également l'encapsulation par cross-linking qui est une association par un agent pontant comme la glutaraldéhyde qui interagit avec l'extrémité aminée d'une enzyme⁵³. Dans le cas des cellules, elles sont « cross-linkées » en présence de protéines inertes comme la gélatine, le collagène^{54,55}.
- En *post-synthèse* où le matériau est synthétisé préalablement puis mis en contact avec les systèmes biologiques, l'adsorption passive montre davantage d'intérêt pour les enzymes. Par le biais d'interactions ioniques, il y a adsorption de l'enzyme au matériau mais cette méthode souffre d'un taux de fuite élevé des éléments immobilisés.
- L'adsorption active, avec un lien covalent, est également plus adaptée à l'immobilisation d'enzymes que pour celle de cellules où les groupements fonctionnels de l'enzyme sont liés à un matériau fonctionnalisé^{56,57}.

Dans le cas de cellules, l'immobilisation après synthèse du matériau possède l'avantage d'octroyer une grande liberté dans le procédé suivi pour sa mise en œuvre puisque le matériau est conçu en dehors de tout contact avec les cellules, avant qu'elles y soient incorporées par dispersion du support synthétisé dans leur milieu^{58,59,60}. Cependant, les cellules β n'étant pas douées de mobilité, cette approche n'est pas applicable pour un pancréas artificiel puisque les cellules ne seraient pas immobilisées au cœur de la matrice ce qui restreindrait son efficacité.

⁵³ M. Nakajima, K. Nishizawa, H.A. Nabetani (1993), *Bioproc. Eng.* 9, 31-35.

⁵⁴ S.F. D'Souza (1989), *Indian J. Microbiol.* 29, 83-117.

⁵⁵ F.B. Kolot (1981), *Process Biochem.* 5, 2-9.

⁵⁶ E.M. D'Urso, G. Fortier (1996), *Enz. Microb. Technol.* 18, 482-488.

⁵⁷ J.S. Melo, S.F. D'Souza (1992), *Appl. Biochem. Biotechnol.* 32, 159-170.

⁵⁸ N.A. Kotov, Y. Liu, S. Wang, C. Cumming, M. Eghtedari, G. Vargas, M. Motamedi, J. Nichols, J. Cortellia (2004), *Langmuir* 20, 7887-7892.

⁵⁹ Y. Liu, S. Wang, J. Lee, N.A. Kotov (2005), *Chem. Mater.* 17, 4918-4924.

⁶⁰ J. Lee, S. Shanbhag, N.A. Kotov (2006), *J. Mater. Chem.* 16, 3558-3564.

1.3.2 L'immobilisation *in situ*

Parmi les types d'immobilisation possibles, celle *in situ* est la plus appropriée à notre recherche au cours de laquelle des cellules animales sont manipulées. La découverte et le développement des procédés sol-gel ont considérablement ouvert la voie vers de nouvelles méthodes de synthèse dans des conditions dites douces. Inspiré par mimétisme de la nature où les diatomées (microalgues unicellulaires) sont capables de fabriquer un exosquelette en silice grâce à l'acide orthosilicique dissout présent dans la mer, le procédé sol-gel permet la synthèse de matériaux poreux à température ambiante et pression atmosphérique.

C'est Sergei Braun, il y a vingt ans, qui fut le premier à montrer que l'immobilisation par sol-gel permettait de conserver une enzyme active après encapsulation dans une matrice silicée⁶¹. Ses résultats ont alors lancé une génération de travaux poursuivant plusieurs voies de synthèse au départ de précurseurs siliciques qui peuvent être regroupées en quatre catégories :

- (a) La dispersion des cellules dans une matrice silicée solide⁶² ;
- (b) La pré-encapsulation des cellules dans une capsule recouverte par un film de silice⁶³ ;
- (c) La pré-encapsulation de cellules dans une capsule d'alginate recouverte par un gel de silice où la capsule est ultérieurement dissoute pour laisser les cellules immobilisées dans les cavités laissées par la disparition de la capsule⁶⁴ ;
- (d) L'enrobage cellule par cellule, à même leur paroi, d'un fin film de silice⁶⁵.

Ces voies de synthèse ayant été obtenues après développement de techniques comme le procédé sol-gel, biosil ou freeze-casting qui sont détaillées ci-après.

1.3.2.1 Le procédé sol-gel

Le procédé sol-gel consiste à former des matériaux solides au départ d'un précurseur ($\text{Si}(\text{OMe})_4$ ou $\text{Si}(\text{OEt})_4$ par exemple) en passant par deux stades intermédiaires : le sol et le gel. Le sol est obtenu au cours d'une étape d'hydrolyse du précurseur où de fines particules colloïdales, d'une taille allant de 1 nm à 1 μm , sont dispersées dans un liquide. Le

⁶¹ S. Braun, S. Rappoport, R. Zusman, D. Avnir, M. Ottolenghi (1990), *Mater. Lett.* 10, 1-5.

⁶² G. Carturan, R. Campostrini, S. Diré, V. Scardi, E. de Alteris (1989), *J. Mol. Catal.* 57, L13-L16.

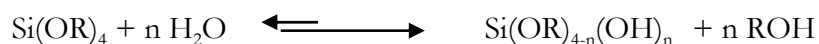
⁶³ E. Bressler, O. Pines, I. Goldberg, S. Braun (2002), *Biotechnol. Progr.* 8, 445-450.

⁶⁴ M. Perullini, M. Jobbagy, G. de Soler-Illia, S.A. Bilmes (2005), *Chem. Mater.* 17, 3806-3808.

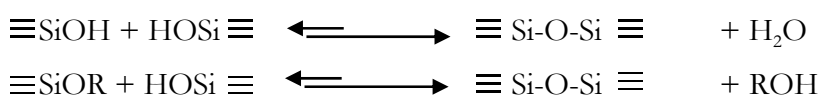
⁶⁵ S.H. Yang, K.B. Lee, B. Kong, J.H. Kim, H.S. Lim, I.S. Choi (2009), *Angew. Chem. Int. Ed.* 48, 9160-9163.

gel provient de la condensation de ces particules qui s'agrègent et se lient les unes aux autres augmentant la viscosité du sol conduisant à la formation un réseau d'oxyde tridimensionnel macromoléculaire formé de chaînes flexibles interconnectées⁶⁶.

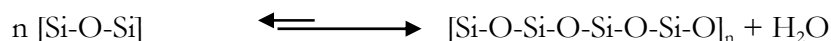
Dans la pratique, la source est premièrement hydrolysée. La substitution nucléophile d'un groupement alkoxy du précurseur par un groupement hydroxy va permettre la formation des particules colloïdales qui vont polymériser :



Les premiers clusters ainsi formés vont progressivement se condenser menant à la formation d'un réseau inorganique riche en eau :



Chacun de ses clusters, grossissant, vont se lier entraînant une polycondensation dans le bain réactionnel.



Ces phénomènes se poursuivent au cours du temps pendant lequel une troisième étape, dite de vieillissement, prend lieu. La polycondensation continue amenant un phénomène de rétraction du réseau et d'expulsion du solvant consécutifs au phénomène de cross-linking engendré par les groupements silanols à la surface des canaux du gel. Un supplément d'information sur les matériaux sol-gel en silice est regroupé dans l'annexe A.

L'immobilisation de cellules au sein du matériau obtenu par cette voie a lieu après la formation du sol. Une fois l'étape d'hydrolyse accomplie, le sol est versé sur les cellules dans leur milieu de culture et la gelification prend cours. Cependant, cette méthode souffre d'un grave manquement à l'intégrité des membranes cellulaires. En effet, l'alcool libéré au cours de cette étape (le méthanol dans le cas du Si(OMe)_4 et l'éthanol dans le cas du Si(OEt)_4), provoque leur solubilisation et leur perméabilisation amenant une mort cellulaire rapide. Cette surconcentration allait totalement à l'encontre des possibilités offertes par le réseau silicé puisqu'une encapsulation de cellules vivantes est totalement inenvisageable dans un tel contexte. Le méthanol affecte la perméabilité des membranes conduisant à la mort certaine des cellules^{67,68,69}. De façon à pouvoir présenter un sol dénué de toxicité,

⁶⁶ J. Livage (1997), *Science* 2, 132-138.

⁶⁷ B.W. Lee, R. Faller, A.K. Sum, I. Vattulainen, M. Patra, M. Karttunen (2004), *Fluid Phase Equilib.* 225, 63-68.

l'idée qui fut imaginée pour s'affranchir du problème de relargage d'alcool parmi les produits secondaires était d'éliminer l'alcool du sol par distillation⁷⁰.

En réaction aux alcools présents dans le sol, la voie aqueuse fut également acheminée pour pallier à ces problèmes de produits secondaires nocifs. Dans ce type de procédé sol-gel où le silicate de sodium (Na_2SiO_3) ou le Ludox sont les précurseurs, l'étape d'hydrolyse est déjà accomplie ce qui contourne le problème des produits secondaires du sol^{71,72}.

Une troisième voie, dite « biocompatible », fut alors étudiée à partir de polyol-silanes⁷³. Leur avantage vient du fait qu'au cours de l'hydrolyse, le produit secondaire sera biocompatible. Le polyol résultant, au contraire de l'éthanol, ne devrait pas être délétère aux cellules. Vu que le problème venait des produits secondaires, des chercheurs ont retrouvé trace de la synthèse de ce précurseur à base de glycérol^{74,75,76,77} pour l'appliquer à l'immobilisation de cellules en partant de l'idée que le précurseur devait posséder des liens facilement hydrolysables pour l'obtention du sol où le groupe partant était compatible avec le vivant.

La silice offrant des avantages tels que les conditions douces de synthèse (à pH physiologique, température et pression ambiantes), la porosité modulable (échanges de matière avec l'extérieur), une réputation biocompatible (puisqu'exploitée et synthétisée par les diatomées) et des voies de synthèse diversifiées (précurseurs multiples), elle s'est tout naturellement imposée dans ce domaine extrêmement porteur qu'est l'immobilisation de cellules, qu'elles soient animales ou végétales.

⁶⁸ A. Coiffier, T. Coradin, C. Roux, O.M.M. Bouvet, J. Livage (2001), *J. Mater. Chem.* **11**, 2039-2044.

⁶⁹ C.R. Gross, C. Limwattananou, B.J. Mathees (1998), *Clin. Transplant.* **12**, 351-361.

⁷⁰ M.L. Ferrer, F. Del Monte, D. Levy (2002), *Chem. Mater.* **14**, 3619-3621.

⁷¹ D.-M. Liu, I.W. Chen (1999), *Acta Mater.* **47**, 4535-4544.

⁷² K.S. Finnie, J.R. Barlett, J.L. Woolfrey (2000), *J. Mater. Chem.* **10**, 1099-1101.

⁷³ I. Gill, A. Ballesteros (1998), *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 8587-8598.

⁷⁴ A. Gøneberg, A. Verheyden (1952) Belgian patent 510419 to Union chimique belge Soc.

⁷⁵ H. Krimm, H. Schnell (1962) German patent 1136114 to Farbenfabriken Bayer.

⁷⁶ E. Goldberg, E. Powers (1964), *J. Polym. Sci. Polym. Phys.* **2**, 835-838.

⁷⁷ Vaughn HA (1965) British patent 989379 to General Electric Co.

1.3.2.2 Le procédé Biosil⁷⁸

Ce procédé fut imaginé il y a 15 ans pour s'affranchir du stress généré par l'éthanol au cours de l'immobilisation ou par la contraction matricielle prenant cours pendant le vieillissement du gel. Pour ce faire, les cellules reposent sur un support solide et sont exposées à un flux d'azote transportant un mélange d'alkoxydes de silice (figure 1.9). Ce gaz porteur emporte les précurseurs de silice chauffés (80° C) et vaporisés vers la chambre réactionnelle où se trouvent les cellules. L'atmosphère de la chambre est contrôlée de façon à amener l'hydratation suffisante pour former une pellicule d'eau à la surface des cellules. Le flux de précurseurs, au contact des cellules bien humides, va subir les réactions d'hydrolyse et de condensation du procédé sol-gel. De cette manière le film de silice se forme à même les cellules et apporte un double avantage. Premièrement, il n'y a pas de rétrécissement puisqu'il n'y a pas trop d'eau pour la formation du gel. Ensuite, l'éthanol est rapidement éliminé par évaporation et emmené par l'azote pour diminuer son temps de contact avec les cellules.

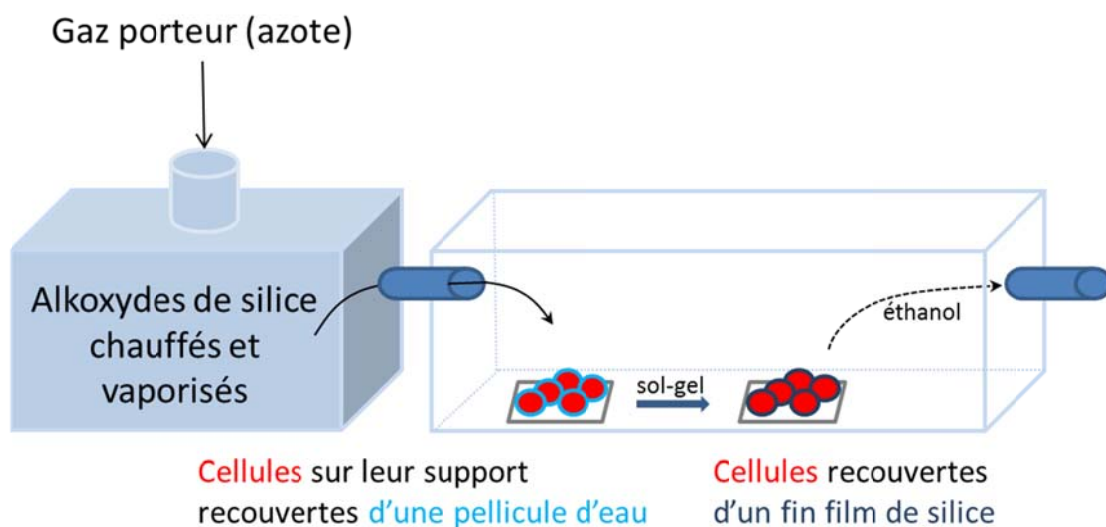


Figure 1.9 : Représentation schématique du procédé Biosil.

⁷⁸ R. Campostrini, G. Carturan, R. Caniato, A. Piovan, R. Filippini, G. Innocenti, E.M. Cappelletti (1996), *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 7, 87-97.

Carturan et ses collaborateurs ont démontré que ce procédé était applicable à l'immobilisation d'entités biologiques diverses^{79,80,81}. De plus, ils ont étendu son principe à l'encapsulation de cellules dans des polymères tels que des matrices d'alginate ou de collagène⁸².

1.3.2.3 Le freeze-casting

Cette méthode d'immobilisation permet l'obtention de matrices par un changement brutal de la température d'une dispersion colloïdale⁸³. À l'aide d'un mélange composé d'un sol de silice, de poudres céramiques (comme l'alumine) et d'additifs (nutriments et cryoprotectant), des chercheurs ont réussi à immobiliser des bactéries.

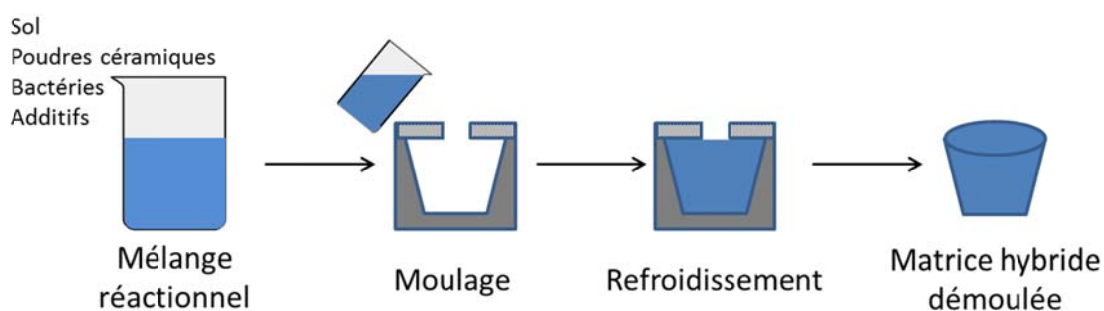


Figure 1.10 : Représentation schématique de l'immobilisation par freeze-casting.

Le mélange réactionnel (figure 1.10) est refroidi très rapidement à -40°C . La formation des cristaux de glace induit une séparation de phase et force les particules colloïdales à se rassembler, résultant à une transition du sol vers le gel. Si cette technique est intéressante puisqu'elle permet l'ajustement de la taille des pores en contrôlant la formation des cristaux de glace générés par la chute de température, son accomplissement pêche grandement quant à la survie des espèces immobilisées car un très faible pourcentage de bactéries résiste à ce traitement⁸⁴.

⁷⁹ G. Carturan, R. Dal Monte, G. Pressi, S. Secondin, P. Verza (1998), *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 13, 273-281.

⁸⁰ V.M. Sglavo, G. Carturan, R. Dal Monte, M. Muraca (1999), *J. Mater. Sci.* 34, 3587-3590.

⁸¹ G. Pressi, R. Dal Toso, R. Dal Monte, G. Carturan (2003), *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 26, 1189-1193.

⁸² G. Carturan, R. Dal Toso, S. Boninsegna, R. Dal Monte (2004), *J. Mater. Chem.* 14, 2087-2098.

⁸³ U. Soltmann, H. Böttcher, D. Koch, G. Grathwohl (2003), *Mater. Lett.* 57, 2861-2865.

⁸⁴ U. Soltmann, H. Böttcher (2008), *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 48, 66-72.

Chapitre 2.

Objectifs et stratégie de réalisation

« We play out our days as we play out cards, taking them as they come, not knowing what they will be, hoping for a lucky card and sometimes getting one, often getting just the wrong one. »

Samuel Butler, écrivain, 1912.

Objectifs et stratégie de réalisation

2.1 Objectifs de la thèse

Actuellement, les traitements accessibles aux diabétiques imposent toujours des contraintes majeures qui alourdissent leur quotidien. Ce travail entre dans un axe global de recherche visant à proposer de nouveaux moyens pour traiter les maladies non-infectieuses par le développement de nouvelles technologies. En l'occurrence, l'objectif de cette thèse vise à concevoir un modèle d'organe artificiel via l'immobilisation de cellules animales au sein de matériaux abiotiques. Plus précisément, il consiste à synthétiser l'enveloppe qui va protéger les cellules du système immunitaire et permettre à ce nouvel organe de « fonctionner » grâce à son réseau poreux.

De façon à atteindre ces objectifs, cette enveloppe doit être biocompatible. Pour l'être, il faut qu'elle satisfasse une série de critères établis au moment du choix des matériaux à utiliser. Premièrement la méthode de synthèse ne peut pas interférer sur l'intégrité des cellules. Il faut qu'elle se réalise dans des conditions entrant en accord avec les changements que peuvent tolérer les cellules dans leur environnement direct. La matrice doit être inerte : ses interactions physiques (pression sur les membranes cellulaires), chimiques (perméabilisation de la membrane) et biologiques (perturbation du métabolisme) doivent être nulles autant que possible. De plus, dans un but médical, il ne faut pas que la forme soit traumatisante pour les tissus. L'ouverture est un point essentiel. Les pores doivent être suffisamment grands pour permettre les échanges de matières (entrée des nutriments, évacuation des métabolites), mais suffisamment petits que pour empêcher le système immunitaire d'y pénétrer et rejeter les cellules (immuno-protection ou immuno-isolation). L'inertie de la matrice s'inscrit également vis-à-vis de l'organisme-hôte qui ne devra pas rejeter l'implant. Enfin, il faut que le matériau, dont est faite la matrice, soit stable dans le temps et résistant pour ne pas avoir à répéter la chirurgie sur le patient. Tous ces critères sont résumés par la figure 2.1 dans le but d'immobiliser des cellules animales ou végétales¹.

¹ C.F. Meunier, P. Dandoy, B.-L. Su (2010), *J. Coll. Interf. Sci* 342, 211-224.

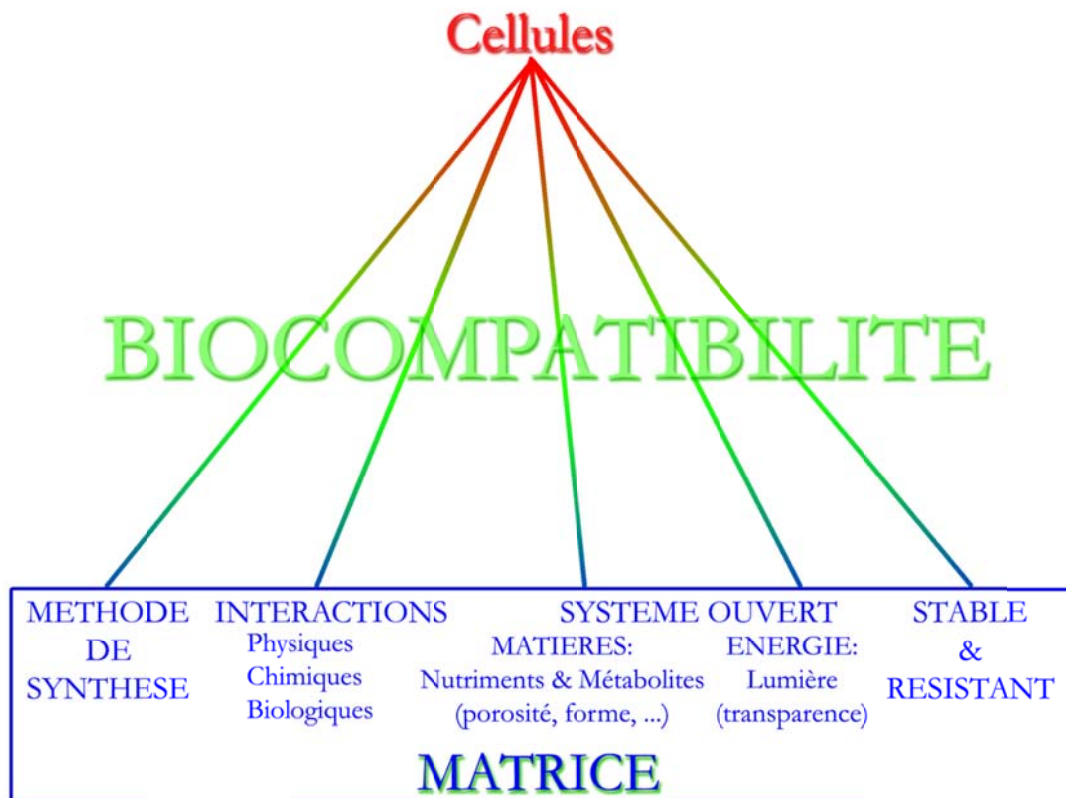


Figure 2.1 : Conditions requises pour la conception d'une matrice biocompatible.

2.2 Stratégie scientifique

La stratégie scientifique s'est déclinée en trois points :

- déterminer la cellule-modèle autour de laquelle toutes les études vont s'articuler ;
- choisir les matrices qui rencontrent les critères établis ;
- décider d'une méthode de synthèse et d'une voie d'immobilisation.

Dès l'instant où ils sont tous réunis, le matériau « vivant » né de l'union entre les cellules et les matrices sera soumis à de multiples analyses pour caractériser le matériau synthétisé et pour évaluer *in vitro* le maintien de l'activité des cellules immobilisées en son sein. Finalement, des études *in vivo* devront permettre d'estimer la réaction de l'organisme-hôte face au greffon.

2.2.1 La cellule-modèle : la cellule HepG2

Le diabète fait partie des premières maladies à être traitées par cette nouvelle technologie. Toutefois, ce n'est pas à partir des cellules qui en sont la cause que cette recherche fut entamée. En effet, cette thèse ouvre la voie d'une étude fondamentale sur la conception d'organes artificiels. Malheureusement, il n'est pas possible de développer une telle recherche sur des cellules β en laboratoire parce que ce sont des cellules beaucoup trop différenciées. Cela signifie que leur stade de développement est arrivé à un point tel qu'elles n'ont plus d'activité mitotique. De ce fait, leur culture en laboratoire est extrêmement compliquée et nécessite de lourds moyens économiques. Comme il n'existe pas de lignée de cellules β cultivables en laboratoire, il faut en contrepartie les extraire quotidiennement d'animaux (rats, souris, lapins, ...) de laboratoire pour poursuivre les expériences à long terme, ce qui n'est pas envisageable. En outre, au vu du nombre d'essais à accomplir pour optimiser la méthode de synthèse, caractériser la matrice obtenue puis tester la survie cellulaire, la disponibilité en cellules est un facteur très important.

En conséquence, par souci d'économie et de facilité, cette recherche s'est articulée autour d'autres cellules, très similaires aux cellules β : les hépatomes HepG2. Ces cellules ont constitué les cellules-modèles tout au long de ces recherches.

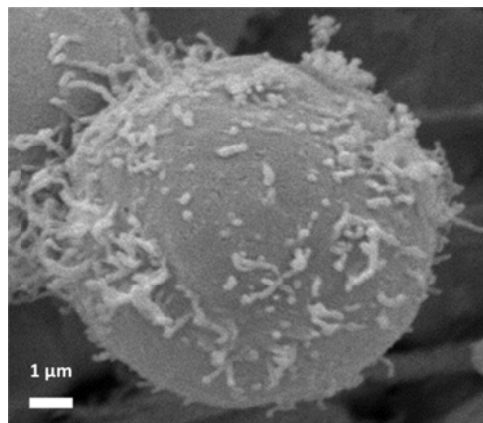


Figure 2.2 : Image obtenue par microscopie électronique à balayage d'une cellule HepG2.

Les cellules HepG2 sont des cellules cancéreuses de foie (figure 2.2) quotidiennement employées au département de biologie. Elles ont été choisies parce qu'elles permettent de se rapprocher au mieux des caractéristiques des cellules β . Leur morphologie est très semblable et elles sécrètent une protéine qui servira à mimer la diffusion de l'insuline hors

de la matrice. En effet, elles produisent l'albumine, une protéine très abondante dans notre sang dont le rôle intervient principalement dans le transport d'ions et d'hormones, dans le contrôle de l'acidité du sang et dans le contrôle du volume du sang circulant, avec un bon équilibre de la répartition de l'eau entre le sang et les tissus environnants. En conséquence, le dosage de l'albumine hors de la matrice au cours du temps sert de preuve du maintien de l'activité cellulaire après immobilisation. L'albumine étant onze fois plus volumineuse que l'insuline (66 kDa contre 5,8 kDa), sa détection permettra de s'assurer que l'insuline peut également s'évacuer de la matrice.

2.2.2 Choix des matrices

Le choix des matrices s'est porté sur la silice dans un premier temps. En effet, parmi les supports existants, la silice :

- permet de profiter de la synthèse dans les conditions douces (pression atmosphérique, température ambiante, pH physiologique) ;
- forme un matériau poreux dans la gamme visée pour l'immuno-isolation ;
- jouit d'une stabilité mécanique importante.

Ces trois points la mettent en évidence comparée à des polymères qui sont peu poreux, sont obtenus dans des conditions plus sévères (initiation radicalaire, cationique ou anionique) et ont une résistance moindre.

Dans un second temps, l'alginate fut également élu parmi les matrices pour les raisons qui seront détaillées plus longuement dans la partie résultats (chapitre 4).

2.2.3 Voie de synthèse

Parmi les types d'immobilisation présentés au chapitre précédent, celle *in situ* satisfait davantage d'attentes que la *post-synthèse*. Car ni les cellules β , ni les cellules HepG2 ne sont douées de mobilité, elles ne peuvent donc pas pénétrer jusqu'au cœur de la matrice préalablement synthétisée.

La méthode *in situ* suivie pour l'immobilisation a toujours été le procédé sol-gel, où les cellules sont en suspension dans leur milieu de culture, avant d'être mélangées au(x) précurseur(s) sous forme de liquide de la future matrice comme le schématise la figure 2.3.

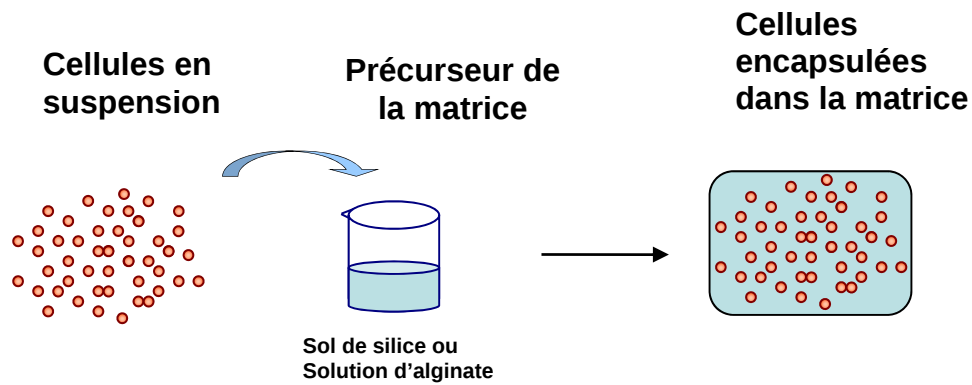


Figure 2.3 : Schéma de principe pour l'immobilisation *in situ* de cellules dans une matrice.

L'immobilisation par voie Biosil ou freeze-casting n'a pas été retenue en raison du désir d'innover dans cette technologie en développant des moyens simples et efficaces face à la complexité dans leur mise en œuvre respective ou face au faible taux de réussite engendré.

Chapitre 3.

Techniques de caractérisation employées au cours de cette thèse

« Bad times have a scientific value. These are occasions a good learner would not miss. »

Ralph Waldo Emerson, philosophe, 1860.

Techniques de caractérisation employées au cours de cette thèse

Diverses techniques de caractérisation ont été employées pour mettre en œuvre la conception des matrices, tester leur efficacité et évaluer le maintien de l'activité des cellules au cours du temps dans leur nouvel environnement.

3.1 Caractérisation des précurseurs de silice

La caractérisation de précurseurs de silice s'est effectuée grâce à la résonance magnétique nucléaire (RMN). Cette technique repose sur l'application d'un champ magnétique constant (B_0) provoquant une levée de dégénérescence des niveaux énergétiques des noyaux. L'application d'un second champ magnétique B_1 (variable et perpendiculaire au champ B_0) va induire des transitions entre ces niveaux d'énergie. Ces transitions ont lieu pour une certaine fréquence (fréquence de résonance), caractéristique du noyau étudié. Les pics obtenus sur le spectre RMN correspondent aux fréquences absorbées. Comme ces fréquences de résonance varient en fonction du champ externe appliqué, le signal est révélé sous forme d'un déplacement chimique exprimé en ppm. Ce déplacement est la différence entre la fréquence de résonance du noyau et celle d'une référence (le tétraméthylsilane, TMS, dans notre cas), permettant d'obtenir une mesure très précise de l'environnement chimique autour du noyau. En effet, tout l'intérêt de cette méthode de caractérisation réside dans le fait que le champ magnétique extérieur qui est imposé sur les noyaux va être modifié localement par la présence des autres noyaux (dépendance de l'environnement électronique). Cette modification reliant l'intensité du signal au nombre de noyaux subissant une transition donnée permet de connaître les populations relatives des différentes espèces.

Dans le cas de la RMN à l'état liquide, l'échantillon donne généralement un spectre bien résolu avec des raies fines. La situation est différente pour la RMN à l'état solide à cause de la rigidité du réseau solide qui empêche les noyaux de pouvoir vibrer librement. Il

en résulte des raies élargies, difficilement interprétables, qui sont imputées au phénomène d'interactions dipolaires entre spins nucléaires. Pour retrouver un spectre interprétable, il faut supprimer ces interactions en inclinant l'échantillon d'un angle de $54^{\circ}44'$ et en lui appliquant une rotation pour s'affranchir de l'inhomogénéité du champ dans le réseau solide. Cette rotation à l'angle magique (MAS : Magical Angle Spinning) fournira alors un spectre bien résolu et des raies fines.

Dans le cadre de cette thèse, les spectres de RMN à l'état solide ont été obtenus sur une machine de type Bruker Avance 500. De façon à pouvoir caractériser les précurseurs de silice synthétisés, la RMN du ^{29}Si a permis de fournir des informations sur l'environnement des atomes de silicium et d'ainsi pouvoir préciser le produit obtenu.

3.2 Caractérisation multi-techniques des matériaux synthétisés

Les divers matériaux synthétisés ainsi que ceux immobilisant des cellules HepG2 ont été caractérisés pour obtenir des informations concernant leur morphologie, leur porosité et le maintien de l'activité cellulaire.

3.2.1 Le séchage au CO_2 supercritique

Le séchage au CO_2 supercritique repose sur le principe que dans des conditions raisonnables de température et pression, au-delà de son point critique ($31,1^{\circ}\text{C}$ et $7,4\text{ MPa}$), l'interface liquide-gaz n'existe plus. Cette absence d'interface annule la présence de tension de surface au liquide qui gorgé les pores du matériau et empêche le phénomène de synérèse de se produire (condensation des groupements silanols à la surface des pores qui épaissit les parois et réduit donc le diamètre des canaux).

La première étape consiste à préparer l'échantillon de manière à pouvoir effectuer ce séchage. En effet, l'eau n'est pas miscible au CO_2 . Il implique donc de remplacer l'eau par un solvant miscible au CO_2 , en l'occurrence l'éthanol. Une fois le gel formé, il est plongé dans plusieurs bains d'éthanol absolu pour le déshydrater. Quand il ne reste plus que l'éthanol au sein des pores, le matériau est placé dans la cuve étanche d'un appareil qui va permettre d'échanger l'éthanol par du CO_2 . Ensuite, l'ensemble est chauffé jusqu'à 40°C où la pression augmente jusqu'à 8 MPa . (figure 3.1). A cet instant, une valve permet

l'évacuation lente du CO_2 hors des pores ce qui fournit l'aérogel. Cette opération fut effectuée sur un Critical Point Dryer de chez Leica.

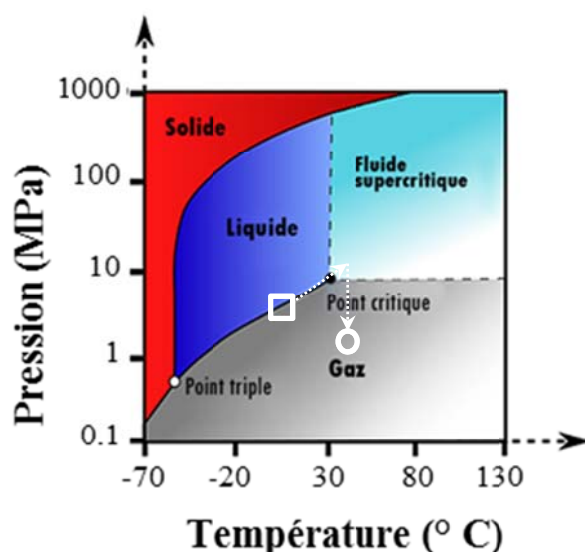


Figure 3.1 : Diagramme d'état du dioxyde de carbone. Au départ (carré blanc), le CO_2 est liquide. En augmentant la température jusqu'à 40°C, la pression augmente progressivement. Ensuite, la pression est lentement relâchée (rond blanc) à température constante jusqu'à 1 atm.

Dans le cadre de cette thèse, cette méthode s'est montrée indispensable pour pouvoir estimer la taille de pore de la matrice synthétisée, par adsorption-désorption d'azote et pour observer les matériaux au microscope électronique à balayage. En effet, il est impératif de connaître la taille de pore exacte de la matrice, un séchage du matériau dans une étuve provoquerait un effondrement de la structure et l'analyse rendrait une taille de pore inférieure à celle de l'hydrogel. Ce fut donc à partir de l'aérogel obtenu suivant cette méthode de séchage que nous avons pu avoir accès au diamètre des pores. De même, l'observation au microscope électronique devant se faire sur des matériaux secs, l'interprétation des micrographies serait faussée si ce n'est pas la réplique exacte de la matrice qui est placée dans l'appareillage.

3.2.2 L'analyse par adsorption-désorption d'azote (BET)

L'adsorption-désorption d'azote est une technique qui permet d'avoir accès à la taille de pore, au volume poreux et à la surface spécifique de la matrice. Ces différentes données permettant de savoir quel type de matériau (micro-, méso- ou macroporeux) fut synthétisé et d'évaluer sa pertinence pour une application comme la nôtre où la porosité est

un facteur déterminant de réussite. Toutes les mesures furent effectuées sur un Tristar 3000 de Micromeritics où les échantillons sont trempés dans un bain d'azote à 77° K tout au long de l'analyse, après avoir été dégagés de toute impureté par dégazage sous vide à température ambiante. Davantage de détails concernant le principe, les hypothèses et les calculs sur lesquels repose cette technique seraient trop longs à présenter ici et sont repris dans l'annexe B.

3.2.3 La microscopie électronique à balayage (MEB)

Le microscope électronique à balayage informe de la morphologie du matériau et permet l'observation d'échantillons d'une taille bien inférieure à ce que permet le microscope optique. Son principe de fonctionnement et ses avantages sont avancés dans l'annexe C. Dans le cadre de cette thèse, la microscopie électronique à balayage a permis d'observer les cellules HepG2 immobilisées dans la matrice, d'étudier la morphologie des matériaux synthétisés et la dispersion des cellules au sein de la matrice. Ces études ont été effectuées après que les échantillons aient préalablement été recouverts d'une pellicule d'or soit sur un microscope Philips XL 20, soit sur un JEOL JSM-7500F. La méthode EDX (Energy Dispersive X-ray) couplée au MEB fut employée pour identifier les proportions atomiques constituant le matériau.

3.2.4 La spectrofluorimétrie

La spectrofluorimétrie ou spectroscopie de luminescence est une technique de caractérisation qui permet l'analyse chimique (dosage, détection) de molécules fluorescentes au sein d'échantillons à analyser. Le spectrofluorimètre employé fut le Perkin Elmer LS45.

Le diagramme de Perrin-Jablonski (figure 3.2) permet d'illustrer le déroulement du phénomène de fluorescence. Cette dernière provient des échanges d'énergie – ou transition – entre les orbitales frontières LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital) et HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) du fluorophore. Au repos, la molécule est sur un des niveaux vibrationnels V_i de l'état électronique fondamental S_0 (état singulet). Une fois l'énergie d'un photon absorbée, il se trouve sur un des niveaux V_i de l'état excité.

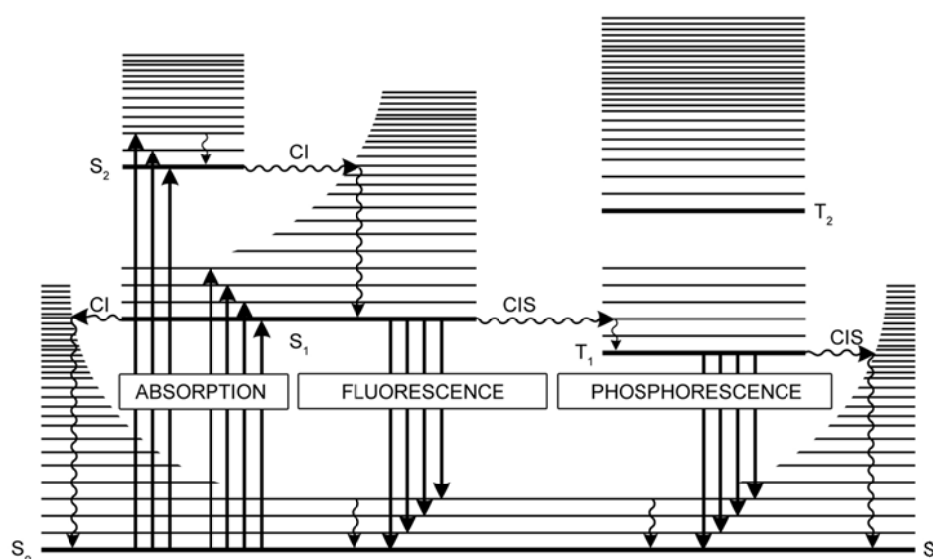


Figure 3.2 : Diagramme de Perrin-Jablonski.

Ce fluorophore va ensuite se désexciter suivant diverses manières (tableau 1) où les transitions entre états électroniques peuvent être de deux types : *radiatives* ou *non-radiatives*.

Même multiplicité de spin		Changement de multiplicité de spin	
<i>Radiative</i>	<i>Non-radiative</i>	<i>Radiative</i>	<i>Non-radiative</i>
Fluorescence (10^{-10} - 10^{-7} s)	Conversion interne (10^{-11} s)	Phosphorescence (10^{-6} - 10^0 s)	Conversion Intersystème (10^{-9} s)

Tableau 1 : Transition des états électroniques.

Si les états impliqués dans la transition sont de même multiplicité, la transition radiative est appelée *fluorescence*, et la transition non-radiative est appelée *conversion interne* (CI) (figure 3.3). Si la transition implique un changement de multiplicité de spin (singulet $\rightarrow$ triplet), on parle de *phosphorescence* si elle est radiative et de *croisement intersystème* si elle est non-radiative.

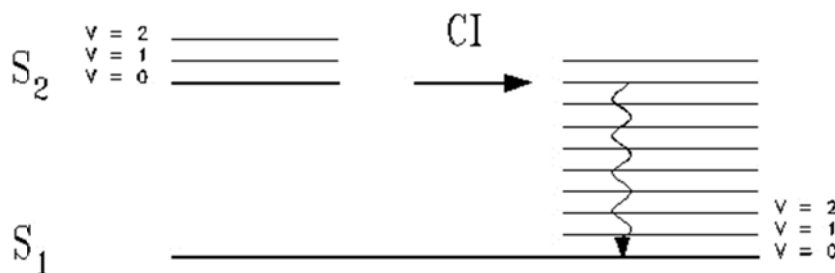


Figure 3.3 : Conversion interne.

Dans le cadre de cette thèse, la fluorescence a permis d'évaluer la taille des molécules capables de diffuser au travers de la matrice et ainsi de mieux estimer l'immuno-isolation apportée. Ce même phénomène est également exploité dans le microscope optique à fluorescence détaillé ci-après au point 3.3.2.

3.3 Caractérisation biologique des matériaux « vivants »

L'activité des cellules immobilisées a été mise en évidence par oxymétrie et par observation de l'activité estérase, techniques qui sont expliquées *infra*, ainsi que par le dosage de l'albumine comme annoncé dans le point 3.4 par test ELISA.

3.3.1 L'oxymétrie

L'oxymètre, ou senseur à oxygène de Clark, est une méthode mesurant la concentration en oxygène dans une solution par mesure du courant électrique en appliquant une tension qui favorise la polarisation de l'électrode de travail. Son fonctionnement se fonde sur une voltampérométrie hydrodynamique : le potentiel est fixé et on mesure l'intensité du courant électrique qui passe entre les électrodes. L'oxymètre utilisé au cours de cette recherche est un Oxy-Lab de chez Hansatech dont le fonctionnement est expliqué dans l'annexe D.

Dans le cadre de cette thèse, l'oxymétrie s'est montrée indispensable pour mettre en évidence le maintien de l'activité des cellules. La consommation de l'oxygène en fonction du temps étant reliée à la respiration des cellules HepG2 dans les différentes matrices synthétisées, elle sert d'analyse de la survie cellulaire.

3.3.2 La microscopie à fluorescence

Cette méthode d'observation repose sur l'exploitation de la fluorescence émise par un échantillon placé sur la lame porte-objet d'un microscope optique. Son apport est complémentaire aux informations recueillies par l'observation traditionnelle avec la lumière visible. De façon à détecter la fluorescence envoyée par l'échantillon, ce microscope est pourvu de filtres, sélectionnés par l'utilisateur, qui laissent passer une gamme précise de

longueurs d'onde. Un premier filtre sélectionne la longueur d'onde d'excitation correspondante au fluorophore présent dans l'échantillon à observer. Ensuite, la longueur d'onde réémise par fluorescence traverse un filtre barrière derrière lequel se trouve l'oculaire. De cette manière, des images invisibles à la lumière visible apparaissent clairement grâce à la fluorescence des éléments de l'échantillon.

Dans le cadre de cette thèse, cette microscopie a eu deux objectifs distincts. Un premier pour caractériser le matériau obtenu en identifiant la présence de silice (grâce à la PDMPO^a), et un second pour pointer le maintien de l'activité estérase des cellules (grâce à la FDA^b) après leur immobilisation. Ces observations ont eu lieu sur un microscope Multizoom AZ100 de chez Nikon.

En pratique, la fluorescence de la PDMPO est intensifiée en présence de silice et fut utilisée pour marquer les zones où la silice s'est formée dans certains matériaux. Dans le cas de la FDA, elle est perméable aux membranes cellulaires. Quand cette molécule entre dans la cellule, les estérases qui sont présentes dans le cytoplasme l'hydrolysent et libèrent la fluorescéine dont la fluorescence est détectée par le microscope. Si la cellule est intacte (et par voie de fait, sa membrane), la fluorescéine s'accumule dans la cellule et sert d'indice du maintien de la viabilité cellulaire.

3.4 Le test ELISA

Le test ELISA, acronyme de « *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* », est une méthode enzymatique pour détecter et doser une molécule dans un échantillon. Il existe plusieurs types de tests ELISA, celui qui a toujours été employé au cours de ces recherches fut l'ELISA en sandwich (figure 3.4) :

Un anticorps (dit primaire) spécifique à la molécule que l'on veut doser est adsorbé au fond de chaque puits d'une plaque 96 puits. L'échantillon dans lequel se trouve la molécule à doser y est déposé, la molécule va se lier à l'anticorps immobilisé. Après rinçage des puits (élimination des composés de l'échantillon qui ne sont pas liés à l'anticorps primaire), un nouvel anticorps (dit secondaire) couplé à une enzyme est ajouté dans les puits. Il est également spécifique à la molécule que l'on veut doser. Après un nouveau cycle de rinçages, où est éliminé l'excès d'anticorps secondaire, le substrat de l'enzyme est ajouté et sa transformation en un produit coloré sera catalysée par l'enzyme. Plus il y aura de

^a PDMPO : Le 2-(4-pyridyl)-5-((4-(2-diméthylaminocarbamoyl)méthoxy)-phényl)oxazole.

^b FDA : Le diacétate de fluorescéine.

molécules à détecter, plus il y aura d'enzymes qui produisent du chromophore. L'absorbance de la solution est donc directement proportionnelle à la concentration en molécules dans la solution de départ et est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible spécialement conçu pour accueillir ces plaques multi-puits. A l'aide de standards, il est alors possible de connaître la concentration de la molécule dosée en fonction de la densité optique mesurée.

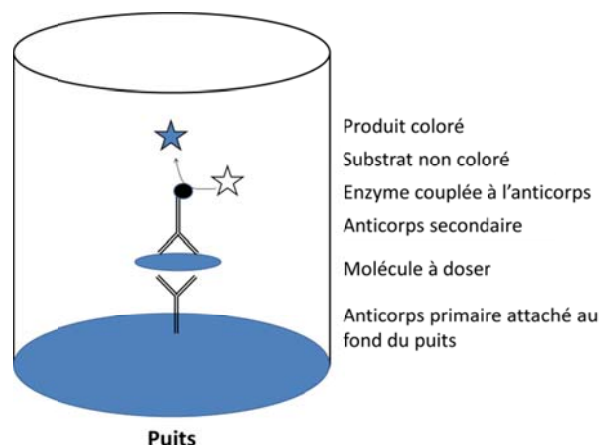


Figure 3.4 : Schéma du principe du test ELISA en sandwich.

Dans le cadre de cette thèse, deux tests ELISA furent utilisés :

- Un premier pour évaluer la réponse proinflammatoire causée par la présence de silice ou d'alginate au voisinage de cellules du système immunitaire, les monocytes THP-1. Une fois activés, ces derniers se différencient en macrophages et libèrent de l'IL-8. La présence et le dosage de cette cytokine est un indicateur d'une réponse proinflammatoire ;
- Un second pour pointer la diffusion de l'albumine sécrétée par les cellules par les HepG2 hors de la matrice.

Chapitre 4.

Conception d'une matrice adaptée à l'immobilisation de cellules animales

*« L'observable n'a pas d'intérêt en soi. Ce qui est
intéressant, c'est l'interprétation qu'on en tire. »*

Marc Ollivier, astrophysicien, 2006.

Conception d’une matrice adaptée à l’immobilisation de cellules animales

Ce chapitre traite des expériences réalisées pour déterminer quels précurseurs d’une matrice se montrent les plus appropriés à l’immobilisation de cellules animales. Une fois choisis et la voie de synthèse mise au point, ces précurseurs ont servi à immobiliser des cellules HepG2. Les matrices obtenues ont été caractérisées par les techniques mentionnées précédemment, tout comme la viabilité des cellules au cours du temps après l’encapsulation.

4.1 Culture cellulaire et préparation des cellules pour l’immobilisation

En culture, les cellules forment un tapis sur le fond de la boîte de Pétri qui est recouvert par un mélange de milieu de culture et de sérum veau fœtal. Ce milieu (DMEM, Invitrogen)^a compte dans sa composition des sels, des acides aminés et des vitamines, et le sérum fournit l’ensemble de facteurs de croissance qui vont signaler aux cellules de proliférer. Les HepG2 sont des cellules adhérentes, c’est pourquoi elles forment un tapis pendant leur culture. Pour pouvoir les repiquer (et *a fortiori* les immobiliser), il convient de digérer la matrice extracellulaire qui lie les cellules les unes aux autres pour les mettre en suspension dans une nouvelle boîte de culture. Pour ce faire, les manipulations suivantes devaient être exécutées deux fois par semaine :

- 1°) Le milieu de culture est retiré de la boîte ;
- 2°) Le tapis cellulaire est rincé par 5 mL de PBS^b. Cette solution permet de nettoyer les cellules du sérum qui contient des inhibiteurs de la trypsine utilisée à l’étape suivante.

^a http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Product-Technical-Resources/media_formulation.180.html consulté le 7 décembre 2006.

^b *Phosphate Buffer Solution*, le PBS est une solution isotonique pour les cellules composée de NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄

- 3°) Après ce rinçage, le PBS est éliminé et 2 mL d’un mélange de trypsine et d’EDTA (respectivement 0,05 % et 0,02 % dans du milieu sans sérum) sont ajoutés dans la boîte sur le tapis cellulaire. La trypsine est une protéase, se trouvant habituellement dans le système digestif, capable de couper l’extrémité C-terminale de certaines protéines. Elle se charge de cliver les chaînes peptidiques de la matrice extracellulaire. Cette action est inhibée par la présence du sérum qui contient l’ α 1-antitrypsine et des ions calcium et du magnésium, c’est pourquoi le rinçage est indispensable.
- 4°) Après une à deux minutes à 37°C (température optimale d’action de la trypsine), toutes les cellules se sont décrochées, elles sont alors transvasées dans un tube à essai et mélangées à 5 mL de milieu de culture frais avec sérum.
- 5°) Le tout est centrifugé 4 minutes à 1000 rpm pour recueillir les cellules dans le culot tandis que le surnageant (qui contient toujours la trypsine) est retiré. Du milieu frais avec sérum (8 mL) permet de resuspendre les cellules.
- 6°) Deux millilitres de cette suspension sont prélevés, mis dans une nouvelle boîte de culture et complétés par 18 mL de milieu frais avec sérum. Le repiquage est terminé, la boîte est placée à l’étuve (37°C, CO₂ 5 %) où les cellules vont sédimenter, former de la matrice extracellulaire, s’accrocher au fond de la boîte et proliférer jusqu’au prochain repiquage.

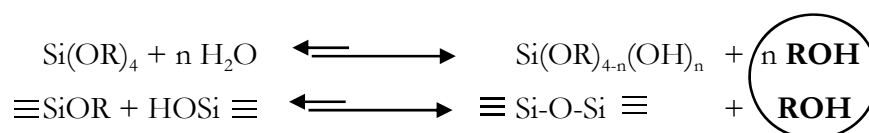
C’est au stade 6° que les cellules en suspension sont récupérées pour être immobilisées ultérieurement. Il est important de noter qu’au cours du mélange avec le sol, le milieu de culture se retrouve inévitablement dilué. Par conséquent, le temps que prend le processus de polycondensation doit être le plus court possible pour que les effets sur les cellules soient minimales. De cette manière, dès que la formation d’un gel est avérée, il est recouvert de quelques millilitres de milieu de culture avec sérum pour assurer l’osmolarité du milieu et la nutrition des cellules.

4.2 Test de cytotoxicité des produits présents dans le sol

Une fois que les cellules sont en suspension et prêtes à être immobilisées, les précurseurs de silice sont mélangés à celles-ci pour obtenir le gel. Au cours de cette immobilisation *in situ*, les cellules sont en contact direct avec les composants du sol qui pourraient présenter une certaine toxicité. Par exemple l’immobilisation des cellules via l’utilisation d’alkoxydes de silice commerciaux comme le tétraméthoxysilane (alias TMOS pour $\text{Si}(\text{OMe})_4$) et le tétraéthoxysilane (alias TEOS pour $\text{Si}(\text{OEt})_4$) libèrent une large quantité d’alcool au cours des étapes d’hydrolyse et de condensation, le méthanol et l’éthanol en l’occurrence.

Toutefois, le concept de toxicité implique toujours une notion de quantité à partir de laquelle le composé est toxique. Par conséquent, la première étude mise en œuvre fut d’établir les limites de cytotoxicité de diverses molécules présentes dans le sol. Si l’objectif est de créer un matériau qui va protéger les cellules, il faut commencer par connaître les conditions qui préservent leur membrane intacte sous peine de mort cellulaire. De cette manière, au moment de la conception de la matrice, nous serons conscients de la limite de concentration du composé à ne pas dépasser pour réussir l’immobilisation. En conséquence de quoi, les conditions de synthèse seront adaptées pour ne pas dépasser le seuil de tolérance des cellules. Les résultats obtenus par cette étude ont permis d’appliquer les stratégies proposées auparavant dans la littérature :

➤ La distillation de l’alcool libéré dans le sol avant l’ajout des cellules¹ :



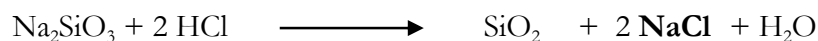
Cette méthode permettra de présenter aux cellules un sol dont la concentration en éthanol ou méthanol ($\text{R} = \text{Me}$ ou Et) est diminuée jusqu’à une valeur limite déterminée par le test de cytotoxicité.

¹ M.L. Ferrer, F. Del Monte, D. Levy (2002), *Chem. Mater.* 14, 3619-3621.

- La conception d’une matrice par la voie biocompatible, où le produit secondaire est un polyol qui possède des propriétés en accord avec l’immobilisation cellulaire, il n’y a donc plus d’étape de distillation à franchir.

En fonction du seuil de cytotoxicité révélé par le test qui va suivre, un polyol-silane pourra être synthétisé pour conduire à un sol dont les produits secondaires sont biocompatibles² (R = polyol).

- La conception d’une matrice par la voie aqueuse^{3,4}.



La concentration maximale en sodium que peuvent tolérer les cellules sera un indicateur de la quantité de ce précurseur à pouvoir être mélangé aux cellules HepG2 pour leur immobilisation. Un excès d’ions sodium augmente l’osmolarité du milieu, ce qui entraîne la mort des cellules par perte d’eau.

4.2.1 Choix des composés à tester

En accord avec la stratégie avancée au point précédent, les cellules HepG2 ont été mises en présence de plusieurs produits secondaires sélectionnés en fonction de leur pertinence à être utilisés pour cette recherche. En plus, du méthanol et de l’éthanol précédemment évoqués, des polyols comme le glycérol et le 1,2,4-butanetriol constituèrent les composés dont la toxicité devait être évaluée. Il en fut de même pour le chlorure de sodium et des nanoparticules de silice.

L’éthanol et le méthanol, alcools à chaîne aliphatique courte, sont connus pour être capables d’intégrer la bicouche de phospholipides qui constitue la membrane d’une cellule et la rendre perméable, ainsi que pour dénaturer les protéines en brisant leurs ponts hydrogène^{5,6}. Cependant, il convenait de connaître leur toxicité dans nos conditions

² I. Gill, A. Ballesteros (1998), *J. Am. Chem. Soc.* 120, 8587-8598.

³ D.-M. Liu, I.W. Chen (1999), *Acta Mater.* 47, 4535-4544.

⁴ K.S. Finnie, J.R. Barlett, J.L. Woolfrey (2000), *J. Mater. Chem.* 10, 1099-1101.

⁵ R.C. Bean, W.C. Shepherd, H. Chan (1968), *J. Gen. Physiol.* 52, 495-508.

⁶ B.W. Lee, R. Faller, A.K. Sum, I. Vattulainen, M. Patra, M. Karttunen (2004), *Fluid Phase Equilib.* 225, 63-68.

expérimentales utilisant les cellules HepG2. Nous avons donc déterminé avec précision la concentration maximale que ces cellules peuvent tolérer en fonction de leur temps de contact avec ces alcools.

La toxicité du glycérol et du 1,2,4-butanetriol fut également investiguée. Le premier a déjà fait ses preuves en biologie puisqu’il est régulièrement utilisé comme cryoprotectant. En effet, en cryopréservation, au cours du refroidissement, l’eau à l’intérieur des cellules conduit à la formation de cristaux de glace qui endommagent leur membrane. Pour éviter cela, du glycérol est utilisé pour diminuer cette cristallisation parce qu’il est capable de pénétrer la membrane. Vu cette propriété, dans notre cas, il importe de s’informer de la concentration à partir de laquelle sa pénétration dans les cellules est trop importante et mène à leur mort. Le 1,2,4-butanetriol n’est pas un composé utilisé à des fins biologiques. Bien qu’il soit produit par des bactéries pour l’industrie militaire en tant que précurseur de la nitroglycérine⁷, il se montre intéressant pour notre application. En effet, ses caractéristiques sont proches de celles du glycérol. Tout d’abord, dans sa chaîne, il ne varie de son homologue que par un atome de carbone supplémentaire (figure 3.1), sa pénétration à travers la membrane devrait être moindre. Ensuite, dans l’optique de la synthèse d’un précurseur, il est liquide à température ambiante comme le glycérol. Cet avantage permettra de ne pas employer de solvant au moment de la conception du nouveau précurseur. Sa température d’ébullition élevée (300°C), permettra d’éliminer le méthanol (dont la température d’ébullition est de 65°C) en fin de réaction sans affecter le 1,2,4-butanetriol.

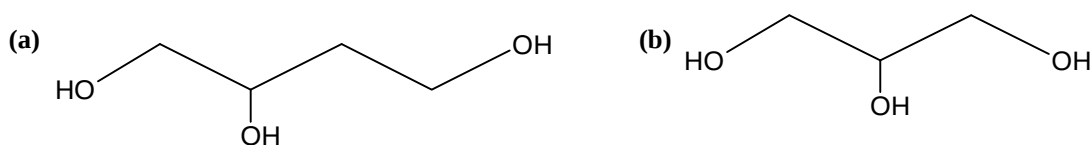


Figure 3.1. : Structure du (a) 1,2,4-butanetriol et du (b) glycérol.

Le chlorure de sodium fut l’objet d’une évaluation de sa toxicité parce que la force ionique joue également un rôle prépondérant dans la viabilité des cellules. Or, dans l’hypothèse d’une encapsulation par la voie aqueuse, où le précurseur est le silicate de sodium, une importante concentration en sodium se retrouve dans le voisinage direct des

⁷ W. Niu, M.N. Molefe, J.W. Frost (2003), *J. Am. Chem. Soc.* 125, 12998-12999.

cellules. Il importait par conséquent de connaître également la concentration à partir de laquelle il est néfaste aux cellules HepG2.

Enfin, des particules colloïdales de silice (aérosil) dans le milieu de culture furent utilisées pour s’informer de l’innocuité de la silice envers les cellules HepG2.

4.2.2 Principe et élaboration du test de cytotoxicité

Le principe de ce test de cytotoxicité se base sur un dosage de la quantité de la lactate déshydrogénase (LDH) présente dans le surnageant d’une culture cellulaire suite au stress provoqué par les produits (alcools, NaCl et silice). La LDH est une enzyme intracytoplasmique des cellules. Sa présence dans le surnageant d’une culture cellulaire est un indicateur d’une perméabilisation excessive des membranes, menant à la mort des cellules si elles sont détruites.

Cinquante mille cellules HepG2, comptées grâce à une chambre de Neubauer (Annexe E), ont étéensemencées pendant 24 h dans les puits d’une microplaque 24 puits. Ensuite, les composés précités ont été mélangés au milieu de culture des cellules à diverses concentrations pour pointer la limite de tolérance des cellules pendant une période d’incubation de 5 h. Passé ce délai, le surnageant est récupéré et les cellules volontairement lysées, ceci permettant de connaître la concentration totale en LDH dans chaque puits. La LDH est alors mesurée à l’aide d’un test enzymatique repris dans l’annexe F. Sa concentration dans le surnageant est reportée en fonction de la concentration totale et permet d’obtenir le pourcentage de cytotoxicité du composé à une concentration donnée. Plus le pourcentage est élevé, plus la LDH a été libérée à partir des cellules dont la membrane plasmique n’était pas intacte et plus le composé testé est toxique.

4.2.3 Cytotoxicité des composés

Plusieurs concentrations ont été testées pour chacun des composés. Les plus fortes concentrations sont délibérément exagérées pour servir de test positif et clairement mettre en évidence une augmentation de la quantité de LDH dans le milieu de culture, synonyme de mort cellulaire.

Le pourcentage de LDH obtenu grâce au triplicat contrôle est la référence. En effet, il s’agit de la concentration de LDH libérée suite à la mort naturelle des cellules puisqu’aucune contrainte ne leur a été imposée. Au-delà d’une valeur de 6,6 ($\pm 2,4$) %, il faut considérer le composé comme toxique à la concentration étudiée. Les résultats concernant cette étude sont regroupés dans le graphe de la figure 3.2.

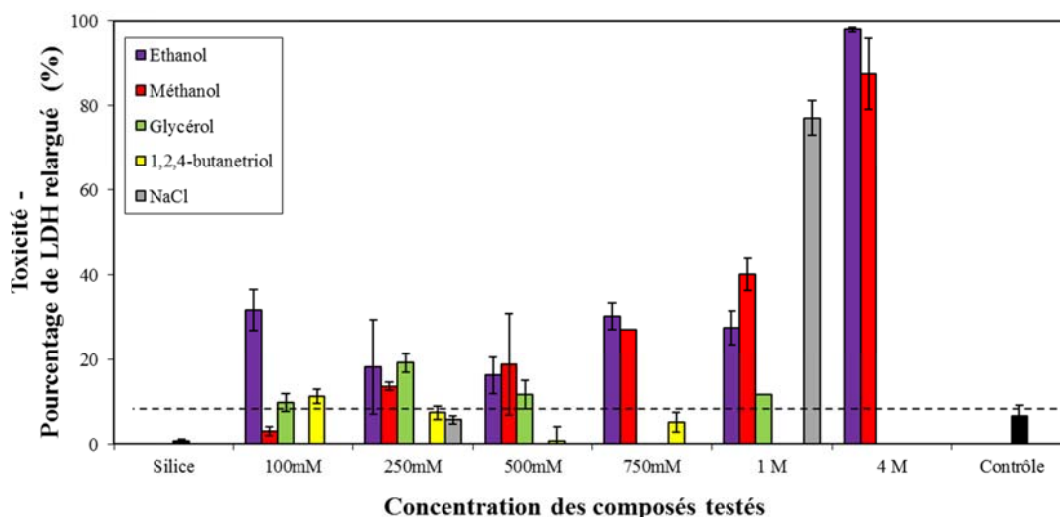


Figure 3.2. Effets des différents composés testés sur la survie des HepG2 après une incubation de 5h. La détérioration de la membrane cellulaire sous l’action des composés provoque sa perméabilisation et libère la LDH qui est mesurée par ce test de cytotoxicité. Les résultats sont présentés en tant que moyenne ± 1 écart-type pour $n = 3$.

L’éthanol est létal à toutes les concentrations testées, contrairement au méthanol qui n’est pas toxique en-deçà de 250 mM, mais la toxicité augmente dramatiquement au-delà. Parmi les polyols, la quantité de LDH détectée dans le milieu des cellules incubées en présence de glycérol est toujours supérieure à la limite fixée par les contrôles mais ces données semblent suggérer que sa toxicité sur les cellules HepG2 ne dépend pas de sa concentration. Ses propriétés pénétrantes sont probablement dues à ce phénomène. Cependant, le relargage n’étant jamais élevé, il ne faut pas le relier à une réelle toxicité du glycérol. Tout comme lui, la toxicité du 1,2,4-butanetriol semble être indépendante de sa concentration. Le désir d’augmenter la longueur de chaîne du polyol se révéla donc approprié puisqu’il semble globalement se présenter moins toxique que le glycérol. Le NaCl provoque la mort des cellules à 1 M, ce qui imposera de ne pas dépasser cette valeur lors de l’encapsulation de cellules *via* la voie aqueuse. Finalement, la totale innocuité de la silice

envers les cellules HepG2 a été démontrée par ce test puisque seul 1 % des HepG2 sont mortes à son contact.

L’objectif recherché fut de mettre en évidence la toxicité de divers produits relargués dans le sol pour optimiser l’immobilisation des cellules. A présent que leur concentration limite de toxicité est connue, nous avons entrepris de préparer des sols qui rejoignent ces conditions non-toxiques.

4.3 Synthèse d’une matrice silicée

Les points suivants traiteront de la préparation du sol de silice à partir des informations collectées par le test de cytotoxicité. Le TMOS et le TEOS durent d’entrée être écartés. Dans les deux cas, la distillation des alcools conduit à un sol instable où la polycondensation est très compliquée à maîtriser suite à l’évaporation associée de l’eau. Cette perte d’eau augmente considérablement la concentration des clusters silicés et pourraient mener à la formation du réseau avant l’incorporation des cellules.

Au cours de la condensation, pour déterminer les meilleures conditions de synthèse, la présence d’un indicateur coloré dans le milieu de culture des cellules permet d’établir un premier critère de biocompatibilité. En effet, comme énoncé au point 4.1, les conditions de culture des cellules en laboratoire sont déterminées de manière à s’écarter le moins possible de leurs conditions naturelles de vie (pH physiologique de 7,4, 37°C, nutriments et facteurs de croissance). De ce fait, au cours de toute immobilisation les cellules sont en suspension dans leur milieu de culture avec sérum au moment où le sol de silice y est déversé. Or, le milieu contient un indicateur, le rouge de phénol, qui est rouge au pH physiologique. Si l’acidité est trop importante, il vire au jaune et devient mauve si la valeur du pH augmente trop (figure 3.3).



Figure 3.3 : Domaine de pH de l’indicateur rouge de phénol avec ses variations des couleurs.

Sa couleur est donc une source d’information sur les bonnes conditions de culture des cellules. Au cours de cette thèse, nous avons profité de ses propriétés pour la conception

des gels. En effet, des gels d’une couleur jaune ou mauve devaient obligatoirement être évités pour assurer la survie des cellules. Le sol a donc toujours été préparé indépendamment des cellules, stérilisé (au travers d’un filtre 0,22 μm ou par traitement en autoclave à 120°C pendant 20 minutes) puis versé sur les cellules en suspension dans leur milieu.

Ensuite, à partir du sol ainsi préparé, le gel est formé de façon à ce qu’il n’excède pas un volume de 1 mL. En effet, plus tard, lorsque vint le temps d’étudier la survie des cellules immobilisées dans le gel, leur viabilité fut en partie déterminée par mesure de la quantité d’oxygène consommé par les cellules dans une cuve étanche ayant un volume de 1 mL (annexe D).

4.3.1 Vers une voie biocompatible

Toujours sur la base des conclusions du test de cytotoxicité, la synthèse de polyolsilanes a débuté avec le glycérol et le 1,2,4-butanetriol. Les précurseurs ainsi obtenus seront par la suite employés pour mener à la formation d’un gel de silice.

4.3.1.1 Le diglycérylsilane⁸

Le diglycérylsilane (DGS) fut synthétisé par mélange de 18,65 g de glycérol anhydre avec 20,54 g de TEOS. Le mélange est chauffé à reflux pendant 24 h à 130°C sous agitation (300 rpm). Passé ce délai, l’éthanol est retiré du ballon réactionnel par distillation de manière à déplacer l’équilibre en faveur de la formation du DGS. Seule une partie de l’éthanol est éliminé, et ce qui n’a pas réagi est éliminé en chauffant à 160°C sous pression réduite (180 mbar) durant 18 h. Il en résulte une poudre blanche caractérisée par RMN du ²⁹Si (figure 3.4). Le spectre de cette molécule ne doit indiquer qu’un seul pic à environ -82 ppm, avec une notation Q_0 signifiant qu’il n’existe pas de lien Si-O-Si, selon la littérature. Dans notre cas, outre le pic à -82 ppm (Q_0) très intense, sont observés deux autres signaux à -89 ppm et -96 ppm. Ils proviennent de silicium dont le DGS a subi une hydrolyse partielle au cours de la synthèse ou du stockage du produit et sont annotés Q'_1 et Q'_2 , respectivement.

⁸ T.R. Besanger, Y. Chen, A.K. Deisingh, R. Hodgson, W. Jin, S. Mayer, M.A. Brook, J.D. Brennan (2003), *Anal. Chem.* 75, 2382-2391.

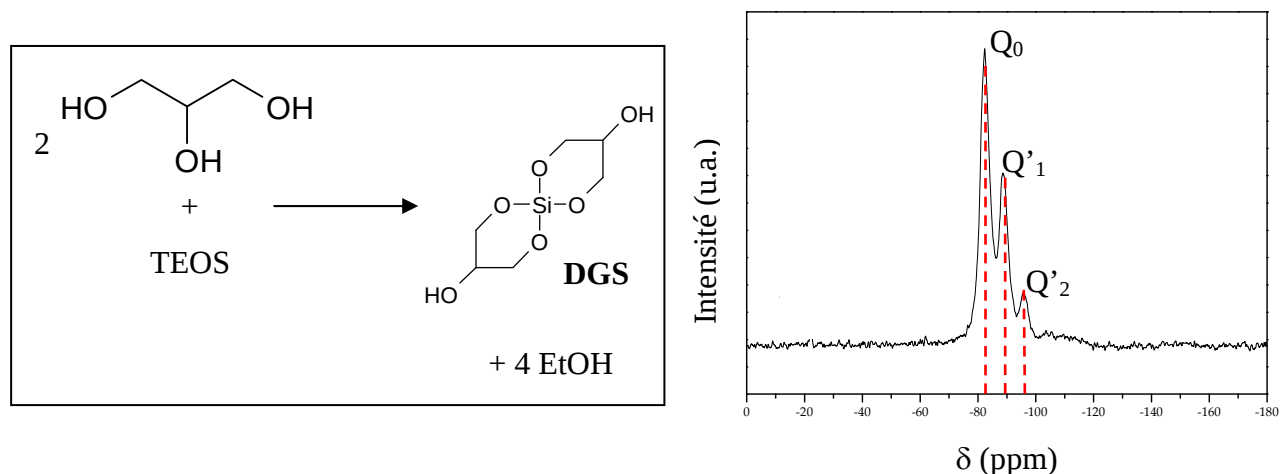


Figure 3.4 : Synthèse et spectre RMN ^{29}Si du diglycérylsilane synthétisé.

La plus haute concentration testée lors du dosage de la LDH étant de 1 M, le sol de DGS fut préparé de façon à ce que la concentration du polyol ne dépasse pas cette valeur une fois en contact avec les cellules. Pour cela, 1 g de DGS est dissout dans 5,0 mL d'eau distillée ($\text{pH} \approx 6,5$), 3 gouttes de KOH 0,17 M (pour maintenir la couleur rouge de l'indicateur) sont versées sur 0,5 mL de ce sol et le tout est mélangé à 0,5 mL de milieu de culture avec sérum. Ce procédé permit d'obtenir un gel en 20 minutes.

4.3.1.2 Le dibutylsilane

Le dibutylsilane (DBS) fut synthétisé au départ de 10,6 g de 1,2,4-butanetriol (96 %) mélangés sous une agitation de 400 rpm à 5,1 g de TMOS et chauffés à reflux à 100°C durant 24 h. Le méthanol est alors éliminé du bain réactionnel par distillation et le produit est séché à 120°C sous 200 mbar jusqu'au lendemain, puis stocké et caractérisé par RMN du ^{29}Si . Cette analyse atteste du succès de la synthèse grâce à la très grande proportion des pics Q_0 (82 %) sur le spectre de la figure 3.5 centrés à un déplacement chimique de -82 ppm.

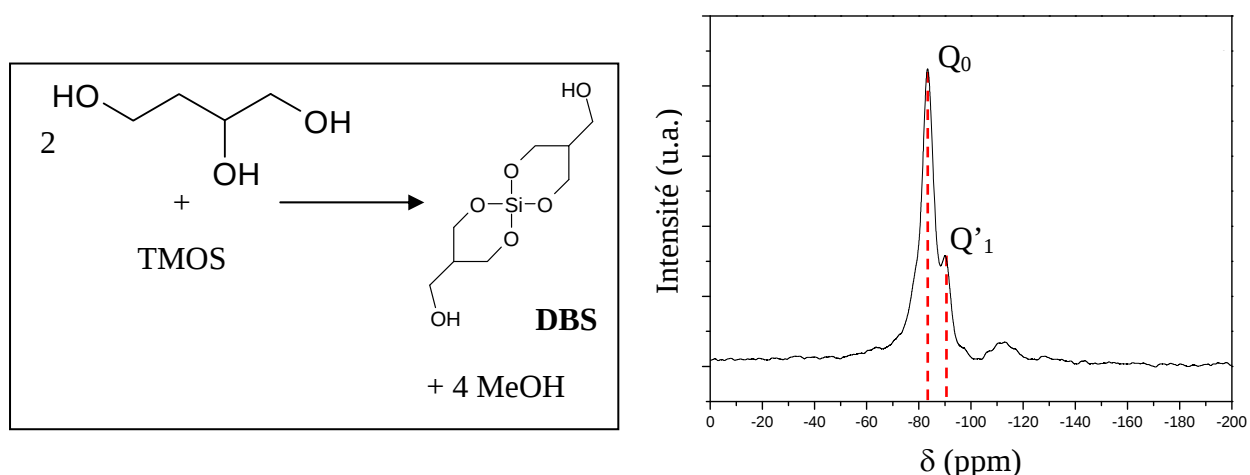


Figure 3.5: Synthèse et spectre RMN ^{29}Si du dibutylsilane

Le produit final est un solide brunâtre et collant. La préparation du sol s’est révélée particulièrement compliquée parce que le DBS ne se fragmentait pas malgré une vigoureuse agitation. La surface de précurseur en contact avec l’eau ($\text{pH} = 2$) étant très restreinte, ses étapes d’hydrolyse et condensation sont extrêmement lentes. En conséquence, devant le temps que prenait cette première étape primordiale et bien que le test de cytotoxicité ait fait de lui un produit secondaire biocompatible, son exploitation fut abandonnée pour l’immobilisation de cellules puisque l’obtention d’un sol n’a pu aboutir.

4.3.2 Vers une voie aqueuse

En-dessous de 1 M la concentration en NaCl n’est pas délétère à l’activité cellulaire des HepG2. En conséquence, le sol fut préparé en s’inspirant d’un protocole de la littérature impliquant un mélange de silicate de sodium (Na_2SiO_3) et de particules colloïdales de silice (Ludox HS40)⁹ : 0,25 mL de Ludox (8,5 M) mélangé à 0,25 mL de Na_2SiO_3 (0,5 M) où est ajouté 1 goutte de HCl (1,5 M) constituent le sol. Il est versé sur 0,5 mL de milieu de culture avec sérum et fournit un gel en 30 minutes.

Une seconde méthode de préparation fut également envisagée dans laquelle les ions sodium du silicate de sodium sont échangés grâce à une résine acide (Amberlite IR120-H)^{10,11}. Tout d’abord, la résine est nettoyée par rinçage à l’HCl ($\text{pH} = 2$). Elle est conservée durant 1 h à 4°C puis du silicate de sodium (1,5 M) est filtré au travers au moyen

⁹ A. Coiffier, T. Coradin, C. Roux, O.M.M. Bouvet, J. Livage (2001), *J. Mater. Chem.* 11, 2039-2044.

¹⁰ C.F. Meunier, P. Van Cutsem, Y.-U. Kwon, B.-L. Su (2009), *J. Mater. Chem.* 19, 4131-4137.

¹¹ H. Nishihara, S.R. Mukai, D. Yamashita, H. Tamon (2005), *Chem. Mater.* 17, 683-689.

d’un Büchner sous pression réduite. Cette opération permet de charger la résine en ions sodium et fournit un sol de silice composé d’acide polysilicique (H_2SiO_3). Cet acide ainsi formé conduit à un sol appauvri en ions où 0,25 mL sont mélangés à 0,25 mL de Ludox (8,5 M). Le tout est mélangé à 0,5 mL de milieu de culture avec sérum qui condense en un gel au bout de 30 minutes également.

4.4 Caractérisation des gels de silice

Trois sources de silice ont permis d’obtenir des gels à exploiter pour immobiliser les cellules. Ceux-ci ont été caractérisés de manière à s’informer de leur porosité et de leur morphologie.

4.4.1 La porosité

Dans le cadre de cette recherche, l’aboutissement de la matrice exige que les cellules soient immuno-isolées pour pouvoir la qualifier d’organe artificiel. Pour rappel, il faut que la taille de pore soit suffisamment petite pour empêcher que les sentinelles du système immunitaire ne puissent transmettre l’information que des cellules étrangères résident dans le corps. La matrice doit donc atteindre une taille de pore maximale qu’elle ne peut dépasser sous peine d’autoriser l’entrée des molécules du système immunitaire. Dans le même temps, un diamètre important des canaux de la matrice assurera une optimisation des échanges vers l’intérieur et vers l’extérieur. Cette semi-perméabilité est un facteur-clé de la réussite.

Médicalement, s’il est si compliqué de valider une transplantation d’organe c’est en raison des réactions qu’a notre organisme à ne pas accepter un élément du non-soi. L’absence de réactions secondaires indésirables (fibrose, rejet) prévaut majoritairement dans un but médical. Dans cette optique et vu l’innocuité de la silice suggérée par le test de cytotoxicité sur les HepG2, nous devons déterminer la taille de pore maximale de la matrice pour court-circuiter la voie vers le rejet.

L’immunoglobuline G (IgG) est la plus petite molécule du système immunitaire avec une masse moléculaire de 150 kDa. Cette valeur, à transformer en unité de longueur, constitue la limite du diamètre de pore à atteindre en surface de la matrice. En accord avec

la littérature¹², la relation qui lie la masse moléculaire au rayon des protéines est établie par l’équation de Stokes. Un poids de 150 kDa équivaut à un diamètre de 17 nm. Toutefois, nous ignorons encore si atteindre une taille aussi réduite est absolument indispensable. En effet, l’IgG est sécrétée et synthétisée par les cellules B plasmatisques. Pour libérer l’IgG, ces cellules doivent être activées. Or, cette activation se fait après une reconnaissance rapprochée de ces cellules envers les étrangères. Leur taille étant comprise entre 8 et 20 μm , elles ne peuvent se retrouver à côté des cellules fraîchement implantées. Il existe donc dans une possibilité pour que la taille des IgG ne soit pas la limite de taille à atteindre pour notre matrice. En d’autres termes, les mécanismes de l’immunité ne peuvent pas être prédéterminés tant ils sont complexes. Cependant, malgré cette incertitude et par précaution, les auteurs dans le domaine de l’immobilisation de cellules préconisent une immobilisation en tenant compte de l’IgG comme facteur déterminant^{13,14,15}.

4.4.1.1 L’analyse par adsorption-désorption d’azote

L’accès au diamètre des pores qui constituent la matrice de silice fut établi grâce à l’adsorption-désorption d’azote (figure 3.6). Cette technique informe de la surface spécifique du matériau, du volume poreux ainsi que de la taille de pore.

Dans la plupart des cas les courbes isothermes reprises sont de type II pour les gels de silice provenant des trois sources préalablement sélectionnées. Ils entrent donc la catégorie des matériaux macroporeux, possédant une taille de pore au-delà des critères d’immuno-isolation. A noter que ces gels ont été obtenus après séchage au CO_2 supercritique (énoncé au point 3.3.1) pour en obtenir l’aérogel de façon à recueillir la taille de pore correspondant à celle du matériau hydraté.

¹² J.A. Nagy, K.T. Herzberg, E.M. Masse, G.P. Zientara, H.F. Dvorak (1989), *Cancer Res.* 49, 5448-5458.

¹³ T.A. Desai, D. Hansford, M. Ferrari (1999), *J. Membr. Sci.* 159, 221-231.

¹⁴ G. Carturan, R. Dal Toso, S. Boninsegna, R. Dal Monte (2004), *J. Mater. Chem.* 14, 2087-2098.

¹⁵ A. Bartkowiak, L. Canaple, I. Ceausoglu, N. Nurdin, A. Renken, L. Rindisbacher, C. Wandrey, B. Desvergne, D. Hunkeler (1999), *Annals NY Acad. Sci.* 875, 135-145.

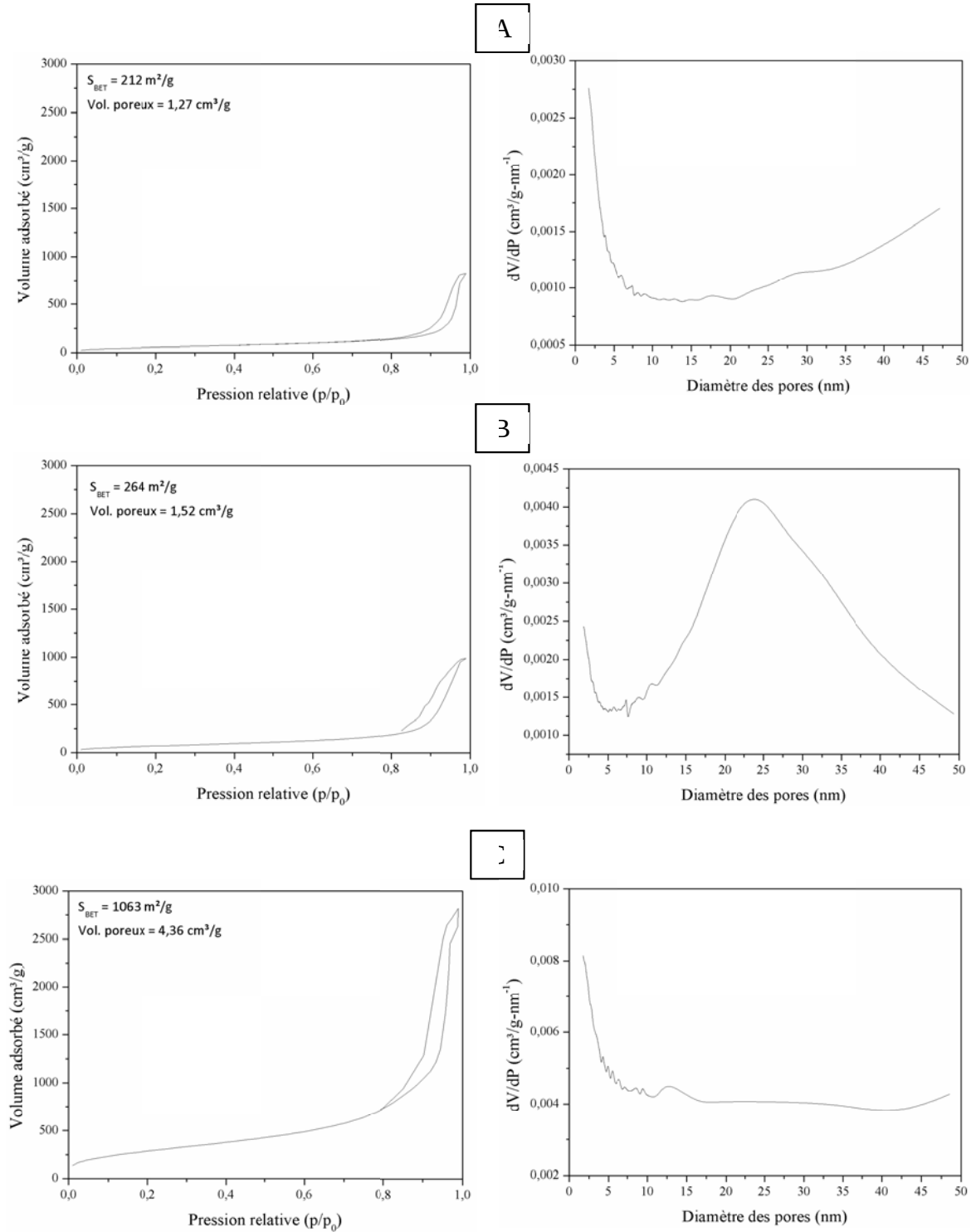


Figure 3.6 : Isothermes d’adsorption-désorption d’azote et distributions de taille de pore des gels de silice formés à partir du silicate de sodium (A), du silicate de sodium échangé (B) et du DGS (C).

4.4.1.2 La microscopie électronique à balayage

Les micrographies de ces aérogels sont reprises dans la figure 3.7 ci-après. On y observe la morphologie caractéristique de matériaux en silice qui suggère l'agrégation de particules les unes aux autres.

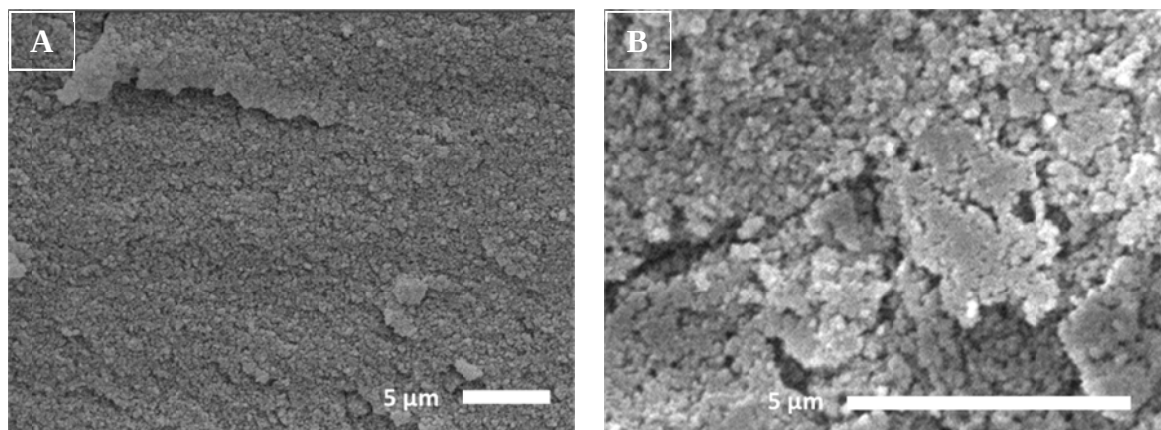


Figure 3.7 : Micrographies obtenues par microscopie électronique à balayage venant de gels de silice formés à partir du silicate de sodium (A) et du silicate de sodium échangé (B).

4.4.2 Viabilité des cellules HepG2 immobilisées dans des gels de silice

Parmi les sources qui ont permis l'obtention d'un gel rouge (DGS, Na_2SiO_3 , H_2SiO_3), les temps de gelification étaient relativement longs, au-delà de 20 minutes. La littérature préconise un tel laps de temps¹⁶ parce que les variations d'environnement sont très progressives et laissent le temps à l'entité immobilisée de s'adapter à de petites perturbations à la fois. Or, dans le cas qui nous occupe, le milieu de culture est dilué pendant ce processus. En conséquence, des temps de gelification courts sont les plus favorables parce qu'ils diminuent la durée de perturbation des cellules. De plus, au cours du vieillissement du gel, la pression qui s'applique sur les membranes peut engendrer un stress sur les cellules. Suite à la synérèse, les parois du gel s'épaississent et les cellules peuvent être affectées par ce phénomène.

¹⁶ C. Depagne, C. Roux, T. Coradin (2010), *Anal. Bioanal. Chem.*, in press, disponible online le 2 novembre 2010.

Le maintien de la survie cellulaire a été mesuré au cours du temps par oxymétrie mais n’a pas donné un maintien de leur viabilité au-delà de deux semaines avec ces gels comme le démontre la figure 3.8. Il importait donc de trouver un moyen simple pour immobiliser les cellules dans une matrice où le temps de gel est le plus court possible, et où la force qui s’applique à elles ne provoque pas de stress.

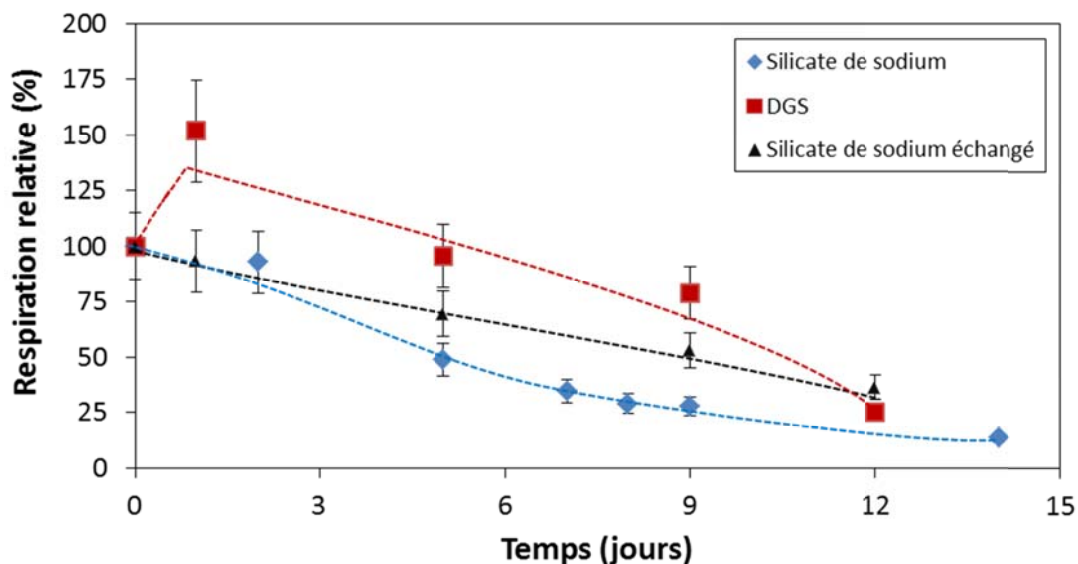


Figure 3.8 : Consommation d’oxygène des cellules HepG2 immobilisées dans des gels de silice obtenus à partir du silicate de sodium, du silicate de sodium échangé et du DGS au cours du temps. Le 100 % correspond à la consommation d’oxygène le jour de l’encapsulation (jour 0).

4.5 Conception d’une capsule d’alginate

La pré-encapsulation des cellules dans une capsule d’alginate a permis de régler le double problème apporté par le gel de silice. Non seulement la formation de la capsule est très rapide, mais surtout cette capsule permet de s’affranchir des forces qui s’impriment sur les membranes de cellules avec le gel de silice.

4.5.1 L’alginate de sodium

Les cellules ont été immobilisées dans des capsules formées à partir d’une solution d’alginate de sodium. L’alginate est un phycocolloïde (un biopolymère extrait des algues) couramment utilisé dans l’industrie agro-alimentaire, pharmaceutique, cosmétique, médicale ou la papeterie grâce à ses propriétés reconnues de gélifiant, épaississant ou encore d’additif alimentaire. Il est un des constituants principaux de la tige des algues qui lui assure son

maintien et sa résistance face au courant marin. En fonction de la partie de l'algue, le type d'alginate diffère donnant une tige plus ou moins solide. En effet ce biopolymère linéaire est formé de deux acides : l'acide Mannuronique (M) et Guluronique (G) et leur proportion détermine ses propriétés (figure 3.9).

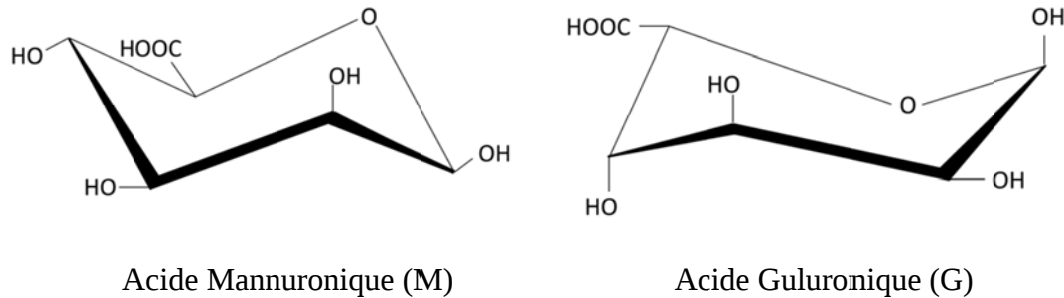


Figure 3.9 : Unité M (acide Mannuronique) et unité G (acide Guluronique) du polymère d'alginate.

C'est au niveau de l'unité G que se produit la solidification du polymère. Plus il y a d'unités G, plus le comportement de l'algue sera de résister aux forces auxquelles elle est soumise dans la mer, c'est pourquoi une plus forte concentration est répertoriée dans la zone d'ancrage au rocher ou au sol. Plus il y a d'unités M ou d'alternances G et M, plus la tige sera flexible et sujette à la déformation provoquée par la houle.

Mises en présence d'ions divalents, les propriétés viscoélastiques de la solution d'alginate de sodium changent jusqu'à la formation d'un gel. Un ion comme le calcium peut venir s'intercaler entre les carboxylates du monomère G de la chaîne (figure 3.10) et mener à solidifier la solution d'alginate.

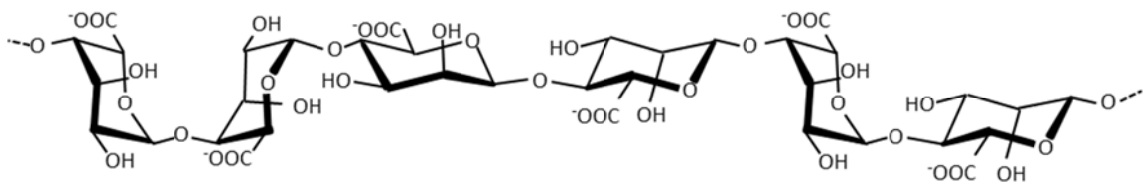


Figure 3.10 : Enchaînement linéaire du polymère d'alginate formé d'unités M et G.

Les liaisons β -(1-4) entre ces acides font que les unités guluroniques (G) se disposent en pince dans le polymère alors que deux unités mannuroniques (M) successives sont linéaires. Un enchaînement GM ne présente pas non plus cette forme d'entonnoir dans lequel est piégé l'ion calcium. Le cas échéant, les blocs G permettent la gélification ionotrope suivant le modèle de la boîte à œufs (figure 3.11).

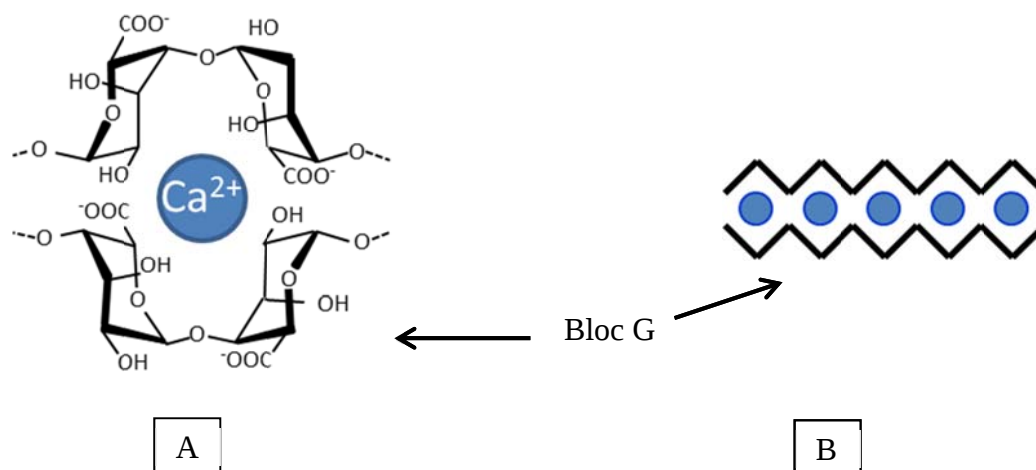


Figure 3.11 : Représentation de la position de l’ion calcium piégé entre les unités G de deux chaînes d’alginate (A) et modèle de la boîte à œufs schématisant la modification des propriétés viscoélastiques du polymère d’alginate menant au gel (B).

Cette figure montre clairement que cela n’est pas possible avec les unités M puisqu’elles ne forment pas d’étranglement pour piéger l’espèce chargée. Les chaînes s’agrègent parallèlement pour conduire à un assemblage tridimensionnel régulier connu sous le nom de « boîte à œufs ». Les blocs G étant responsables de la gelification de la solution d’alginate, leur abondance résulte en un gel résistant. L’alginate de sodium disponible commercialement est une poudre brune obtenue après les étapes de séchage (50°C) et de broyage de l’algue sans autre forme de traitement. Cette poudre est donc chargée de tous les éléments qui constituent la tige en plus de l’alginate¹⁷. Ces résidus qui font partie de la plante sont totalement superflus pour nos recherches. Pour cette raison, l’alginate de sodium va d’abord subir une étape de purification avant d’être solubilisé pour former le sol qui immobilisera les cellules par la suite.

4.5.2 Pré-encapsulation des cellules dans l’alginate

4.5.2.1 Purification de l’alginate¹⁸

La figure 3.12 schématise la tige d’une algue avec les différentes molécules qui se retrouvent dans la poudre commerciale d’alginate de sodium, composée de la paroi cellulaire faite de cellulose, de sucres, de protéines, ...

¹⁷ A.K. Khafaji (1986) *Pak. J. Bot.* 18, 351-353.

¹⁸ P. de Vos, B.J. De Haan, G.H.J. Wolters, J.H. Strubbe, R. Van Schilfgaarde (1997), *Diabetologia* 40, 262-270.

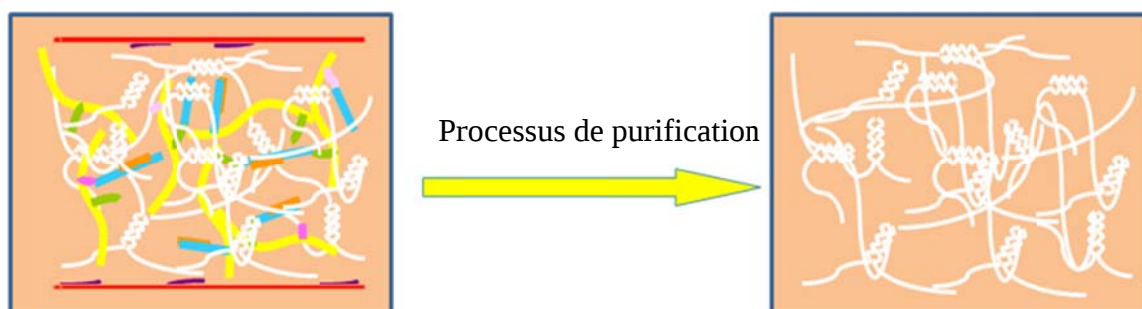


Figure 3.12 : Représentation schématique de la composition de l'alginate commercial. Avant purification, les chaînes d'alginate (en blanc), sont enchevêtrées entre les parois du squelette polysaccharidique fait de cellulose (en rouge) par des fucanes (jaune), des sucres (mauve), des protéines (bleu) et des acides aminés (orange). Après purification, il ne reste que les chaînes d'alginate.

Dissoute dans une solution d'éthylèneglycol-tetraacétique (EGTA) pour la débarrasser d'ions que ce dernier complexe (magnésium, calcium), la poudre d'alginate passe successivement à travers des filtres de 5 μm à 0,45 μm et est conservée dans un bain à 4°C. Elle est ensuite acidifiée par de l'HCl (2 M) jusqu'à précipitation de l'alginate pour éliminer les sucres solubles¹⁹. Le gel est filtré et lavé par des fractions d'HCl 0,01M pour éliminer les ions encore présents, piégés entre les chaînes du biopolymère. L'ajout de chloroforme et de butanol va dénaturer les protéines qui ont précipité avec l'alginate, ce qui permet de l'en délivrer totalement. A nouveau lavé par de l'HCl 0,01M, le pH de l'alginate est ramené à 7 par du NaOH 0,5 M pour le re-solubiliser. Du chloroforme et butanol sont rajoutés et le tout est centrifugé pour bien séparer les dernières traces de peptides des chaînes d'alginate. Le sous-nageant avec les protéines est jeté et le surnageant est mélangé à de l'éthanol absolu qui précipite l'alginate en une pâte filandreuse, finalement rincée une dernière fois à l'éther. Cette pâte obtenue est lyophilisée pendant une nuit et de l'alginate blanc et sec est obtenu le lendemain.

4.5.2.2 Obtention d'une capsule d'alginate

La poudre d'alginate purifié est dissoute dans de l'eau distillée et la capsule d'alginate est obtenue suite au contact de cette solution d'alginate avec une solution de chlorure de calcium. Plus le temps de contact avec les ions divalents est prolongé, plus l'épaisseur de la croûte augmente. Cependant, la tenue de la capsule est un facteur à prendre en considération. En conséquence, la concentration de la solution d'alginate est

¹⁹ E. Percival, R.H. McDowell (1967). *Algal walls. Composition and biosynthesis.*

une donnée primordiale pour la résistance de la capsule et la survie des cellules. La solubilité de l’alginate n’est pas très importante, une concentration comprise entre 1 % et 2 % permet d’avoir une capsule suffisamment résistante pour avoir la formation rapide de la croûte tout en conservant liquide l’intérieur de la capsule d’alginate²⁰.

La solution d’alginate et le CaCl_2 ont été stérilisés par autoclave (120°C pendant 20 minutes). La capsule est formée par mélange de 5 mL de la solution d’alginate (2 %) avec 5 mL de milieu de culture et sérum. A l’aide d’une pipette pasteur stérile, ce mélange est versé goutte à goutte sur une solution de chlorure de calcium. La capsule d’alginate se forme instantanément au contact des ions calcium et est laissée 3 minutes dans la solution. Cette méthode a permis de former des capsules d’alginate sphériques et poreuses en un temps de gélification très restreint. De cette manière, le temps durant lequel les cellules sont perturbées par un environnement changeant est très court. L’alginate étant purifié, il permet également de mélanger les cellules sans risque que des produits secondaires néfastes ne viennent les perturber.

4.5.2.3 Caractérisation des capsules d’alginate

Les capsules d’alginate ont été caractérisées par microscopie optique (figure 3.13), électronique et leur taille de pore fut déterminée par adsorption-désorption d’azote.

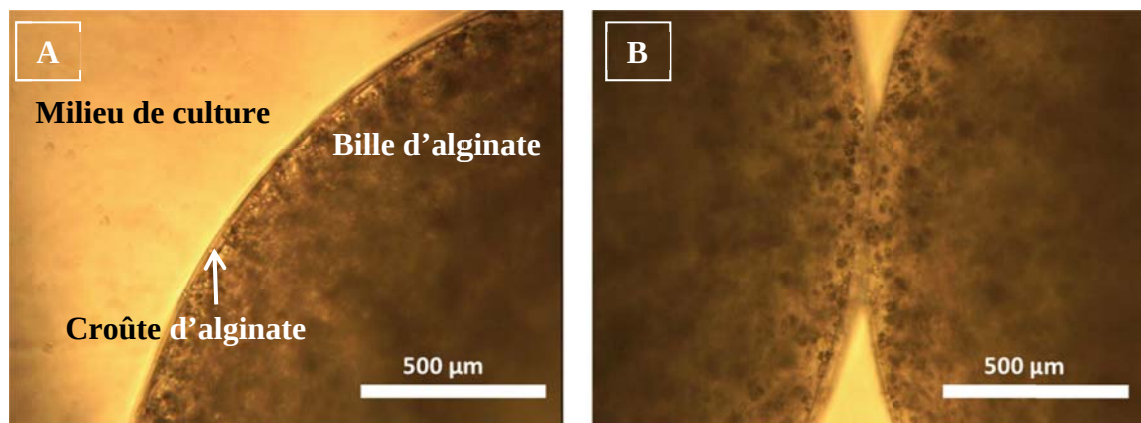


Figure 3.13 : Photographies de cellules HepG2 immobilisées dans des capsules d’alginate purifié. Les cellules apparaissent sous forme de petits points noirs bloqués par la croûte d’alginate.

Ces deux images montrent l’importante densité de cellules immobilisées dans ces capsules d’alginate dont l’épaisseur de la croûte est relativement fine grâce au peu de temps passé

²⁰ M. Perullini, M. Jobbagy, M. Bermudez Moretti, S. Correa Garcia, S.A. Bilmes (2008) *Chem. Mater.* 20, 3015-3021.

dans la solution de CaCl_2 . La micrographie obtenue par microscopie électronique à balayage à la figure 3.14 met en évidence cette sphère d'alginate séchée le jour de sa formation avec sa morphologie en surface.

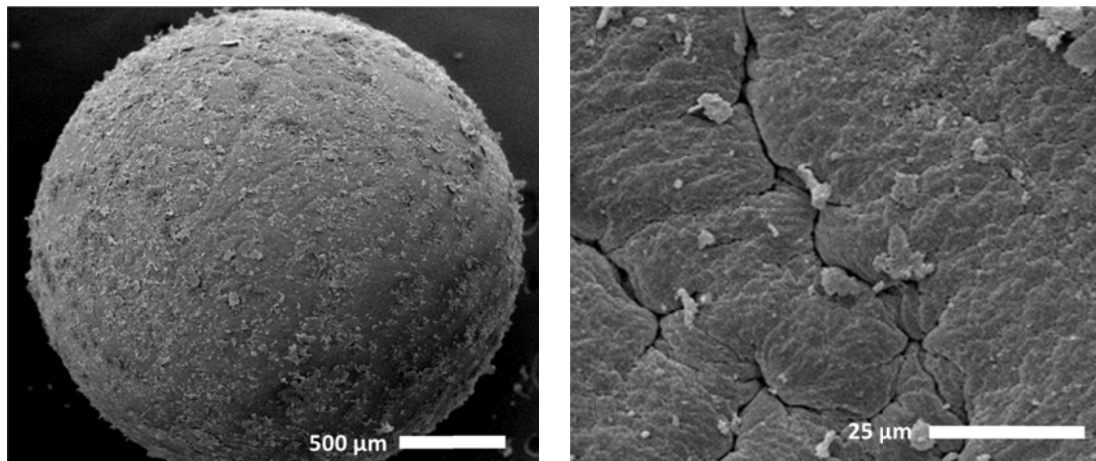


Figure 3.14 : *Micrographies obtenues par microscopie électronique à balayage venant d'une capsule d'alginate.*

Les cellules au sein de la capsule sont bien dispersées comme en atteste la figure 3.15 où l'on distingue clairement les cellules rassemblées en petits amas et montrent la façon dont elles sont enrobées. Les images A, B et C ont été obtenues après avoir ouvert la capsule pour observer la densité et la dispersion des cellules immobilisées après quelques jours. La comparaison entre ces trois micrographies et la D montre que la forme et la dimension des cellules correspondent parfaitement. La micrographie D provient de cellules séchées et observées après repiquage, où de la matrice extracellulaire est présente à la surface de leur membrane. En conséquence, les cellules HepG2 immobilisées dans la capsule d'alginate synthétisent toujours cette matrice extracellulaire comme en condition de culture traditionnelle ce qui peut être considéré comme un marqueur de bien-être.

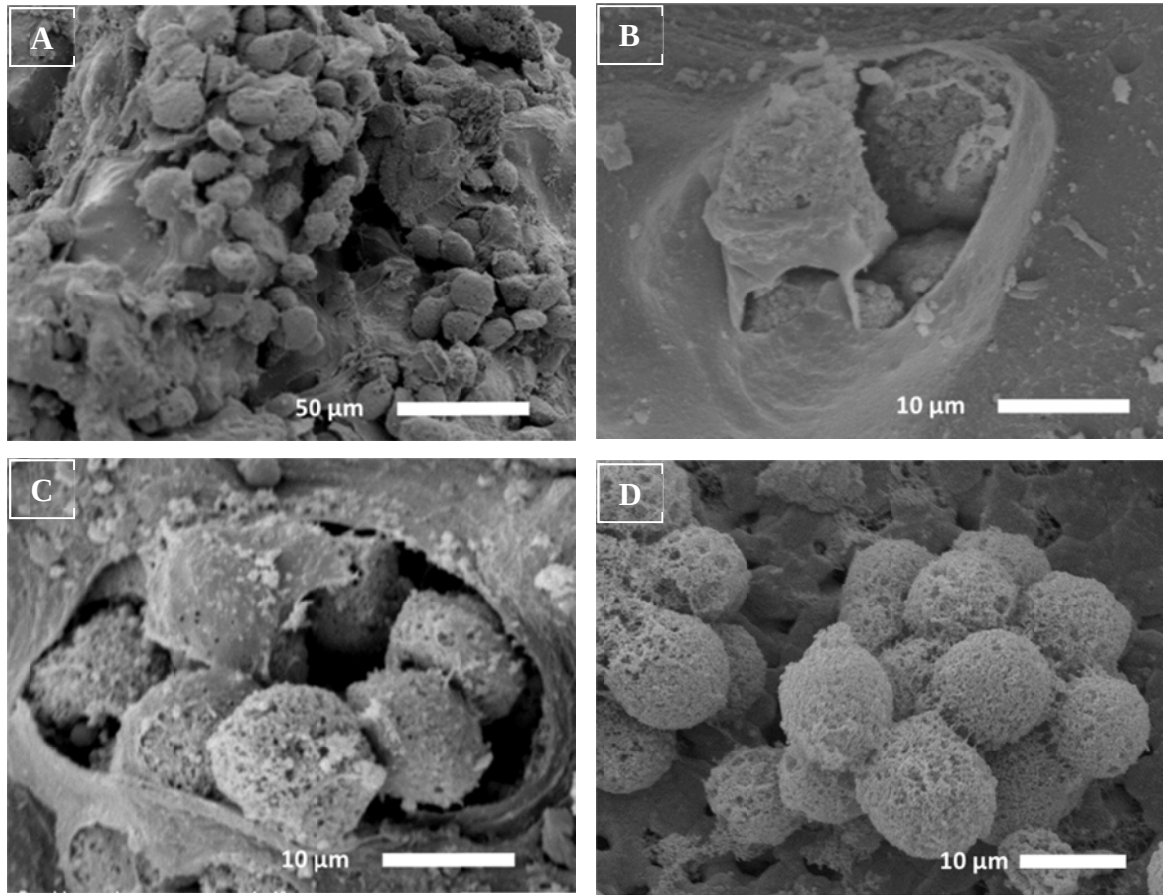


Figure 3.15 : Micrographies obtenues par microscopie électronique à balayage montrant la dispersion et l’enrobage des cellules HepG2 dans une capsule d’alginate (A, B et C) ; ainsi qu’un amas de cellules HepG2 non-immobilisées obtenus après un repiquage (D).

L’analyse par adsorption-désorption d’azote d’une capsule d’alginate fournit une isotherme de type II représentée dans la figure 3.16.

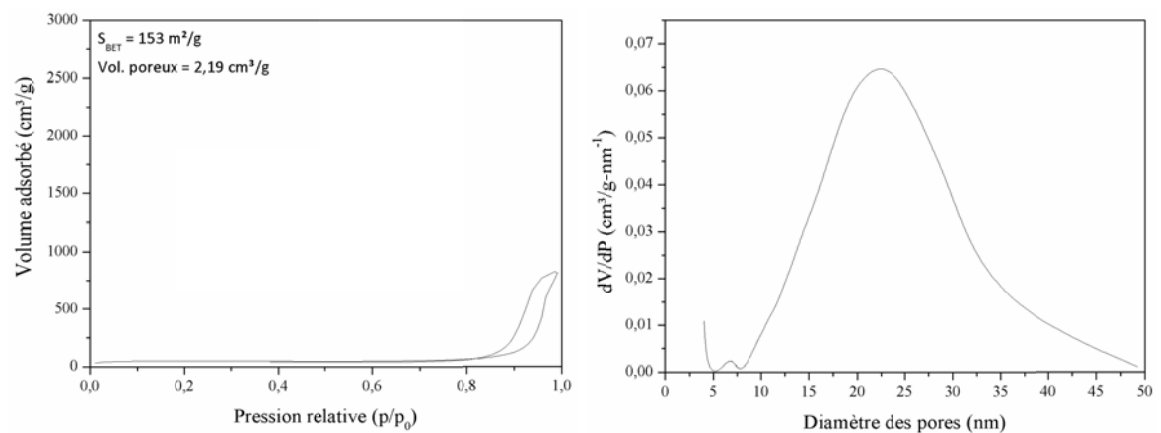


Figure 3.16: Isotherme d’adsorption-désorption d’azote et distribution de taille de pore d’une capsule d’alginate.

Le constat est identique à celui observé pour les gels de silice : le matériau est macroporeux et donc inadapté en tant qu’organe artificiel. Cependant, un nouvel avantage apparaît en plus du temps de gelification très court. Il s’agit de la possibilité de réaliser une microencapsulation. Cette méthode, opposée à la macroencapsulation, consiste à immobiliser les cellules dans de petites matrices plutôt que dans un bloc de silice comme ce fut le cas jusqu’à présent. La microencapsulation permet d’augmenter les chances de réussite puisque les cellules au cœur de la matrice sont plus proches des extrémités, les nutriments (et *a fortiori* les métabolites) ont moins de chemin à parcourir à travers les canaux du réseau pour atteindre les cellules. Le rapport surface/volume est minimal pour une sphère comparée à un cube où il est deux fois plus important.

Après 50 jours dans le milieu cellulaire, la morphologie et la porosité de la capsule d’alginate changent comme observé sur les micrographies du microscope à balayage à la figure 3.17. Avec le temps, la capsule gonfle, les canaux qui forment sa croûte s’élargissent jusqu’à atteindre plusieurs microns. Ce gonflement est dû au fait que le milieu de culture contenant des ions sodium est régulièrement renouvelé autour des capsules pour apporter des nutriments frais aux cellules. Ces ions remplacent les ions calcium et affaiblissent la résistance de la capsule.

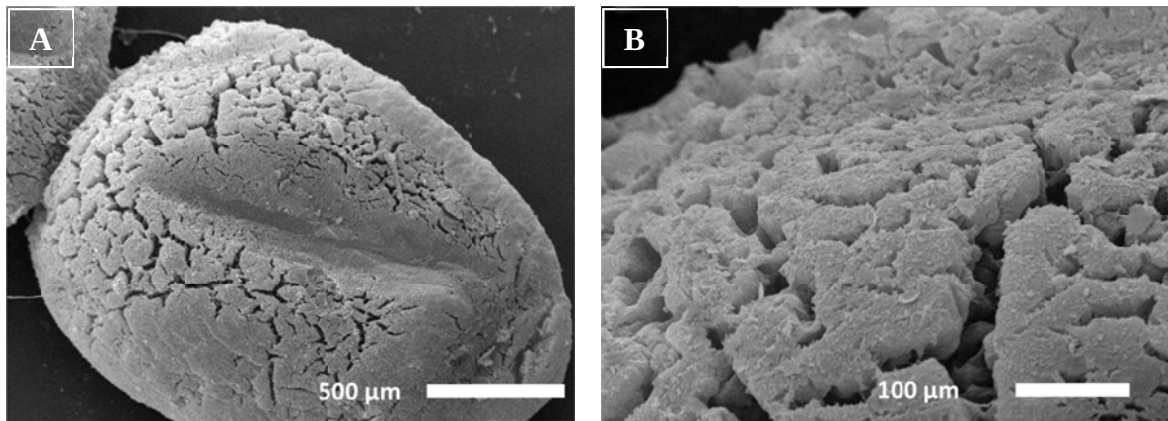


Figure 3.17 : Micrographies obtenues au microscope électronique à balayage montrant l’augmentation de la porosité d’une capsule d’alginate après 50 jours *in vitro*.

4.5.2.4 Viabilité des cellules HepG2 immobilisées dans les capsules d’alginate

L’immobilisation de cellules dans les gels de silice n’ont pas permis de maintenir les cellules en vie sur une longue durée à cause du temps de gelification long qui les affecte trop dans un premier temps (cfr point 4.4.2). Dans un second temps, le phénomène de synérèse pourrait être à l’origine d’une pression exercée sur la membrane plasmique et perturberait les cellules à plus long terme. De plus, l’immobilisation dans les gels de silice fait apparaître le problème lié à la macroencapsulation qui ne place pas toutes les cellules dans les mêmes conditions.

Les premières encapsulations à avoir démontré une réelle viabilité prolongée des cellules HepG2 furent celles réalisées avec l’alginate. La figure 3.18 regroupe les mesures de la consommation d’oxygène des cellules au cours du temps. Elles ont continué à respirer près de 50 jours après leur immobilisation dans une capsule d’alginate purifié. Dans cette figure, la consommation d’oxygène des HepG2 est reportée en fonction du temps. Cette consommation est mesurée le jour de l’encapsulation (Jour 0) et est assignée au 100 %. Les jours suivants, la consommation d’oxygène dans les capsules avec les cellules immobilisées est rapportée à celle du jour 0 et schématisée par un graphe pour exprimer la respiration relative des échantillons au cours du temps.

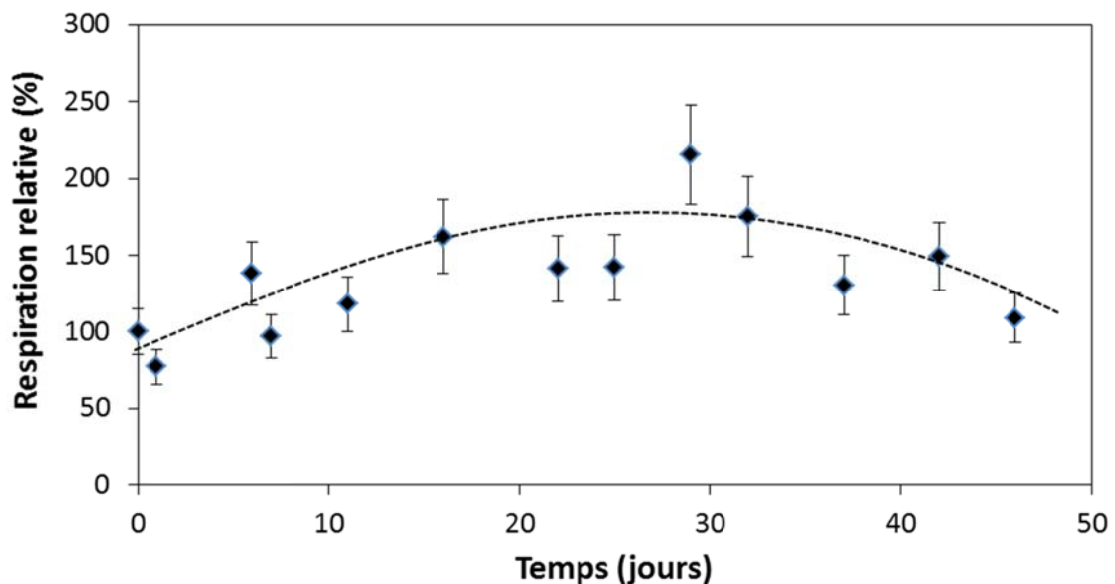


Figure 3.18 : Consommation d’oxygène des cellules HepG2 encapsulées dans une capsule d’alginate purifié au cours du temps. Le 100 % correspond à la consommation d’oxygène le jour de l’encapsulation (jour 0).

La respiration de cellules, synonyme de survie, est maintenue durant un mois avant de commencer à diminuer légèrement. Comparée au premier jour, la respiration a pratiquement doublé après 30 jours, suggérant la prolifération des cellules au sein de leur nouvel environnement. Contrairement au gel de silice où le matériau confine réellement les HepG2 dans une cage ajustée à leur taille, la capsule d’alginate offrirait un environnement moins oppressant pouvant permettre une division cellulaire puisque la consommation en oxygène a multiplié dans cet intervalle. Toutefois, après un mois, les mesures de la respiration baissent, amenant l’hypothèse d’une mort progressive des cellules. Or, aucun paramètre n’a été modifié au cours de cette période où le milieu de culture avec sérum a toujours été renouvelé deux fois par semaine. En réalité, en seconde hypothèse, cette diminution fut imputée aux changements de propriétés texturales de la capsule observé à la figure 3.17.

En effet, sur la base des micrographies MEB, la porosité observée aux alentours de 50 μm par endroit est suffisante pour laisser les cellules HepG2 s’échapper de la matrice puisque leur taille est inférieure à 10 μm . Il est possible de les perdre progressivement à mesure que le milieu de culture est renouvelé. En outre, cette opération entraîne un apport quotidien d’ions sodium en faible concentration qui peut, au bout de plusieurs semaines, solubiliser l’alginate et fragiliser sa croûte. Les cellules ne sont plus maintenues par les pores devenus bien trop grands pour les immobiliser et les mesures en oxymétrie reflètent complètement les conséquences de ce phénomène. L’alginate n’est pas le matériau le plus prometteur du point de vue résistance, mais il permet d’améliorer les conditions de survie des cellules immobilisées et offre une matrice plus adéquate que la silice sur ce plan.

Cette conclusion a mené à imaginer le moyen de combiner les avantages de la silice et de l’alginate. Puisque l’activité des cellules HepG2 est maintenue plus efficacement dans la capsule d’alginate et que le gel de silice se montre plus résistant à long terme, la suite des recherches s’est focalisée sur la conception d’un matériau hybride où les cellules sont pré-encapsulées dans une capsule d’alginate dont la résistance est accrue grâce à la gelification de la silice autour d’elle. De cette façon, nous visions à nous affranchir des inconvénients de chacun des deux matériaux en poursuivant une telle association.

4.6 Conception de billes hybrides

alginate-silice/alginate

La première solution envisagée pour allier alginate et silice en une matrice fut de constituer un gel de silice immobilisant la capsule d’alginate. Cependant ce moyen ne permettait pas de poursuivre l’idée de microencapsulation des cellules. En conséquence, plutôt que d’englober la capsule d’alginate dans un bloc de silice ou de recouvrir la bille d’alginate d’un film de silice, nous avons mis en œuvre de minéraliser la capsule d’alginate. Les expériences relatives à cette solution sont présentées sous forme d’article joint ci-après. Cet article avance les bénéfices d’une capsule d’alginate tout en y pointant ses limites évoquées dans le point précédent. Il souligne la solution que procure la minéralisation de la capsule par la silice et montre le maintien de la morphologie de la bille après 50 jours contrairement à la capsule d’alginate. A l’aide d’une expérience concluant sur l’absence de réponse proinflammatoire provoquée par l’alginate et la silice *in vitro*, la biocompatibilité a également été avancée comme excellente. Par une étude de diffusion de particules dont le diamètre est calibré, nous avons pu estimer le diamètre des canaux de cette bille hybride alginate-silice/alginate en-dessous de 30 nm. La préservation de l’activité cellulaire fut par ailleurs confirmée à la fois par la détection de l’albumine (protéine synthétisée par les cellules HepG2) relarguée dans le surnageant et par les mesures en oxymétrie sur 50 jours.

Cette publication a réuni les impératifs :

- ✓ de biocompatibilité (vis-à-vis des cellules par mesure de la LDH et vis-à-vis du système immunitaire par la non-activation d’une réponse proinflammatoire),
- ✓ de porosité (diffusion des nutriments et métabolites), et
- ✓ de simulation d’une immuno-isolation indispensable à la formation d’un organe artificiel.

Hybrid shell engineering of animal cells for immune protections and regulation of drug delivery: towards the design of “artificial organs”

*Philippe Dandoy^{1,a}, Christophe F. Meunier^{1,b}, Carine Michiels², Bao-Lian Su^{1,3 *}*

¹Laboratory of Inorganic Materials Chemistry (CMI),

²Laboratory of Biochemistry and Cellular Biology (URBC)

The University of Namur (FUNDP), 61 rue de Bruxelles, B-5000 Namur, Belgium

³State Key Laboratory of Advanced Technology for Materials Synthesis and Processing
Wuhan University of Technology, 122 Luoshi Road, 430070 Wuhan, Hubei, China

ABSTRACT

Background: Thanks to the uprising progress in medicine, the average life expectancy is continuously increasing. At the same time, the number of patients who require full organ transplantations is augmenting. Consequently, new strategies for cell transplantation are subject of great interests.

^a PhD F.R.I.A. scholarship holder (Fonds de la Recherche Scientifique – FNRS, Brussels, Belgium)

^b Postdoctoral Researcher of FNRS (Fonds de la Recherche Scientifique – FNRS, Brussels, Belgium)

* Corresponding authors. tel: +32 81 724531, fax +32 81 725414, e-mail Addresses:

bao-lian.su@fundp.ac.be

Methodology/Principal Findings: This work reports the design, the synthesis and the characterisation of robust and biocompatible mineralised beads composed of two layers: an alginate-silica composite core and a Ca-alginate layer. The adequate choice of materials was achieved through cytotoxicity LDH release measurement and *in vitro* inflammatory assay (IL-8) to meet the biocompatibility requirements for medical purpose. The results obtained following this strategy provide a direct proof of the total innocuity of silica and alginate networks for human cells as underscored by the non-activation of immune defenders (THP-1 monocytes). The accessible pore size diameter of the mineralised beads synthesized was estimated between 22 and 30 nm, as required for efficient immuno-isolation without preventing the diffusion of nutrients and metabolites. The model human cells, HepG2, entrapped within these hybrid beads display a high survival rate over more than six weeks according to the measurements of intracellular enzymatic activity, respiration rate, as well as the “de novo” biosynthesis and secretion of albumin out of the beads.

Conclusions/significance: The current study shows that active mammalian cells can be protected by a silica-alginate hybrid shell-like system. The functionality of the cell strain can be maintained. Consequently, cells coated with an artificial and a biocompatible mineral shell could respond physiologically within the human body in order to deliver therapeutic agents in a controlled fashion (i.e. insulin), substituting the declining organ functions of the patient.

1. INTRODUCTION

Since the original idea published in 1933 by Bisceglie [1], significant advances have been achieved to develop immuno-isolation methods for long-term transplantation of xenogenic cells or tissues. The final aim of this technology is to treat human disorders such as protein or hormone deficiencies (e.g. type 1 diabetes mellitus, factor IX of hemophilia B, Parkinson's disease or Alzheimer's disease) [2-5], overcoming the usual obstacles of limited supply of donor tissue or replacing the conventional drug treatments.

Generally speaking, immuno-isolation should be understood as a way to protect cells against mechanical stress and rejection from the immune system of the host body while allowing the diffusion of nutrients, oxygen and metabolites. Conceptually, they are separated by a biocompatible and semi-permeable membrane. The porosity of this cell-entrapping material is a key parameter for successful immuno-isolation. From the literature, the targeted pore size is still not clear. If a molecular weight (MW) cut-off of around 150 kDa is generally accepted [6, 7], which is the MW of the immunoglobulin G (IgG), the diameter related to this value is still debated. Nevertheless, a pore size between 5 to 20 nm is often referenced [8-10]. Apart from porosity issues, the robustness and the biocompatibility of the semi-permeable system are also important features for the successful transplantation of cells. The long-term efficiency of this technology is not only dependent on the final properties of the synthesised materials, but is also closely linked to the biocompatibility of the material precursors and contaminants, the synthesis pathway, as well as the ageing phase of the material. Finally, the shape and size of the system play a critical role to avoid hypoxia-induced cell death. Microencapsulation, where a small number of cells are entrapped into several microspheres, is preferred than macroencapsulation, where huge amounts of cells are

entrapped in a single immuno-isolating membrane [11]. In fact, the microencapsulation approach provides a way to enhance diffusion by increasing the surface area/volume ratio.

Advances in chemical synthesis have enabled the development of various types of materials as potential candidates for entrapping fragile animal cells. During the past decade, biopolymers (e.g. alginate, alginate/Poly-L-Lysine, chitosan, collagen), organic hydrogels (e.g. polyvinylalcohol, polyethylene glycol) or inorganic oxide gels (e.g. silica) have been employed to develop a wide range of medical applications [12-15]. While purified alginate is nowadays the most employed and recognized biocompatible material for cell encapsulation technology [16], it suffers from a poor mechanical stability and swells with time. To overcome this problem, the alginate core has been coated by different polycations such as poly-L-lysine, poly-L-ornithine, polyethyleneimine, polyallylamine or chitosan. However, these positively charged polymers (under physiological conditions) have been reported to be toxic since they can induce inflammatory reaction and cell necrosis [17, 18]. In this context, association of alginate capsules with biocompatible silica species brings great opportunities and interests as it allows the combination of soft biocompatible component (*viz.* alginate) with a resistant and non swelling component (*viz.* silica) [19]. In fact, the mineralisation of biopolymers by silica can be used to improve their chemical and mechanical performances. In the field of animal cell encapsulation, Carturan *et al.* [20, 21] and Sakai *et al.* [22-24] independently reported two methods to design alginate-silica capsules. Nevertheless, until now, the silica is only deposited at the polymer surface (layer of few microns) and not within the alginate beads. Consequently, the mechanical resistance of these capsules is not optimal and could still be improved since the slow but inevitable dissolution of SiO₂ occurs in the body fluids [25].

In this paper, novel biocompatible ceramic-like beads have been synthesised under mild conditions *via* a rapid and simple approach. The material precursors were rationally selected on the basis of cytotoxicity and immune tests. The mineralised beads have been made with two layers (alginate-silica composite/Ca-alginate) to ensure an excellent mechanical stability and a total biocompatibility over time. Besides, small spherical beads, rather than hybrid matrix, have been targeted to promote the diffusion of nutrients and metabolites. The properties of this hybrid material are investigated to explore the opportunity to develop an “artificial organ”. For instance, the entrapment of β -cells (or pancreatic islets) within such kind of materials could be used for the treatment of *Diabetes mellitus* thanks to the *in vivo* production of insulin required by the organism to maintain glucose homeostasis. In the present study, human hepatocellular carcinoma cell line (HepG2) was chosen as a cell model because pancreatic β -cells cannot be easily cultivated [26, 27]. These HepG2 cells have similar size and morphology compared to those of β -cells. Additionally HepG2 cells continuously secrete albumin and could thus be used to mimic the diffusion of insulin out of the newly formed material.

2. RESULTS AND DISCUSSION

2.1. Design of a robust and biocompatible host material

The immobilisation of animal cells in a robust and biocompatible material is the challenge for the successful development of cell therapy. Among the vast number of materials, porous silica is promising. This transparent inorganic material is essentially chemically inert, thermally stable and mechanically strong. Even though silica is generally considered as a biocompatible material and used in medical applications, several reports suggest that it is a strong macrophage-attracting substance [34]. In fact,

the cytocompatibility of the final material is closely connected to its synthesis pathway. For instance, the shape and size of silica particles formed during the encapsulation procedure can affect the cell integrity and hence trigger inflammation. Besides, it is well recognised that the interaction of silica nanoparticles with animal cells can induce oxidative stresses, cell membrane damages and possibly cell apoptosis/necrosis [35].

Generally, silica gels are obtained under mild conditions via the hydrolysis and condensation of alkoxysilanes (e.g. TMOS, TEOS). A major drawback of this pathway is the release of cytotoxic by-products (e.g. methanol, ethanol). It is well-known that short chain alcohol can affect biological membranes [36] or even destroy them. Therefore, alternative protocols have been reported such as an intermediate distillation step of the silica sol to remove most of alcohols prior to the introduction of the living cells [37]. Another strategy is based on the utilisation of organically modified precursors that liberate non- or less-toxic polyols (e.g. ethylene glycol, glycerol) [38-41]. Besides, Livage *et al.* reported the synthesis of porous silica structures by an acidification of diluted sodium silicate solutions [42]. This method, called aqueous route, has been used to efficiently entrap heterotrophic or photoautotrophic bacteria [43, 44]. Nevertheless, a negative aspect of this protocol is the excess of sodium ions that can disturb the cellular osmotic balance. In fact, this pathway was reported to be unsuitable to entrap fragile biological structures such as photosynthetically active organelles [45] and plant cells [46,47].

Before performing HepG2 cell encapsulation, a cytotoxicity test was thus firstly accomplished to estimate the lethal dose of the by-products (upper limit concentration) that are formed during the different preparation methods described above. Figure 1 presents the results for the cytotoxicity test. The control is the reference; it represents the natural death of cells occurring during the experiment. For a value higher than

6.6(±2.4) %, the concentration of the tested compounds is considered to be toxic. As shown in Figure 1, ethanol was toxic at concentration between 100 mM and 1000 mM. On the contrary, the effects of methanol strongly depended on its concentration. At low concentration (below 250 mM), methanol can be considered as a non-toxic agent. However, the percentage of dead cells increased up to 40 % when they were exposed to 1000 mM of methanol. Polyols such as glycerol were also significantly cytotoxic at every concentration tested, but the percentage of cells dead was lower at high concentration compared to the other aliphatic mono-alcohols. That is why it is often used as a cryoprotectant for the storage of cultured cells (at -196°C , its toxicity falls dramatically). Finally, the toxicity of sodium chloride was also measured to evaluate the relevance of gels obtained *via* an aqueous route. The data highlight that NaCl is not detrimental for the cells below a concentration of 500 mM. These results suggest that HepG2 could be entrapped within silica gel formed *via* the aqueous route (Na_2SiO_3 as silica precursor).

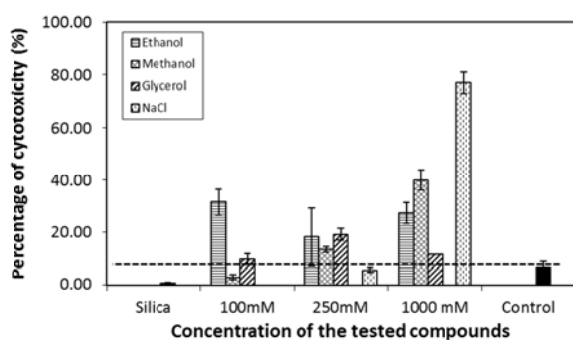


Figure 1. Concentration-dependent effects of different sol-gel by-products on HepG2 cells after 5 hours of incubation.

The membrane damaging effect of chemicals was quantified by measuring the release of the cytosolic enzyme LDH. Results are presented in percentage of cytotoxicity as means $\pm$ 1 S.D. (n = 3).

This hypothesis was strengthened by the complete innocuity of aggregated silica nanoparticles (Figure 1). Nevertheless, in conventional encapsulation procedures, the introduction of silica precursors within the buffered culture medium exposes the cells to

unnatural and brutal variations of their environment during the host-material synthesis. Therefore, the chemical conditions of sol-gel synthesis could be considered as harmful for human cells such as HepG2 cells. Recently, Bilmes *et al.* demonstrated that the pre-encapsulation of cells within an alginate capsule is beneficial to protect yeasts from silica precursors (e.g. sodium silicate). They showed that low concentrations of sodium alginate did not provide efficient protection to immobilised cells and too high concentrations generated ionic stress. But for alginate concentrations between 1 % and 2 %, the stress levels of cells were significantly lower than observed in cells directly exposed to silica precursors [48]. Based on these results, a three-step approach has been used here to encapsulate living animal cells within biocompatible hybrid alginate-silica beads.

In order to confirm the biocompatibility of the building blocks used to synthesise the ceramic-like beads, an *in vitro* test for the detection of immune response was secondly performed. The objective was to determine if silica nanopowders or sodium alginate can activate immune defenders (THP-1 monocytes) to start a “rejection” mechanism. Secretion of inflammatory cytokine (IL-8) was thus assayed as a measure of macrophage activation. Before the experiment, sodium alginate (anionic polysaccharide composed of a linear copolymer guluronic and mannuronic units) was purified to improve its biocompatibility since all the contaminants (e.g. endotoxins, proteins, polyphenols) sequestered in this crude powder are known to be toxic for animal cells [28]. Figure 2 shows the level of IL-8 secreted by THP-1 monocytes in contact with alginate or silica materials (Table 1). Without any cell (C, CA and CS), IL-8 was not detected (Figure 2a). However, it has to be mentioned that HepG2 cells constitutively secrete IL-8 (CH in Figure 2a).

THP-1
THP-1
THP-1
THP-1
THP-1
THP-1
(Fig. 2b)

Table 1. Conditions tested to perform the *in vitro* immune response test.
Determination of IL-8 released in the supernatant, synonym of a proinflammatory response.

The presence of the alginate polymers or silica particles did not affect them as shown by steady state IL-8 concentration (CHA, CHS in Figure 2a). When THP-1 monocytes were put in contact with the materials (A, AH, S, SH in Figure 2b), the IL-8 concentration detected in the supernatants was not higher compared to CA, CHA, CS or CHS samples. These observations confirm the total biocompatibility and the inertness of purified alginate and of silica material.

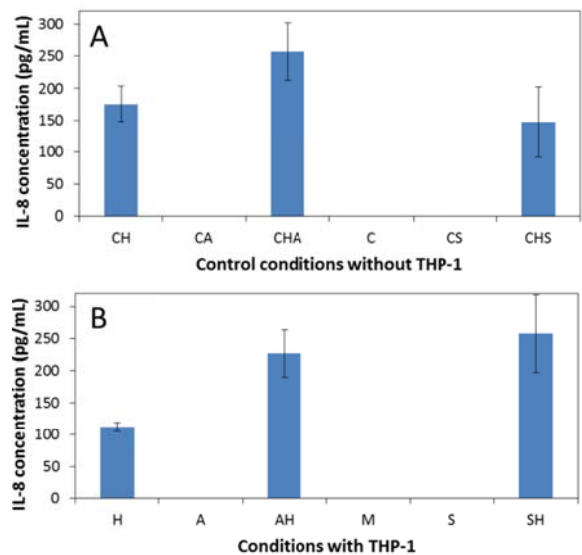


Figure 2. *In vitro* determination of a proinflammatory response due to alginate or silica around cells.
Proinflammatory response is highlighted by IL-8, which is secreted by monocytes THP-1 (immune defenders) when they are activated. The control (a) are made without THP-1 to underline the basal concentration of IL-8 produced by HepG2 cells. Results are presented as means $\pm$ 1 S.D. ($n = 3$).

The next section described the characterisation of robust and biocompatible mineralised beads composed of two layers: an alginate-silica composite core and a Ca-alginate layer. This bead was mineralised with silica to strengthen the polysaccharide beads. Since *in vivo* biocompatibility data have only been described in the literature for alginate, an outer layer of alginate was deposited at the surface to mask the possible unwanted interactions [49]. The performance of these novel beads was compared to conventional alginate capsules in term of long-term stability and cell viability.

2.2. Material characterizations

Alginate capsules and silica mineralised beads were studied to determine their properties, especially regarding their porosity which is a key parameter that determines the diffusion of chemicals including nutrients required for cell survival. After being supercritically dried with liquid carbon dioxide to preserve the porous network by avoiding the collapse of pores through capillary action, the obtained aerogels were characterised by nitrogen adsorption-desorption measurements and scanning electron microscopy (SEM). In all cases, analysis of the textural properties of materials shows a type II isotherm according to the IUPAC classification systems. The surface area of mineralised beads was very high ($414 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$) compared to alginate capsules (Figure 3). This increase in surface area may suggest an efficient mineralisation of the polymeric beads and a great improvement of their mechanical properties.

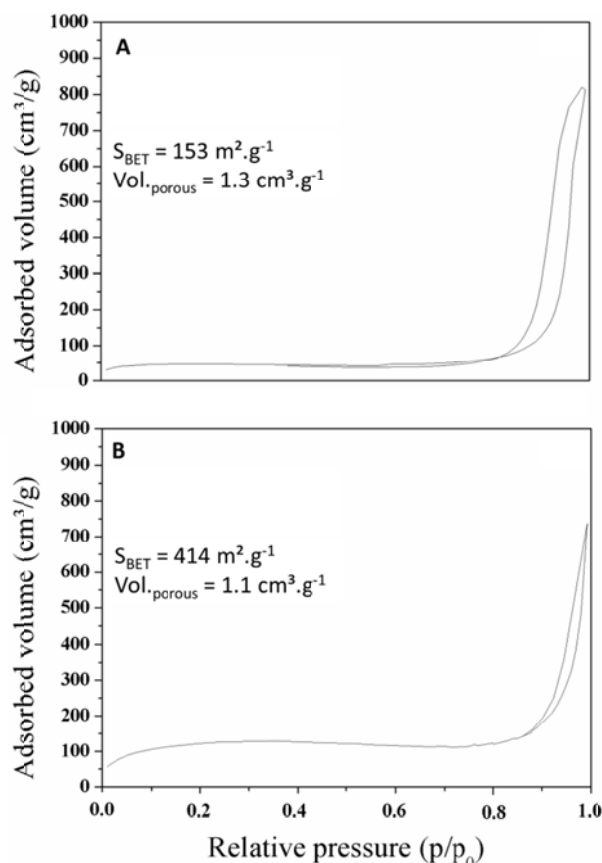


Figure 3. Nitrogen adsorption-desorption isotherms.

Isotherms obtained by analysis of purified alginate capsules (a) and mineralised beads (b).

As a matter of fact, SEM micrographs emphasize that hybrid alginate-silica beads are more robust compared to alginate capsules. After 50 days of incubation, the alginate capsules swelled and became very fragile. Typically, large cracks (50 μm in some parts) appeared at the surface of the polymeric capsules (Figure 4a and b) while the mineralised beads presented intact surface morphology (Figure 4c and d). Besides, the core of the mineralised beads was characterised by a dense porous network that strengthens the overall mechanical properties of the material (Figure 5a, b and c). EDX analysis suggests that the three-dimensional structure of the bead core was formed via the deposition of silica (Figure 5d).

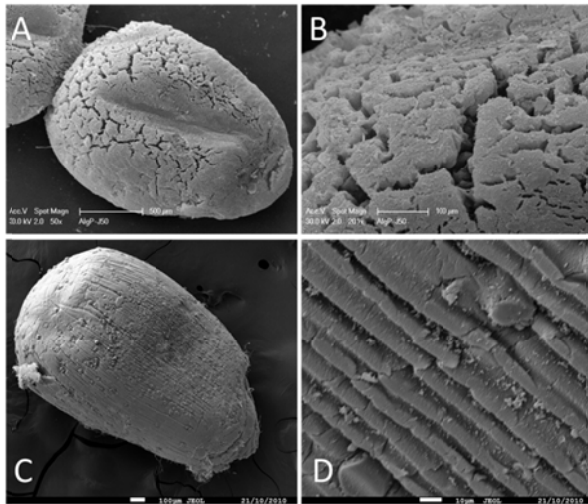


Figure 4. Scanning electron microscopy images of (a, b) purified alginate capsules and (c, d) mineralised beads.

The materials were kept during 50 days in the culture medium and supercritically dried with carbon dioxide.

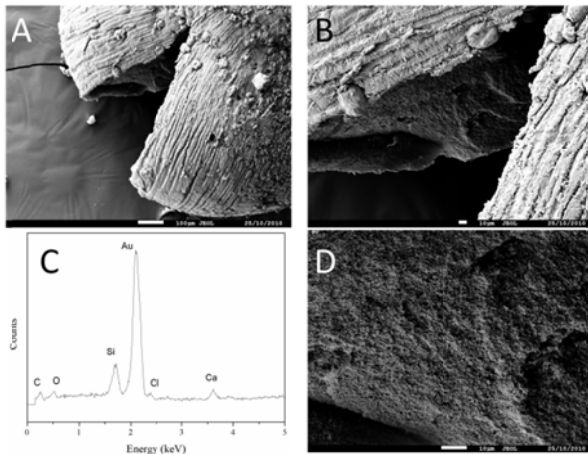


Figure 5. SEM micrographs (a, b, c) and EDX spectrum (d) of a cross section of a mineralised bead.

The bead was conserved *in vitro* in the biological medium during one month.

In order to confirm this hypothesis, a silica tracer was used. PDMPO is an excellent fluorescent probe for imaging newly deposited silica [32]. For that purpose, hydrated alginate-silica beads and alginate capsules (50 days old) were incubated with this probe and observed with an optical microscope under an UV-excitation light. As shown by Figure 6a and b, no trace of silica species was observed within optically transparent alginate capsule. Conversely, the whole mineralised beads (Figure 6e) as

well as every cross-section of the material (Figure 6c) displayed an intense blue fluorescence (Figure 6d and f).

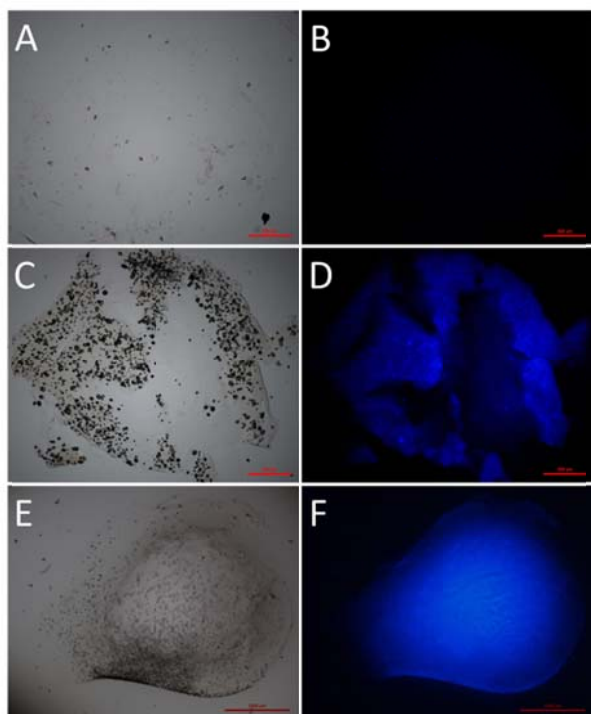


Figure 6. Microscopy images of an alginate capsule and a mineralized bead showing the silification. Brightfield (a, c, e) and fluorescent microscopy images (b, d, f) of an alginate capsule (a-b) and a mineralised bead (c-f) in the presence of PDMPO (silica tracer). Micrographs (a-d) and (e-f) correspond to representative cross sections of the materials and to a whole bead, respectively.

These observations indicate that silica was homogeneously distributed throughout the beads. Although, silica and alginate were both negatively charged at physiological pH, silica species can diffuse within the freshly formed alginate capsules. Since buffered culture medium present in the core part of the beads maintains the pH near 7, it favours the catalysis of silica condensation. It is assumed that the presence of weak hydrogen bonding interactions between alginate and the silanol groups promotes the formation of uniform hybrid alginate-silica composites [50, 51].

The immuno-isolation efficiency was investigated by studying the entrance of fluorescent molecules of known diameters within 7 days old mineralised beads. Thanks to fluorescein isothiocyanate-dextran molecules with various molecular weights (10,

70 and 250 kDa), it was possible to determine whether these molecules can enter or not into the beads, the same experiment was performed with latex beads of 30 nm to test higher diameter. According to the equation of Stokes [52], the three dextran-FITC of 10 kDa, 70 kDa and 250 kDa have a diameter of 4, 12 and 22 nm respectively, where latex beads have a diameter of 30 nm. These products were chosen because they do not present significant adsorption on silica and alginate. The Figure 7 shows the results obtained over 7 days.

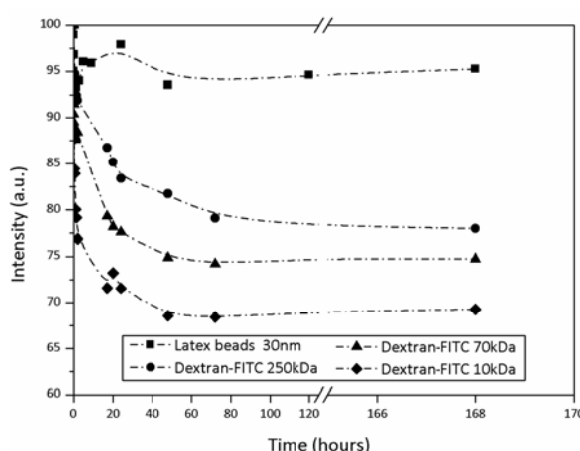


Figure 7. Study of the diffusion of fluorescent probes through 7 days old mineralised beads.

100 % corresponds to the fluorescence intensity of the solution before the addition of the beads. The MWCO is estimated thanks to the hydrodynamic radius of biopolymer: 2, 6 and 11 nm for the dextran-FITC, and with latex beads carboxylated-modified characterized by a diameter of 30 nm.

In the case of small molecules, the bead permeability was large enough to allow a rapid diffusion of the Dextran-FITC 10 kDa within the hybrid material. After 3 days, the diffusion equilibrium was reached. The tendency was the same for the polymers characterized by a molecular weight of 70 kDa and 250 kDa. Nevertheless, these bigger molecules diffused less rapidly as proved by the gentler slope (Figure 7). Larger diameter probes, latex beads carboxylate-modified of 30 nm, were then used. In this case, there was no decrease of the fluorescent supernatant. All the latex beads stayed outside the mineralised beads (experiments were also performed with latex beads of 500 nm and 1000 nm, with the same observation – data not shown). Consequently, we

assume that the pore size diameter of our materials is between 22 and 30 nm, as required for immuno-isolation.

2.3. *Metabolic activity and cell viability*

Several characterisation methods were used to monitor the survival of cells entrapped within alginate capsules or hybrid beads. The physiological functions of HepG2 cells were firstly determined by measuring their respiration activity. The consumption rate of oxygen reflects directly the number of active cells. Results are shown in Figure 8. In purified alginate capsules, the oxygen consumption slightly increased over one month (Figure 8a). This observation indicates that the survival rate of entrapped cells was high. Nonetheless, the respiratory activity decreased after 30 days post-encapsulation. In fact, these results can be explained by the swelling behaviour and brittleness of alginate capsules. As highlighted in Figure 4b, the porosity of the alginate crust can reach 50 μm . Compared to the cell size (8 μm), these holes are large enough to allow cells to go out of the material. Consequently, the cellular density confined within the capsules analysed by oxymetry decreased as function of time. In the case of cells entrapped within mineralised beads, oxygen consumption sharply increased during the early stages following the immobilisation step ($\sim 220\%$) probably due to cell proliferation. As already highlighted by Figure 4d and Figure 7, Figure 8b shows that HepG2 cells cannot leave the mineralised beads thanks to the adequate porosity of these beads. Then, the oxygen consumption remained constant during more than 42 days. This promising result also suggests that the encapsulation and the mineralisation processes are totally benign for sensitive mammalian cells.

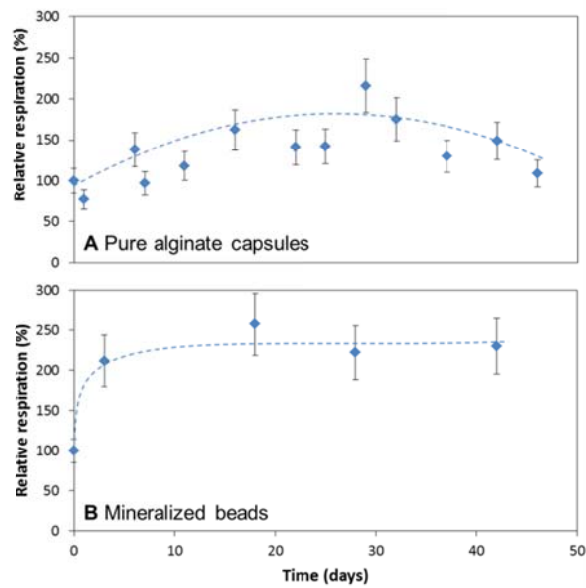


Figure 8. Comparison of oxygen consumption at HepG2 cells encapsulated within (a) alginate capsule or (b) mineralised bead. 100 % corresponds to the oxygen consumption of cells entrapped within one bead ($1.8 \cdot 10^2 \mu\text{mole of O}_2 \text{ hour}^{-1} \text{ bead}^{-1}$). Results are presented as means $\pm$ 1 S.D. (n = 3).

In order to confirm these data, cell viability was assessed by fluorescence microscopy after staining entrapped HepG2 cells with a commercially available fluorophore (FDA). If cells are still alive, they exhibit a green fluorescence due to the presence of fluorescein produced via the release of FDA by intracellular esterase. Figure 9 shows representative micrographs of the hybrid beads taken in brightfield and fluorescent modes.

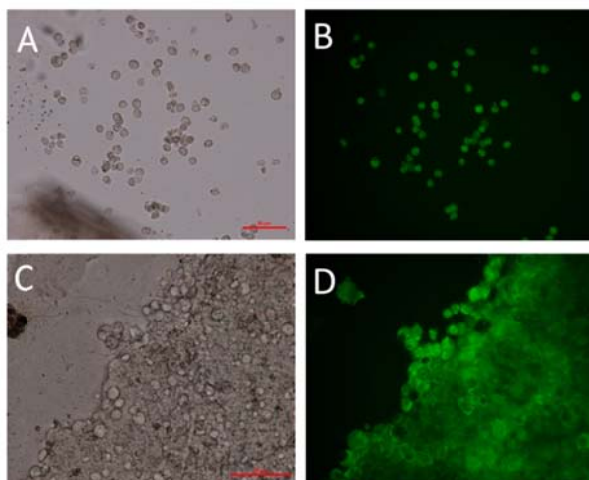


Figure 9. Microscopy images highlighting the survival of cells 6 weeks after immobilisation. Brightfield (a, c) and fluorescent microscopy images (b, d) of HepG2 cells three-dimensionally entrapped within a mineralised bead and labelled with fluorescein diacetate (viability probe). The micrographs were taken 1 day (a, b) and 42 days (c, d) post-encapsulation

One hour after encapsulation, 90 % of cells, homogenously dispersed within the beads, were alive in the matrix as shown in Figure 9a and b. Forty-two days later, cells were still alive (Figure 9c and d). They were spread in a carpet-like fashion within the beads. Owing to the rigidity of hybrid alginate-silica beads, cells cannot divide and grow as they would without any constraints in culture flask. HepG2 could be able to divide one or two times as suggested by the oxygen consumption graph (Figure 9b) and by the optical micrograph (Figure 9c). However, the growth of the daughter cells would be greatly restricted by the cages that are created around them during the silica polymerisation. Indeed, the oxygen consumption rate of each bead did not gradually increase as a function of time. This is very promising results. In fact, the preservation of the mitotic activity of cells is not the first goal to target some kinds of medical applications. For instance, the synthesis of a “bioartificial pancreas” is based on the encapsulation of non-dividing cells, namely the beta-cells.

Finally, the efficiency of the immobilisation method was validated by the human albumin produced and released in the supernatant by the entrapped HepG2 cells. Twice a week, supernatants were retrieved and replaced by fresh medium. The Figure 10 shows albumin concentration daily secreted into the supernatant. These data show that large molecules (like proteins) can diffuse through the mineralised beads, while cells remain confined within the material during a long period of time.

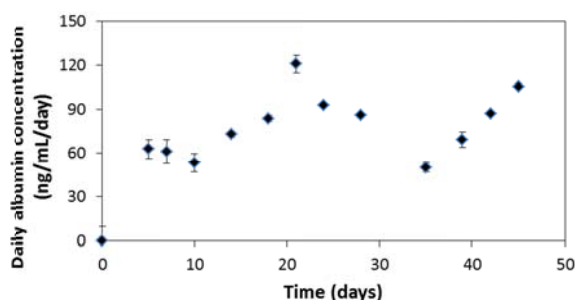


Figure 10. Amount of human albumin secreted by HepG2 cells in the supernatant of the mineralised beads. Concentrations showed the daily albumin released outside of the hybrid alginate-silica material as means $\pm$ 1 S.D. (n = 3).

3. CONCLUSIONS

HepG2 cells, selected as a cell model for secreting cells, were encapsulated into hybrid alginate-silica beads. This work demonstrates that whole alginate capsules can be completely and homogeneously mineralised by silica. Moreover, the deposition of aqueous silica species throughout the capsules greatly improves their long-term mechanical performance. The material precursors (sodium alginate and sodium silicate) used to construct the beads are fully biocompatible as indicated by the LDH assay and by the *in vitro* immune test (IL-8). After the encapsulation step, more than 90 % of cells were kept alive.

The biological activity of entrapped cells was perfectly preserved during more than 45 days as shown by the respiration activity and the secretion of albumin. Direct observations of mineralised bead by fluorescent microscopy suggest that cells were able to divide once post-immobilisation. Besides, the hybrid beads are porous, allow the diffusion of nutrients and metabolites through it and meet the requirements for successful immuno-isolation with a pore size diameter beneath 30 nm. Such highly biocompatible hybrid systems with long-term survival could contribute towards the creation of an “artificial organ” to treat human disorders. Further works are currently being carried out on *in vivo* studies to study the efficiency of the present hybrid material on animals. In the future, such kind of smart materials could be used to develop a novel organ substitution technology. Particularly, the synthesis method developed in this work could be used to entrap beta-cells in order to design a new treatment for the *Diabetes mellitus*.

4. MATERIALS AND METHODS

4.1. Chemical Materials

Ethanol (99.5 %, anhydrous), methanol (99.8 %), D-sorbitol (99.5 %), sodium chloride (99.5 %), calcium chloride (dihydrate, 99 %), EGTA (99 %), sodium alginate powder (sodium salt from brown algae), silica nanopowder (99.5 %, 5-15 nm), fluorescein isothiocyanate Dextran (Dextran-FITC) and latex beads carboxylate-modified (L5155) were provided by Sigma-Aldrich; and glycerol (p.a.), sodium silicate (assay 25.5-28.5 % SiO₂) by Merck. The Dubelcco's Modified Eagle Medium (DMEM), the Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI) and the foetal bovine serum were purchased from Invitrogen (Carsbald, USA). Before used, sodium alginate powder was purified according to the method described by de Vos *et al.* [28]. Briefly, this anionic polysaccharide was dissolved in an aqueous solution of EGTA 1 mM. The insoluble part of the crude commercial mixture was removed through successive filtrations (from 5 to 0.45 µm). The alginate fraction was then precipitated via the addition of HCl 2 M at 4°C. The resulting gel was successively washed with HCl 0.01 M, chloroform and butanol. A clear solution was then recovered by raising the pH to 7.0 (NaOH 0.5 M). Finally the purified alginate was precipitated via the addition of absolute ethanol and freeze-dried.

4.2. Biological Materials

HepG2 cells (Hepatocellular Liver Carcinoma Cell line) were cultivated in Dubelcco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10 % of foetal bovine serum in 75-cm² polystyrene flasks (Costar, Lowell, USA). The cells were incubated at 37°C (95 % air/ 5 % CO₂). After three days of cultivation, cells were washed with PBS (Phosphate Buffer Saline) and treated with a trypsin/EDTA cocktail.

Trypsinised cells were then centrifuged and collected in fresh medium with serum either for cultivation or future encapsulation.

4.3. Synthesis of living hybrid microcapsules

This section presents two different routes to encapsulate HepG2 within biocompatible capsules or beads under sterile conditions.

Method A. Polymeric capsules were prepared by extruding a cell suspension (1.5×10^6 cells ml^{-1}) containing 1.0 % of purified sodium alginate into a calcium chloride solution (110 mM). The presence of Ca^{2+} cations act as cross-linkers between carboxylate functions of polysaccharide chains. Since the incubation time of the drops within the calcium chloride solution was quite short (5 min), the gelation process only occurred in the outer part of the drops, establishing a solid crust. The capsules were then recovered and 4 of them were put in test tubes filled with culture medium with serum and maintained in CO_2 incubation in the same conditions than for routine culture.

Method B. Mineralised beads were achieved according to the procedure described in Figure 11.

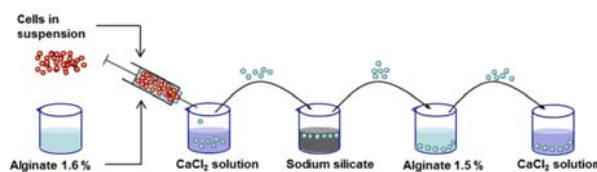


Figure 11. Steps for microencapsulation of animal cells into hybrid alginate-silica beads.

Cells in suspension are pre-encapsulated in Ca-alginate capsules and transferred in a diluted sodium silicate solution. The beads are finally coated with a Ca-alginate layer.

Firstly, cells in their buffered culture medium (pH 7.4) were pre-encapsulated with Ca-alginate (1.6 % wt). The final cell density was 1.5×10^6 cells ml^{-1} . The newly formed alginate spheres were added to a diluted sodium silicate solution (1.5 M) for around 30 seconds. A white colour appeared on their surface, and they were collected.

Additional external alginate layer was formed by re-suspending the beads in 1.5 % sodium alginate solution for 3 min. The outer layer was gelled by the addition CaCl_2 solution (110 mM).

4.4. Characterization techniques

4.4.1. Cytotoxicity test

All cells contain the cytosolic enzyme called LDH (Lactate dehydrogenase). This latter is only located in the cytoplasm. When cells are dying, the plasma membrane becomes permeable and cytosolic components go out (e.g. LDH). A cytotoxicity test can thus be performed by measuring the LDH released in the supernatant. LDH was quantified in samples using the “Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS}” from Roche Applied Science Laboratory. Briefly, 50,000 cells were seeded in a 24-wells plate. After 24 hours of incubation, potentially toxic chemicals were added to each well. After five hours of incubation, the supernatant of each well was collected. The HepG2 cells, still attached to the bottom of the wells, were then lysed by Triton X-100 (10 %) in order to recover the intracellular LDH of intact cells. The extracellular and intracellular LDH activity was then obtained by measuring the absorbance of samples at 490 nm according to the manufacturer’s instructions.

4.4.2. Biocompatibility – Immune test

Monocytes THP-1 were used to investigate the biocompatibility of the capsule. THP-1 cells secrete IL-8 (Interleukin, a primary inflammatory cytokine) in response to proinflammatory stimuli (e.g. stress, viruses, lethal compounds) in their environment. In this case, monocytes THP-1 (commonly used immune defenders for *in vitro* experimentations [29-31]) were employed to quantify their proinflammatory response

when they are in contact with the components of the hybrid beads. In other words, the amount of IL-8 in the supernatant is an indirect indicator of the biocompatibility of the materials. Briefly, THP-1 cells were cultured in serum-free RPMI medium, for 24 h at 37° C before experimentation to prevent any interference with serum factors. The day after, cells were washed, re-suspended in complete medium and then stimulated with our materials. After 24h of incubation at 37° C in an atmosphere of 5 % CO₂, the samples were centrifuged at 1000 rpm. for 5 min. The supernatants were collected and stored at -18° C. The IL-8 concentration was assayed by an ELISA test “Quantikine[®] Human CXCL8/IL-8 Immunoassay” developed by R&D Systems, Inc., according to the manufacturer's protocol.

4.4.3. Material properties

Beads were characterised by fluorescence microscopy in order to investigate the efficiency of the silicification process. Mineralised beads and alginate capsules were washed with the culture medium and then mixed with 20 µl of 2-(4-pyridyl)-5-((4-(2-dimethylaminocarbamoyl)methoxy)-phenyl)oxazole (PDMPO, 10 µM). After 5 min. of incubation, beads were observed with a fluorescent Multizoom AZ100 microscope system (Nikon). Micrographs were taken at 447/60 nm with a colour camera (DSRi1, Nikon) by illuminating the samples with a 377/50 nm excitation light. In the presence of silica, the unique PDMPO-silica interactions induce an intense blue fluorescence of the material [32].

Morphological and textural properties of alginate capsules and hybrid beads were collected using aerogels obtained from the hydrated materials. For that purpose, the capsules and beads were dehydrated with ethanol, dried through a process of critical point drying with liquid carbon dioxide and degassed at 70 milliTorrs overnight at room

temperature prior to the measurements. Specific surface area were calculated using the Brunauer-Emmett-Teller (B.E.T.) equation in the low pressure region (P/P_0 between 0,05 and 0,25) [33]. N_2 adsorption-desorption experiment was performed at -196°C with a volumetric adsorption analyser, Micromeritics Tristar 3000. Capsule and bead morphology were examined by field emission scanning electron microscopy (FE-SEM) on a JEOL JSM-7500F electron microscope with aerogel sputter-coated with gold. The chemical composition of the samples was characterised by an energy-dispersion X-rays analysis system using an acceleration potential of 15 kV, and a working distance of 8 mm.

Molecular weight cut-off (MWCO) and accessible porosity of the mineralised beads were determined using fluorescent probes with various hydrodynamic diameters: Dextran-FITC and latex beads carboxylate-modified. Their diffusion gives information about the immuno-isolation provided by the mineralised beads. Briefly, 350 beads (corresponding to 3.0 ml) were synthesized and aged during 1 week, then mixed with a phosphate buffered solution (6.0 ml, $\text{pH} = 7.4$) containing either 0.4 mg.l^{-1} of dextran (10, 70 or 250 kDa) labelled by fluorescein isothiocyanate or 200 μl of green fluorescent latex beads carboxylate-modified (2.5 % solids). The changes in the concentration of each substance were monitored at room temperature as a function of time. The experiments were performed during several days and the fluorescence intensity of the probes was recorded with a LS45 Luminescence Spectrometer built by Perkin Elmer: Dextran-FITC (Excitation wavelength = 494nm, emission = 518 nm), Latex beads (Excitation wavelength = 470 nm, emission = 515 nm).

4.4.4. Metabolic activity and cell viability

Firstly, the metabolic functions were assessed by monitoring the oxygen consumption in a Clark's cell vessel manufactured by HansaTech. Typically, four beads were added to the culture medium (0.8 ml). The respiration activity of entrapped HepG2 cells was measured just after encapsulation and taken as the reference value (100 %), and then over the whole experiment for the next samples.

Secondly, the cell viability was confirmed with a vital dye staining (fluorescein diacetate, FDA). Entrapped cells were incubated within the culture medium supplement with FDA (5 μ M) at room temperature for 5 minutes. Micrographs were collected at 536/40 nm with a colour camera (DSRi1, Nikon) by illuminating the samples with a 482/35 nm excitation light using a fluorescent microscope (Multizoom AZ100 microscope purchased from Nikon).

Thirdly, albumin protein secretion by entrapped cells was monitored over time. Every three or four days, the supernatant was collected and replaced by fresh culture medium. Thanks to the "Human Albumin ELISA Kit" developed by AssayPro, the concentration of human albumin was measured and standardised to obtain its daily production outside of the beads.

ACKNOWLEDGMENTS

Philippe Dandoy and Christophe F. Meunier are both grateful for financial support from the Belgian FNRS (Fonds de la Recherche Scientifique – FNRS) for the F.R.I.A. and the Postdoctoral Researcher position respectively. This work was performed in the frame of an Interuniversity Attraction Poles Program (INANOMAT-P6/17) - Belgian State - Belgian Science Policy. B.-L. Su acknowledges the Chinese Central Government

for an “Expert of the State” position in the program of “Thousands talents” and the Chinese Ministry of Education for a Changjiang Scholar position at the Wuhan University of Technology.

REFERENCES

- [1] Bisceglie V (1933) Über die antineoplastische immunität; heterologe Einpflanzung von Tumoren in Hühner-embryonen. *Ztschr Krebsforsch* 40: 122-140.
- [2] Löhr M, Hoffmeyer A, Kroger J, Freund M, Hain J et al. (2001) Microencapsulated cell-mediated treatment of inoperable pancreatic carcinoma. *Lancet* 357: 1591-1592.
- [3] Cirone P, Bourgeois J, Austin R, Chang P (2002) A novel approach to tumor suppression with microencapsulated recombinant cells. *Hum Gene Ther* 13: 1157-1166.
- [4] Leonard A, Dandoy P, Danloy E, Leroux G, Meunier CF et al. (2011) Whole-cell based hybrid materials for green energy production, environmental remediation and smart cell-therapy. *Chem Soc Rev* 40: 860-885.
- [5] Prakash S, Chang TMS (1996) Microencapsulated genetically engineered live *E. coli* DH5 cells administered orally to maintain normal plasma urea level in uremic rats. *Nat Med* 2: 883-887.
- [6] Langer R, Vacanti JP (1993) Tissue engineering. *Science* 260: 920-926.
- [7] Morris PJ (1995) Immunoprotection of therapeutic cell transplants by encapsulation. *Trends Biotechnol* 14: 163-167.
- [8] Desai TA, Hansford D, Ferrari M (1999) Characterization of micromachined silicon membranes for immunoisolation and bioseparation applications. *J Membr Sci* 159: 221-231.
- [9] Carturan G, Dal Toso R, Boninsegna S, Dal Monte R (2004) Encapsulation of functional cells by sol-gel silica: actual progress and perspectives for cell therapy. *J Mater Chem* 14: 2087-2098.
- [10] Bartkowiak A, Canaple L, Ceausoglu I, Nurdin N, Renken A et al. (1999) New multicomponent capsules for immunoisolation. *Annals of the NY Acad Sci* 875: 135-145.
- [11] de Vos P, Hamel AF, Tatarkiewicz K (2002) Considerations for successful transplantation of encapsulated pancreatic islets. *Diabetologia* 45: 159-173.
- [12] Lim F, Sun AM (1990) Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science* 210: 908-910.
- [13] Qi M, Gu Y, Sakata N, Kim D, Shirouzu Y et al. (2004) PVA hydrogel sheet macroencapsulation for the bioartificial pancreas. *Biomaterials* 25: 5885-5982.

- [14] La Flamme KE, Mor G, Gong D, La Tempa T, Fusaro VA et al. (2005) Nanoporous alumina capsules for cellular macroencapsulation: Transport and biocompatibility. *Diabetes Technol Ther* 7: 684-694.
- [15] Amoura M, Nassif N, Roux C, Livage J, Coradin T (2007) Sol-gel encapsulation of cells is not limited to silica: long-term viability of bacteria in alumina matrices. *Chem Commun* 39: 4015-4017.
- [16] Orive G, Gascón AR, Hernández RM, Igartua M, Pedraz JM (2003) Cell microencapsulation technology for biomedical purposes: novel insights and challenges. *Trends Pharmacol Sci* 24: 207-210.
- [17] Strand BL, Ryan TL, In't Veld P, Kulseng B, Rokstad AM et al. (2001) Poly-L-lysine induces fibrosis on alginate microcapsules via the induction of cytokines. *Cell Transplant* 10: 263-275.
- [18] Fischer D, Li Y, Ahlemeyer B, Krieglstein J, Kissel T (2003) In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials* 24: 1121-1131.
- [19] Coradin T, Nassif N, Livage J (2003) Silica–alginate composites for microencapsulation. *Appl Microbiol Biotechnol* 61: 429-434.
- [20] Boninsegna S, Dal Toso R, Dal Monte R, Carturan G (2003) Alginate microspheres loaded with animal cells and coated by a siliceous layer. *J Sol-Gel Sci Technol* 26: 1151-1157.
- [21] Carturan G, Dellagiacoma G, Rossi M, Dal Monte R, Muraca M (1997) Encapsulation of viable animal cells for hybrid bioartificial organs by the Biosil method. *Proc of SPIE* 3136: 366-373.
- [22] Sakai S, Ono T, Ijima H, Kawakami K (2001) Synthesis and transport characterization of alginate/aminopropyl-silicate/alginate microcapsule: Application to bioartificial pancreas. *Biomaterials* 22: 2827-2834.
- [23] Sakai S, Ono T, Ijima H, Kawakami K (2002) Alginate/aminopropyl-silicate/alginate membrane immunoisletability and insulin secretion of encapsulated islets. *Biotechnol Prog* 18: 401-403.
- [24] Sakai S, Kawabata K, Ono T, Ijima H, Kawakami K (2005) Development of mammalian cell-enclosing subsieve-size agarose capsules (<100 µm) for cell therapy. *Biomaterials* 26: 4786-4792.
- [25] Nieto A, Areva S, Wilson T, Viitala R, Vallet-Regi M (2009) Cell viability in a wet silica gel. *Acta Biomater* 5: 3478-3487.
- [26] Ackermann A, Gannon M (2007) Molecular regulation of pancreatic beta-cell mass development, maintenance and expression. *J Mol Endocrinol* 38: 193-206.
- [27] Gregory JM, Lilley JS, Misfeldt AA, Buscariollo DL, Russel WE et al. (2010) Incorporating type 1 diabetes prevention into clinical practice. *Clin Diabetes* 28: 61-70.
- [28] de Vos P, De Haan BJ, Wolters GHJ, Strubbe JH, Van Schilfgaarde R (1997) Improved biocompatibility but limited graft survival after purification of alginate for microencapsulation of pancreatic islets. *Diabetologia* 40: 262-270.

- [29] Kondori N, Mattsby-Baltzer I (2001) Secretion of IL-8 and IL-18 by THP-1 Cells induced by candida albicans. *Intersci Conf Antimicrob Agents and Chemother* 41st: J-133.
- [30] Nukada Y, Miyazawa M, Kosaka N, Sakaguchi H, Nishiyama N. Production of IL-8 in THP-1 cells following contact allergen stimulation via mitogen-activated protein kinase activation or tumor necrosis factor-alpha production. *J Toxicol Sci* 33: 175-185.
- [31] Mitjans M, Galbiati V, Lucchi L, Viviani B, Marinovich M et al. (2010) Use of IL-8 release and p38 MAPK activation in THP-1 cells to identify allergens and to assess their potency in vitro. *Toxicol In Vitro* 24: 1803-1809.
- [32] Shimizu K, Del Amo Y, Brzezinski M, Stucky G, Morse D (2001) A novel fluorescent silica tracer for biological silicification studies. *Chem Biol* 8: 1051-1060.
- [33] Brunauer S, Emmett P, Teller E (1938) Adsorption of gases in multimolecular layers. *J Am Chem Soc* 60: 309-319.
- [34] Arcangeli G, Cupelli V, Giuliano G (2001) Effects of silica on human lung fibroblast in culture. *Sci Total Environ* 270: 135-139.
- [35] Di Pasqua A, Sharma KK, Shi YL, Toms BB, Ouellette W et al. (2008) Cytotoxicity of mesoporous silica nanomaterials. *J Inorg Biochem* 102: 1416-1423.
- [36] Lee BW, Faller R, Sum AK, Vattulainen I, Patra M et al. (2004) Structural effects of small molecules on phospholipid bilayers investigated by molecular simulations. *Fluid Phase Equilib* 225: 63-68.
- [37] Ferrer ML, del Monte F, Levy D (2002) A novel and simple alcohol-free sol-gel route for encapsulation of labile protein. *Chem Mater* 14: 3619-3621.
- [38] Goneberg A, Verheyden A. Procédé de préparation d'une résine alkyde modifiée par un organo-polysiloxane. Belgian Patent No 510419, 1952.
- [39] Krimm H, Schnell H. Verfahren zur Herstellung hochmolekularer, linearer Organokieselsäurearylenpolyester. German Patent No 1136114, 1962.
- [40] Goldberg E, Powers E (1964) Polycarbonate-siloxo copolymers and blends. *J Polym Sci Polym Phys Ed* 2: 835-838.
- [41] Vaughn HA. Organopolysiloxane-polycarbonate copolymer. British Patent No 989379, 1965.
- [42] Coiffier A, Coradin T, Roux C, Bouvet OMM, Livage J (2001) Sol-gel encapsulation of bacteria: a comparison between alkoxide and aqueous routes. *J Mater Chem* 11: 2039-2044.
- [43] Rooke JC, Leonard A, Sarmiento H, Descy J, Su BL (2008) Photosynthesis within porous silica gel: viability and activity of encapsulated cyanobacteria. *J Mater Chem* 18: 2833-2841.
- [44] Nassif N, Bouvet OMM, Rager MN, Roux C, Coradin T et al. (2002) Living bacteria in silica gels. *Nat Mater* 1: 42-44.

- [45] Meunier CF, Van Cutsem P, Kwon YU, Su BL (2009) Investigation of different silica precursors: design of biocompatible silica gels with long term bio-activity of entrapped thylakoids toward artificial leaf. *J Mater Chem* 19: 4131-4137.
- [46] Meunier CF, Rooke JC, Leonard A, Van Cutsem P, Su BL (2010) Design of photochemical materials for carbohydrate production via the immobilisation of whole plant cells into a porous silica matrix. *J Mater Chem* 20: 929-936.
- [47] Meunier CF, Rooke JC, Hajdu K, Van Cutsem P, Cambier P et al. (2010) Insight into cellular response of plant cells confined within silica-based matrices. *Langmuir* 26: 6568-6575.
- [48] Perullini M, Jobbagy M, Bermudez Moretti M, Correa Garcia S, Bilmes SA (2008) Optimizing silica encapsulation of living cells: In situ evaluation of cellular stress. *Chem Mater* 20: 3015-3021.
- [49] Murua A, Portero A, Orive G, Hernandez RM, de Castro M et al. (2008) Cell microencapsulation technology: Towards clinical applications. *J Control Release* 132: 76-83.
- [50] Fukushima Y, Okamura K, Imai K, Motai H (1988) A new immobilization technique of whole cells and enzymes with colloidal silica and alginate. *Biotechnol Bioeng* 32: 584-594.
- [51] Coradin T, Coupe A, Livage J (2002) Influence of DNA, alginate, lysozyme and bovine serum albumin on sodium silicate condensation. *Mat Res Soc Symp Proc* 724: N.7.20.
- [52] Nagy JA, Herzberg KT, Masse EM, Zientara GP, Dvorak HF (1989) Exchange of macromolecules between plasma and peritoneal cavity in ascites tumor-bearing, normal, and serotonin-injected mice. *Cancer Res* 49: 5448-5458.

Chapitre 5.

Etudes des réactions *in vivo* engendrées par les matrices

« *Try again. Fail again. Fail better.* »

Samuel Beckett, écrivain, 1983.

Etudes des réactions *in vivo* engendrées par les matrices

Au cours de ces recherches, deux études *in vivo* ont été échafaudées pour évaluer les réactions d'un organisme envers les matrices synthétisées. Chronologiquement, la première eut lieu après avoir constaté la nécessité de pré-encapsuler les cellules dans une capsule d'alginate. Il s'agissait alors de mettre en évidence si l'alginate et la silice telles que préparées jusqu'alors allaient provoquer des réactions inflammatoires une fois implantées chez des animaux de laboratoire. Ensuite, sur la base des informations recueillies grâce à cette étude en Chine, la minéralisation de la capsule d'alginate fut imaginée. La seconde étude, effectuée aux FUNDP, se porte sur les résultats obtenus grâce à l'hybride synthétisé d'après l'article précédemment évoqué.

5.1 Essais à la Wuhan University of Technology (WUT)

Ce séjour scientifique de 3 mois effectué grâce aux subsides du FNRS avait pour objectif d'étudier la résistance de la capsule d'alginate et d'un gel de silice dans un organisme vivant. Il visait également à récolter de précieuses informations sur les réactions immunitaires et comportementales des animaux vis-à-vis de ces deux matériaux.

Les animaux furent répartis en plusieurs groupes :

- Un groupe contrôle (n=6), où les animaux ont juste été opérés sans implant ;
- Un groupe alginate (n=9), où des capsules d'alginate furent implantées dans le dos des rats ;
- Un groupe silice (n=9), où un gel de silice obtenu suivant la voie aqueuse fut implanté dans le dos des rats ;

Par manque de temps, l'opération des animaux et le suivi quotidien des animaux au cours de cette expérience se sont effectués en mon absence. Après avoir réalisé la synthèse des matériaux suivant les protocoles établis au chapitre précédent, ils ont été implantés dans les animaux pour une durée de 14 jours. Une fois ce temps écoulé, les animaux ont été réopérés pour recueillir des informations sur l'intégrité des gels de silice et des capsules d'alginate, ainsi que sur l'état de leur couche sous-cutanée. Les résultats ont révélé que, quel que soit le groupe, aucun des implants n'a pu être retrouvé. Tous les échantillons ont disparu par dissolution d'après le compte-rendu rapporté. De tels résultats avaient été reportés dans une étude¹ où la dégradation de films de silice avait été observée *in vitro* en raison des conditions de culture (température et pH).

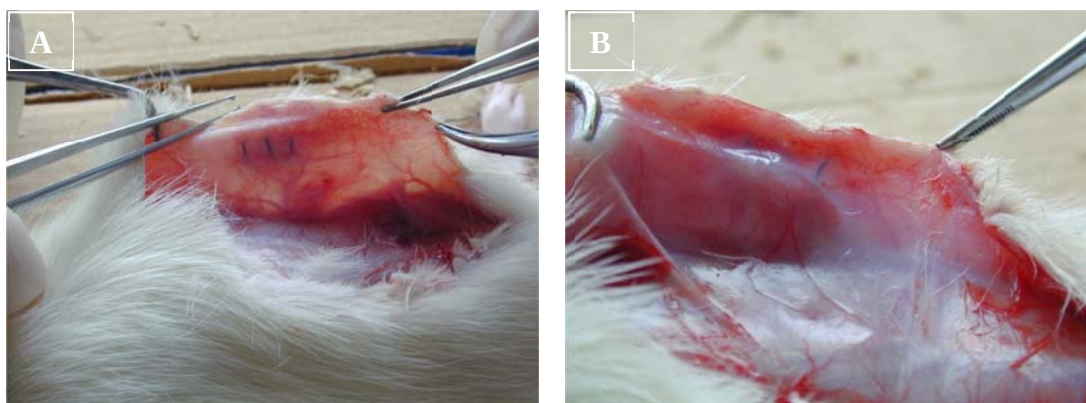


Figure 4.1. Photographies de la couche sous-cutanée de rats où étaient implantées des billes d'alginate (A) et le gel de silice (B).

En plus de cette information importante concernant la dissolution des matériaux, les rats du groupe silice semblaient présenter des kystes dans les tissus conjonctifs où les implants avaient été disposés. Ces kystes sont la conséquence d'une réaction de l'organisme qui s'oppose à la présence de ces implants. Il réagit donc en isolant le greffon pour qu'il ne puisse pas le perturber. Cette observation a amené un élément très important qui fut pris en compte pour mettre en œuvre la bille alginate-silice/alginate. Il faut concevoir une matrice dont la couche externe n'est pas la silice et renforcer la matrice pour empêcher sa dissolution parmi les fluides corporels. Tels étaient les objectifs visés par la bille minéralisée dont la seconde étude détaillée ci-après fournira les réponses.

¹ J.D Bass, D. Grosso, C. Boissière, E. Belamie, T. Coradin, C. Sanchez (2007), *Chem. Mater.* 19, 4349-4356.

5.2 Etude *in vivo* de la bille alginate-silice/alginate

Fort de l'expérience acquise *in vivo* au cours du séjour scientifique en Chine, le concept de minéralisation de la capsule d'alginate fut alors imaginé : une pré-encapsulation des cellules dans l'alginate qui les protégera des variations brutales dans leur environnement extracellulaire où la capsule d'alginate est minéralisée pour une meilleure robustesse. Le tout étant recouvert d'une couche externe d'alginate pour isoler les tissus d'un contact avec la silice.

Comme les résultats *in vitro* de la bille minéralisée alginate-silice/alginate ont montré beaucoup d'intérêt, il est question, dans l'article suivant, d'évaluer ses performances *in vivo*.

Cet article décrit les réactions provoquées par la bille minéralisée implantée chez des animaux de laboratoire. Les résultats ont été analysés d'après un suivi quotidien des animaux et leur changement comportemental, ainsi que par l'observation des coupes histologiques des tissus conjonctifs en contact avec la bille. Puisque des résultats avaient déjà été obtenus avec l'alginate et la silice, il s'agissait de comparer cette bille minéralisée (référéncée « bille ASA » dans cette publication) à une autre matrice pour recueillir de nouvelles informations. Pour cette étude, un hybride alginate-silice (bille AS) fut spécialement synthétisé. Le mode opératoire pour la synthèse de cette bille AS suit une co-gelification de l'alginate et de la silice, et est détaillé dans l'article, accompagné de sa caractérisation. Le but d'utiliser un nouveau type de billes était de montrer que dans le cas où la silice était le dernier rempart de la matrice, elle pouvait donner l'alerte au système immunitaire. Ce fut le cas d'après les diverses analyses effectuées, au contraire de la bille minéralisée qui n'a pas provoqué de modification notable après comparaison avec le groupe contrôle. Cette comparaison entre les groupes a pu être effectuée au moyen de coupes histologiques des échantillons de tissus sous-cutanés et de muscles entre lesquels les billes ont été disposées. La différence entre ces deux billes se marquant encore davantage dans les groupes où des cellules HepG2 (donc humaines) étaient encapsulées. Les résultats montrent que les vertus immuno-isolatrices semblaient être supérieures pour la bille minéralisée. Les analyses finales par microscopie à balayage ont démontré la dispersion des cellules au sein de cette bille et la conservation de sa morphologie après 1 mois post-implantation, au contraire des billes AS qui étaient fermement recouvertes de tissus, ce qui n'a pas permis de pouvoir les observer.

A Model of Artificial Organ by Encapsulation of Human Cells within Mineralised Beads: *in vivo* Biocompatibility Study

Philippe Dandoy^{1,†}, Christophe F. Meunier^{1,‡}, Laetitia Giordano², Nathalie Caron²,

Carine Michiels³, Bao-Lian Su^{1,4,*}

¹Laboratory of Inorganic Materials Chemistry (CMI),

²Laboratory of Molecular Physiology (URPhyM-NARILIS)

³Laboratory of Biochemistry and Cellular Biology (URBC-NARILIS),

The University of Namur (FUNDP), 61 rue de Bruxelles, B-5000 Namur, Belgium

⁴State Key Laboratory of Advanced Technology for Materials Synthesis and Processing
Wuhan University of Technology, 122 Luoshi Road, 430070 Wuhan, Hubei, China

ABSTRACT

This work investigates the *in vivo* biocompatibility of mechanically resistant hybrid beads, a model of artificial organ, synthesised *via* the encapsulation of living cells (HepG2) within alginate-silica composites. Particularly, two types of beads (alginate-silica hybrid (AS) or alginate/silica hybrid subsequently covered by an external layer of pure alginate (ASA)), with or without HepG2 cells, were implanted into several female Wistar rats. After four weeks, the potential inflammatory local response that might be due to the presence of materials was studied by optical microscopy. The results showed that the performance of ASA beads was better compared to AS beads. As a matter of fact, less abnormal rat behaviour and less inflammatory cells in histological sections were observed in the case of ASA beads. This suggests that a direct contact of silica gel

[†] PhD position from F.R.I.A. (Fonds National de la Recherche Scientifique, 5, rue d'Egmont, B-1000 Bruxelles, Belgium)

[‡] Postdoctoral Researcher F.R.S.-FNRS (Fonds National de la Recherche Scientifique, 5, rue d'Egmont, B-1000 Bruxelles, Belgium)

* Corresponding author, e-mail address: bao-lian.su@fundp.ac.be

with living tissues has to be avoided. For that reason, alginate-silica composite materials coated with an extra-alginate shell offer much promise in the development of robust implantation devices and artificial organs.

Key words: Immuno-isolation, Artificial organ, Hybrid materials, Animal cell encapsulation, *In vivo* biocompatibility

1. INTRODUCTION

Living cell encapsulation currently attracts much interest owing to the new applications offered by this technology such as bioreactors, biocatalysis, biosensors or cell therapy [1]. In recent years, a variety of cell species, including yeasts [2,3], bacteria [4], plant cells [6-8] and animal cells [9-10], has been immobilised within inorganic-based materials. In the medical field, this technology is particularly promising to overcome the shortage of organ donors. In fact, the progress made in this specific domain could improve the compatibility between organisms and current encapsulating materials. For instance, in cell therapy, biocompatibility encompasses three major criteria: (1) the use of materials that are compatible with both the encapsulated cells and the human body (to target a graft for an artificial organ), (2) the development of synthesis methods that permit the *in-situ* construction of a matrix without damaging the cellular integrity and finally (3) the control of pore size in the host material, allowing nutrients and metabolites to permeate throughout the support [11].

According to the literature, silica hydrogels have emerged as the prime materials to entrap living species since they can be synthesised through mild conditions (“*chimie douce*”) via the sol-gel process. The success of this technique is due to its flexibility in term of constructing materials with good mechanical and thermal stability, tuned pore size, as well as an adapted morphology. Nevertheless, the encapsulation of animal cells is a challenging task. In particular, immuno-isolation is a key factor to successfully

develop cell therapy technologies where cells are protected against rejection by the immune system whilst allowing nutrients and metabolites to be evacuated. This protection can only be conferred by a biocompatible and semi-permeable membrane. Although previous works generally report a molecular weight cut-off (MWCO) around 150 kDa [12,13], assigned to immunoglobulin G (IgG, the smallest antibody involved in the immune response), the pore size requirements for the membrane are still set as being between approximately 5 to 20 nm [14-16]. Higher MWCOs could permit immune molecules to enter. Moreover, the materials should be sufficiently resistant with time to ensure long-term implantation of the graft. However silica materials have been reported as strong macrophage-attracting substances despite their overall advantages [17]. Consequently, much research has been carried out using biopolymers such as polysaccharides to immobilise biological matter. For instance, sodium alginate crosslinked with calcium chloride has been found to be an excellent porous material for living cell encapsulation [19]. However, this ionotropic hydrogel presents the disadvantage of low mechanical strength and poor chemical durability [20]. Therefore, the properties of alginate materials need to be improved for efficient immuno-isolation. For these reasons, Carturan and Sakai have separately published two different methods for the fabrication of alginate-silica/alginate capsules [21-25]. In both cases, the procedure implies the preliminary formation of alginate beads encapsulating the cells before the deposition of an external silica shell, which is finally coated with Ca-alginate layer. In this way, the mechanical advantages of silica are exploited yet its drawbacks avoided. Nevertheless, in these materials, the silica component was only a thin layer formed at the biopolymer surface and not within the Ca-alginate hydrogel. As it is well-known that thin porous silica films undergoes a rapid dissolution under biological

conditions (aqueous media, pH 7.4, 37° C) [26, 27], the long-term mechanical resistance of these capsules is not high enough for clinical applications.

Very recently, we reported the encapsulation of HepG2 cells within resistant mineralised beads composed of two parts: an alginate-silica core and a Ca-alginate layer (ASA) [28]. The results showed that entrapped cells can be kept alive for at least 6 weeks post-encapsulation. However, although various materials have been developed, few *in vivo* data are available to evaluate the benefits and drawbacks of silica hybrid materials. The aim of the present study was to investigate whether these silica-based materials induce inflammatory effects when implanted within rats for one month. More precisely, the relative *in vivo* biocompatibility of ASA materials were evaluated and compared to alginate-silica hybrid beads (AS) that are synthesised via a conventional synthesis method reported elsewhere [29]. To do so, muscle and subcutaneous tissues of Wistar rats, which surround the implants, were collected and analysed by optical microscopy.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Materials

Calcium chloride (dihydrate, 99 %), sodium alginate powder (sodium salt from brown algae), ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA, 99 %), hydrochloric acid (HCl, 37 %), chloroform (99 %), butanol (99 %) were provided by Sigma-Aldrich; and sodium silicate (assay 25.5-28.5 % SiO₂) by Merck. The Dubelcco's Modified Eagle Medium (DMEM) and the foetal bovine serum were purchased from Invitrogen (Carsbad, USA). Before used, commercial sodium alginate powder was purified according to the method published by de Vos [30].

2.2. HepG2 cells culture conditions

Encapsulation was carried out using human hepatoma HepG2 cells (Hepatocellular Liver Carcinoma Cell line) cultivated in 75 cm² polystyrene flasks (Costar, Lowell, USA) with 18 ml DMEM medium and 10 % foetal bovine serum, and incubated at 37° C in a humid atmosphere of 5 % CO₂.

2.3. Encapsulation process

Preparation of HepG2 cells

Prior to encapsulation, cells were first washed with a sterile phosphate buffer solution (PBS). The cells were then suspended in their medium by a trypsinisation process accomplished via the addition of a trypsin/EDTA cocktail. The mixture was then centrifuged at 1000 rpm for 4 min, the supernatant was discarded and fresh DMEM medium + serum were added to resuspend the HepG2 cells.

Mineralised bead synthesis

Type AS. The first route of encapsulation used the method described by J. Livage and coworkers with some modifications [29]. The alginate-silica beads were obtained by mixing cells, in suspension within their buffered culture medium (pH = 7.4), with purified Na-alginate (1.6 % wt), where the final cell density was $1.5 \cdot 10^6$ cells ml⁻¹. A sodium silicate solution (1.5 M) was then added (1:6 vol.) and the mixture dropped into a calcium chloride solution (110 mM) using a syringe with a 24G-needle in order to crosslink the alginate and silica to form the AS beads.

Type ASA Secondly, the alginate-silica/alginate beads were synthesised according to the 3-step procedure previously reported [28]. The cells suspended in their buffered culture medium ($1.5 \cdot 10^6$ cells ml⁻¹) were first encapsulated within Ca-alginate beads (1.6 % wt), by dropping a cell culture/Na-alginate mix into a CaCl₂ solution (110 mM) using a syringe with a 24G-needle. The alginate capsules were then placed in a

sodium silicate solution (1.5 M) for a short period of time (30 s). The mineralised beads were then collected and an external Ca-alginate crust was formed by re-suspending the beads in 1.5 % sodium alginate solution for 3 min. Finally, the hybrid materials were dipped into a CaCl_2 solution (110 mM) in order to crosslink the outer sodium alginate layer.

2.4. Characterisation techniques

Bead morphology was examined by field emission scanning electron microscopy (FE-SEM) using a JEOL JSM-7500F electron microscope. Prior to observation, the beads were dehydrated with ethanol, and subsequently subjected to critical point drying with liquid carbon dioxide under supercritical conditions. Finally, they were sputter-coated with gold. The chemical composition of the samples was characterised by an energy-dispersion X-rays analysis (EDX) system using a 15 kV accelerating potential at a working distance of 8 mm.

2.5. Animal experiments

Animals. The present study conformed to the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the protocol has been approved by the local Ethical Commission on Animal Welfare. The experiments were performed on 8 weeks old female Wistar rats bred in our animal facility under controlled environmental conditions. The animals had free access to water and were fed with a standard rat chow diet.

Surgical procedure. The rats were anaesthetised with a mix of ketamine/xylazine (2 ml/kg i.p. of a 2 % ketamine/0.3 % xylazine isotonic saline solution) and placed on a heated table to maintain body temperature between 37 and 38° C. A skin incision was performed along the back midline between the shoulder blades. Two beads were then implanted subcutaneously on each side of the surgical site. The incision was closed

using Ethicon Vicryl suture 4-0 thread and the rats were allowed to recover. Throughout the four weeks experiment, daily observations were made related to the welfare and behaviour of the animals. This assessment consisted to manipulate the animals, observe their rodent habits, detect fear, anxiety, stress, discomfort and identify wound or trace of itching around the surgical site. Treatment with Astrexin applied on the skin surface was only performed when signs of inflammation were detected by daily examination. Four weeks later, the rats were submitted to euthanasia (200 mg/kg Nembutal i.p. followed by exsanguination) to allow collection of the beads as well as sampling of the surrounding tissue, in order to observe potential local inflammation.

Experimental groups. Three groups were considered:

- Control group (n = 3): the rats were only submitted to anaesthesia, surgery and recovery ;
- AS bead implants (n = 10) and ASA bead implants (n = 10) groups. These two groups were subdivided in two subgroups, rats were randomly implanted with either blank beads containing no cells (subgroup 1 and 3, n = 5 each) or with beads containing HepG2 cells to evaluate the immuno-isolation (subgroup 2 and 4, n = 5 each).

2.6. Histological staining

Muscle and subcutaneous tissues collected around the beads were fixed in Duboscq-Brazil fluid, embedded in paraffin and cut into 6 µm thick sections, for histological staining purposes. To allow histological examination, a trichromic stain was employed using the HES protocol (Haematoxylin – Eosin– Safranin) : the slides were submitted to successive baths of toluene, methanol, water, haematoxylin, water, hydrochloric acid + ethanol, water, eosin, water, ethanol, isopropanol, safranin, isopropanol and toluene using a continuous linear stainer COT 20 (Medite Inc.). Each bath lasted 150 s with a dripping step of 10 s between baths. Coverslips were attached

with DPX (a mixture of Distyrene, a Plasticizer (tricresyl phosphate), and Xylene) and the slides were observed using a Multizoom AZ100 microscope (Nikon) with a DS-Ri1 camera in bright-field mode.

3. RESULTS & DISCUSSION

3.1. Bead synthesis and characterisation

The composition, porosity and robustness of materials play a major role to obtain implanted artificial organs with long-term efficiency. The use of polysaccharide hydrogels is commonplace, with alginate having been employed the most because of its recognised biocompatibility. Nevertheless, silica materials derived by the sol-gel process offer several advantages over biopolymers, such as negligible swelling in aqueous media, controllable porosity, chemical inertness, and hardness. In this work, two kinds of hybrid materials, which combined the advantages of alginate (e.g. biocompatibility) with those of silica (e.g. robustness), were synthesised under mild conditions (room temperature and atmospheric pressure).

Previous *in vitro* biocompatibility tests have shown an absence of a proinflammatory response from cells in direct contact with alginate or silica nanopowder [28]. These latter were used to fabricate two types of mineralised beads: AS and ASA beads. As discussed, the benefits brought from the mineralisation of the alginate capsule led to an increase in mechanical strength and a concomitant improvement in the control of the porosity of the encapsulating device. Before testing the *in vivo* biocompatibility of materials, the hybrid beads were characterised by different techniques. SEM and EDX studies were undertaken to confirm the composition of the beads. As shown in Fig.1(i), the external morphology of beads depended on the synthesis pathway. As a matter of fact, the AS bead surface was very

smooth whereas the outer layer of ASA beads displayed a furrow-like morphology, characteristic of an alginate surface owing to the cross-linking contraction of the polysaccharide chains during the sample preparation. Additionally, a greater silicon to carbon ratio were detected in the case of AS bead as the EDX graphs (Fig. 1(ii)) show a higher intensity for the SiK α peak when compared to the ASA bead. These results suggest that the surface of AS beads is composed of a mix of Ca-alginate and silica whereas ASA beads are covered by an alginate layer.

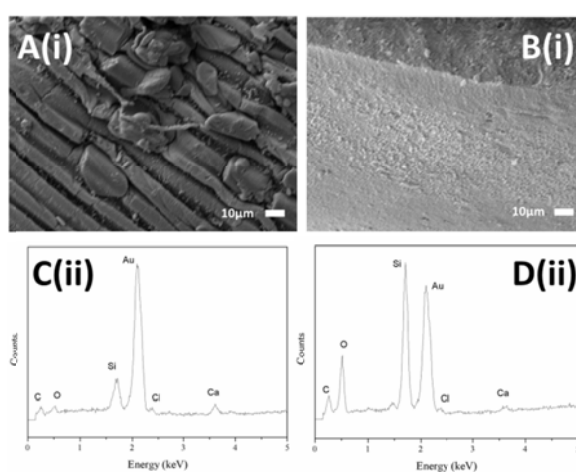


Fig. 1. SEM micrographs (i) and EDX spectra (ii) of the ASA bead (a, c) and AS bead (b, d)

As preliminary *in vitro* results suggested that these materials were biocompatible [28], *in vivo* experiments were performed to evaluate the inflammatory reactions within the surrounding tissues of these implanted beads.

3.2. *In vivo* experiments

In vivo experiments were conducted to compare the performance of AS beads against ASA beads by analysing the potential lesions of surrounding tissues of the beads four weeks after subcutaneous implantation within the back midline of female rats. Throughout the experiment, the body weight gain ratio was similar in both control and

treated groups (table 1), thereby indicating a good overall health and nutrition status of the rats.

		Weight gain ratio	Use of astrexine
	Control	16%	1/3 animals (33%)
<u>AS bead</u>	Subgroup 1	27%	2/5 animals (40%)
	Subgroup 2	24%	4/5 animals (80%)
<u>ASA bead</u>	Subgroup 3	24%	1/5 animals (20%)
	Subgroup 4	18%	2/5 animals (40%)

Table 1. Weight gain ratio of 2 month old Wistar rats 1 month after implantation of AS and ASA beads; and use of astrexine for wound healing subsequent to the operation.

Some animals scratched the incision site and astrexine was used to promote healing of the inflamed wound as this product facilitates the cicatrisation and relieves the animal's pain. Overall assessment revealed that more than half of the rats implanted with AS beads presented surgical site irritation, as use of astrexine was often required. In particular, in subgroup 2, only one animal did not present any signs of scratching. *A contrario*, in the ASA beads group, only 3 out of 10 of the animals (subgroups 3 and 4) felt bothered by the beads. This ratio was similar to the control group, thereby suggesting that inflammation could be related to surgery rather than implanted ASA beads. These primary observations led to similar conclusions as those drawn by Arcangeli [17] that silica seemed to be an inappropriate material when it is in direct contact with living tissue as it may induce macrophage infiltration. Additionally, table 1 highlights that the immuno-isolation of HepG2 cells entrapped within AS beads are quite poor as evidenced by the higher percentage of animals from the subgroup 2 showing signs of scratching around the surgical site. Conversely, ASA beads provide a quite good immuno-protection for HepG2 cells.

Besides, intact beads were collected at the end of the four weeks experiment. The observations of histological sections revealed more information about the cell content of tissues in contact with the beads. Abnormalities in the subcutaneous tissue or muscles that were in contact with the beads can be identified by the presence of mast cells and polymorphonuclear leukocytes (PML). These cells, which are characteristic signals of inflammation, are especially found near blood vessels. Their presence is not categorically associated to rejection because they are always circulating as sentinel cells. Pictures from the control group in Fig. 2 confirmed the presence of these resident cells in all subjects.

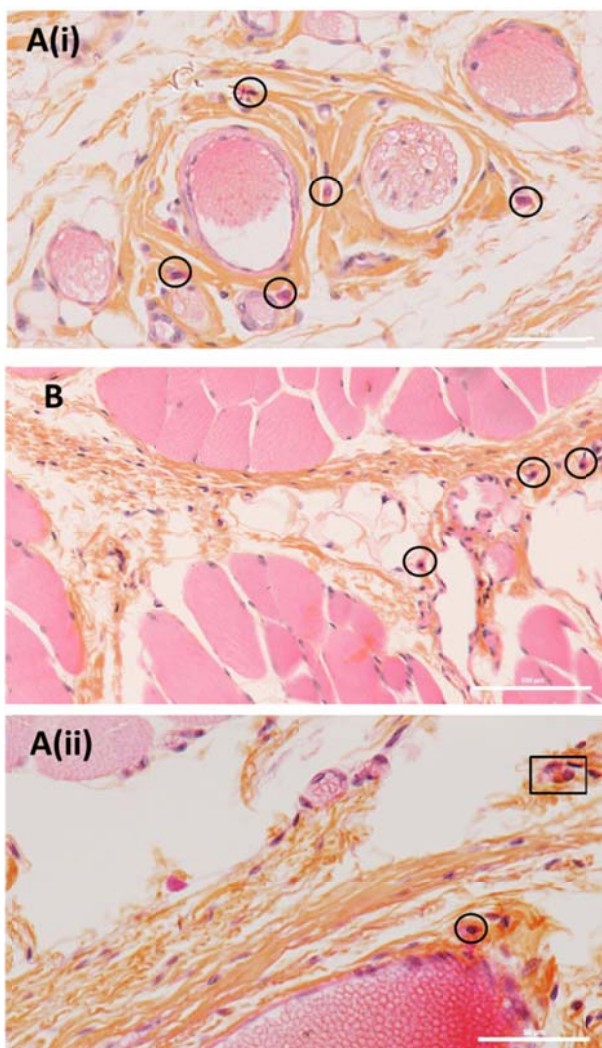


Fig. 2. Histological sections of blood vessel (A) and muscle (B) of Wistar rats from the control group (observations of the tissue one month post-operation). Mast cells are identified by circles and PML by squares.

These sentinels are identifiable owing to their purple nucleus surrounded by a strong-red staining, especially for PML which can display various shapes, usually bi- or tri-lobed. Figs. 3 to 6 highlight sections for all four subgroups of treated rats. No necrosis or lesions in the tissue were observed in any sample. PML and mast cells were observed in subgroups 1 to 4 but their presence was not significant enough to conclude that inflammation or rejection was occurring. However, in comparison to the control group, more indicators of rejection were observed in subgroups 1 and 2, and to a lesser extent in subgroups 3 and 4. Usually found close to blood vessels, mast cells were detected in higher abundance much further away in the AS subgroups.

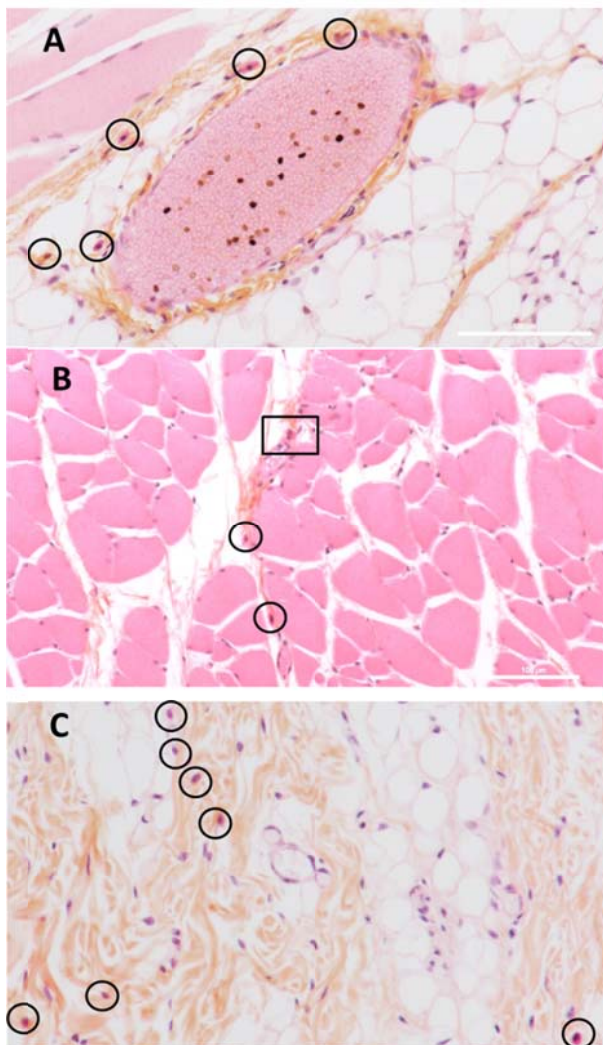


Fig. 3. Histological sections of blood vessel (A), muscle (B) and collagen (C) of Wistar rats from subgroup 1: four AS beads without HepG2 cells implanted in their back midline for one month. High quantity of mast cells were found further away from the blood vessel, characteristic of potential alert. Mast cells are identified by circles and PML by squares.

They were present around blood vessels (Fig. 3A and 4A) but also deep within the collagen matrix (Fig. 3C) and around muscles (Fig. 3B and 4B). Their progression is characteristic of a potential infection alert in these regions. At the same time, mast cells secrete enzymes (*viz.* tryptase, collagenase) which allow them to penetrate within the collagen in order to investigate the tissues more thoroughly than just around the blood vessels (Fig. 3C). In some cases, mast cells and PML were even found between the muscles (Fig. 3B).

The quantity of mast cells was much higher near the blood vessel in subgroup 2 than the quantity found around one blood vessel of the control group. For instance, Fig. 4A (subgroup 2) displays three times more mast cells than Fig. 2A (control). The inflammation factors were thus more numerous for subgroup 2, where HepG2 cells were encapsulated inside the AS beads.

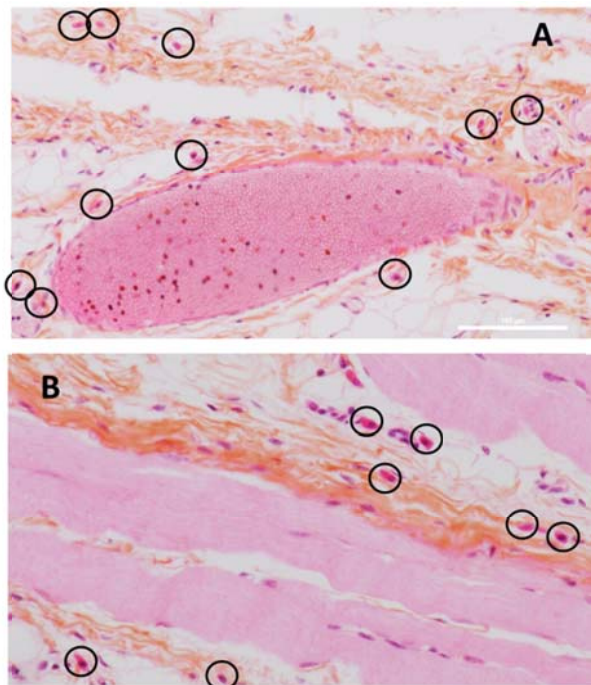


Fig 4. Histological sections of blood vessel (A) and muscle (B) and a blood vessel of Wistar rats from subgroup 2: four AS beads with HepG2 cells implanted in their dorsal midline for one month. Mast cells are identified by circles and PML by squares.

These observations suggested that AS beads were not appropriate as immuno-isolation was probably not maintained over the course of one month. Additionally, silica materials in direct contact with the living tissue could cause long-term damage. Observation of the connective tissues around muscles also confirmed the conclusions drawn from the behaviour assessment of the rats. The AS beads, implanted in their back, caused regular irritation leading to delayed healing of the operation wound.

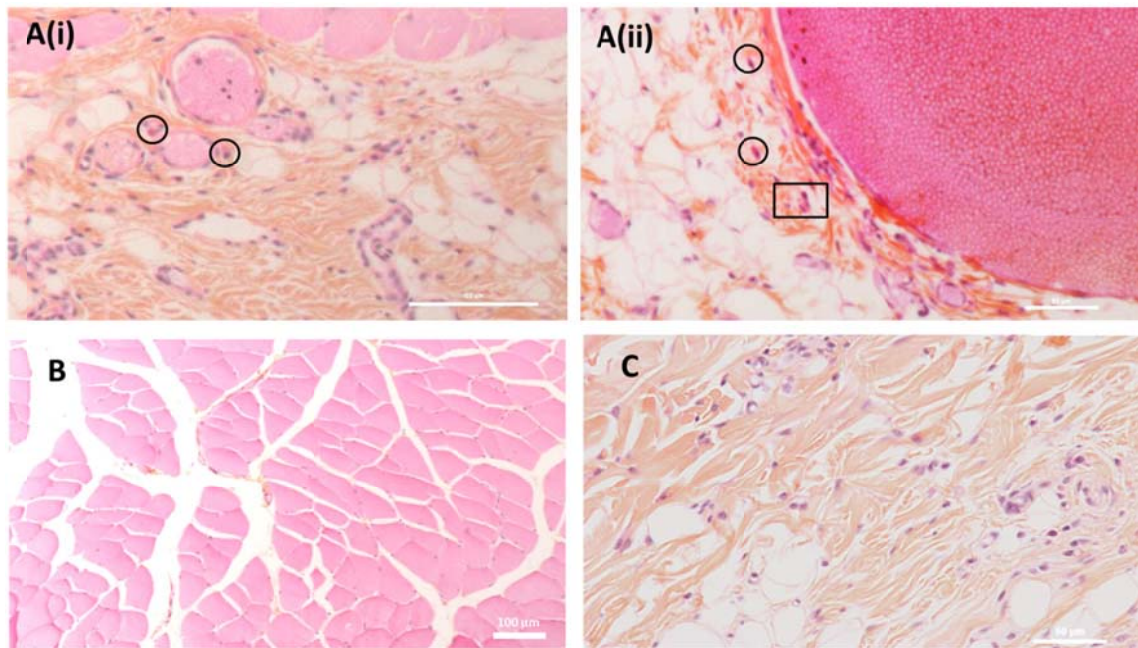


Fig. 5. Histological sections of blood vessel (A), muscle (B) and collagen (C) of Wistar rats from subgroup 3: four ASA beads without HepG2 cells implanted in their dorsal midline for one month. Mast cells are identified by circles and PML by squares.

Histological observations of subgroup 3 (ASA beads, no cells) suggested that the tissues were less inflamed by this implant (Fig. 5). Mast cells and PML were located close to the blood vessel. Either in collagen or in muscles, blood vessels did not repatriate many leukocytes. In subgroup 4 (ASA beads, entrapped HepG2 cells), the mast cells were still mainly situated close to the vessels and not deep into the collagen or connective tissue (Fig. 6). These observations about the ASA beads implanted into rats highlight that they

are more appropriate than AS beads for animal cell encapsulation and thus are prime candidates in the development of an artificial organ based on silica materials.

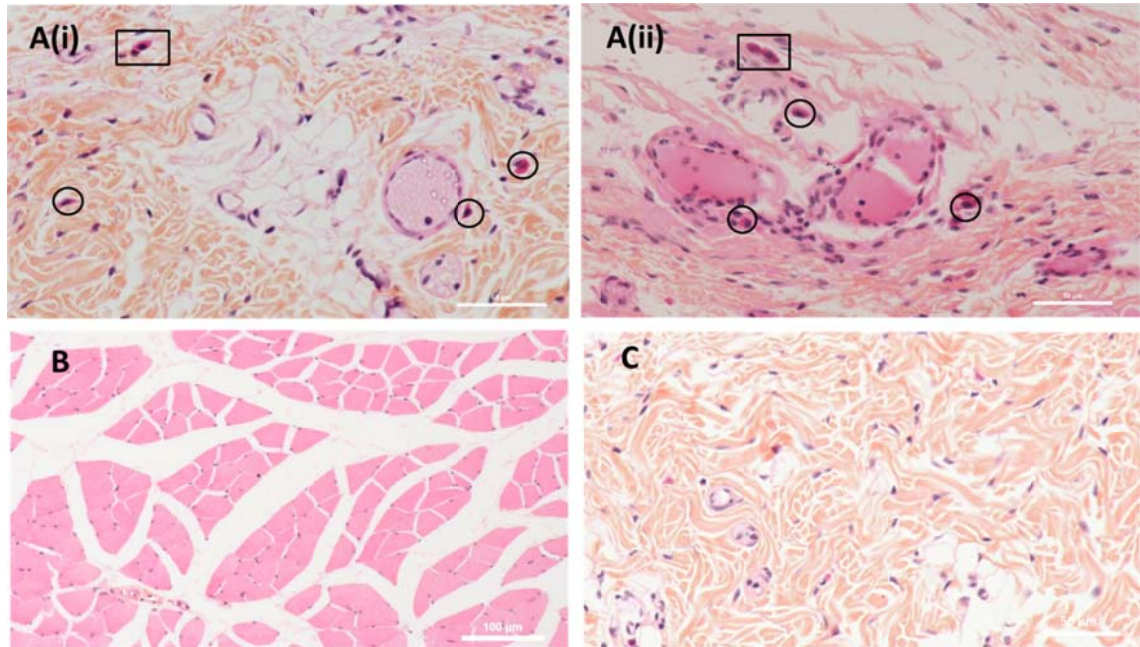


Fig. 6. Histological sections of blood vessel (A), muscle (B) and collagen (C) of Wistar rats from subgroup 4: four ASA beads with HepG2 implanted in their dorsal midline during one month. Mast cells are identified by circles and PML by squares.

Behaviour assessments and histological observations of the tissues of rats used in these *in vivo* experiments suggest that the ASA beads appeared to be more biocompatible than AS beads. Furthermore, ASA beads were still intact one month post-implantation, as shown by the SEM micrographs from subgroup 4 (Fig. 7). The furrow-like external shape of the ASA bead seemed to be lost. As the connective tissue encircled the beads very well, the external crust of the beads was probably took off during the preparation of these samples. The second hypothesis is that in the body fluids, monovalent ions could erode the alginate crust to get this final smooth surface. A cross-section of ASA beads (Figs 7b-d) reveals the presence of many holes that were initially filled with HepG2 cells which were pulled out during the drying process prior observations. The well-defined difference of morphology between the outer layer and the inside part

demonstrate that the alginate crust was preserved *in vivo* (Fig 7d). In the case of AS beads, no electron microscope micrographs could be obtained as the connective tissue around them was too tightened to isolate the beads alone during preparation for observation.

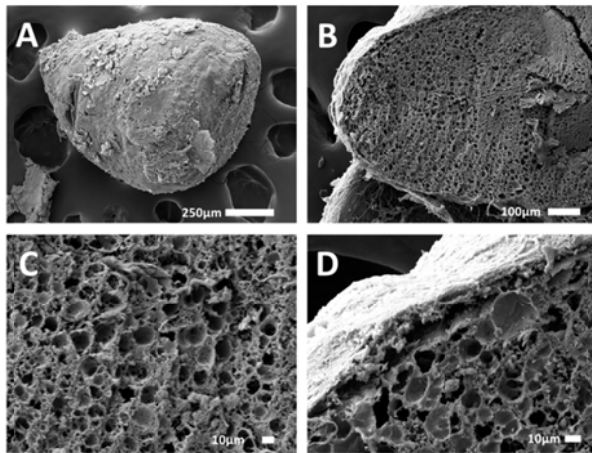


Fig. 7. SEM micrographs from subgroup 4 (ASA bead, with encapsulated HepG2 cells) one-month post-implantation *in vivo*.

CONCLUSIONS

The aim of this work was to carry out *in vivo* tests on new hybrid materials to evaluate their biocompatibility when they are implanted within living organisms. In order to reach this goal, two kinds of sol-gel synthesised materials enclosing living HepG2 cells were prepared: alginate-silica beads (AS) and alginate/silica hybrid subsequently covered by an external layer of pure alginate (ASA). Consequently, AS beads are essentially distinguishable from ASA beads by their surface chemistry. The results show that the mineralised ASA beads covered by an external alginate crust are promising hybrid materials since fewer animals displayed localised inflammatory, compared to conventional alginate-silica composites (AS beads). As integrity of ASA beads was preserved during this *in vivo* study, we are very optimistic about their efficiency for further clinical applications.

ACKNOWLEDGMENTS

Philippe Dandoy and Christophe Meunier are both grateful for financial support from the Belgian FNRS (Fonds de la Recherche Scientifique – FNRS) for the F.R.I.A. and the Postdoctoral Researcher position respectively. The authors also thank Isabelle Habsch, Virginie Voisin, Lucie Burette and Vanessa Colombaro from the URPhyM laboratory for their help and relevant advices in animals' welfare. Finally, Daniel Van Vlaender from LabCeTi is deeply acknowledged for his eye and skills in histology.

REFERENCES

- [1] Léonard A, Dandoy P, Danloy E, Leroux G, Meunier CF, Rooke J, Su BL. Whole-cell based hybrid materials for green energy production, environmental remediation and smart cell-therapy. *Chem Soc Rev* 2011;40(2):860-885.
- [2] Carturan G, Campostrini R, Dirè S, Scardi V, De Alteriis E. Inorganic gels for immobilization of biocatalysts: inclusion of invertase-active whole cells of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) into thin layers of SiO₂ gel deposited on glass sheets. *J Mol Catal* 1989;57(1):13-16.
- [3] Desimone MF, Degrossi J, D'Aquino M, Diaz LE. Sol-gel immobilisation of *Saccharomyces cerevisiae* enhances viability in organic media. *Biotech Lett* 2003;25(9):671-674.
- [4] Nassif N, Bouvet OMM, Rager MN, Roux C, Coradin T, Livage J. Living bacteria in silica gels. *Nat Mater* 2002;1:42-44.
- [5] Carnes EC, Lopez DM, Donegan NP, Cheung A, Gresham H, Timmins GS, Brinker CJ. Confinement-induced quorum sensing of individual *Staphylococcus aureus* bacteria. *Nat Chem Biol* 2009;6:41-45.
- [6] Meunier CF, Rooke J, Hajdu K, Van Cutsem P, Cambier P, Léonard A, Su BL. Insight into cellular response of plant cells confined within silica-based matrices. *Langmuir* 2010;26(9):6568-6575.
- [7] Perullini M, Rivero MM, Jobbágy M, Mentaberry A, Bilmes SA. Plant cell proliferation inside an inorganic host. *J Biotechnol* 2007 ;127(3):542-548.
- [8] Pressi G, Dal Toso R, Dal Monte R, Carturan R. Production of enzymes by plant cells immobilized by sol-gel silica. *J Sol-Gel Sci Technol* 2003;26(1-3):1189-1193.
- [9] Pope EJA, Braun K, Peterson CM. Bioartificial Organs. 1. Silica Gel Encapsulated Pancreatic Islets for the Treatment of Diabetes Mellitus. *J Sol-Gel Sci Technol* 1997;8(1-3):635-639.

- [10] Carturan G, Dal Toso R, Boninsegna S, Dal Monte R. Encapsulation of functional cells by sol-gel silica : actual progress and perspectives for cell therapy. *J Mater Chem* 2004;14(14):2087-2098.
- [11] CF Meunier, P Dandoy, BL Su. Encapsulation of cells within silica matrixes: Towards a new advance in the conception of living hybrid materials. *J Coll Sci Interf* 2009;342(2):211-224.
- [12] Langer R, Vacanti J. Tissue engineering. *Science* 1993;260(5110):920-926.
- [13] Morris PJ. Immunoprotection of therapeutic cell transplants by encapsulation. *Trends Biotechnol* 1996;14(5):163-167.
- [14] Desai TA, Hansford D, Ferrari M. Characterization of micromachined silicon membranes for immunoisolation and bioseparation applications. *J Membr Sci* 1999;159(1-2):221-231.
- [15] Carturan G, Dal Toso R, Boninsegna S, Dal Monte R. Encapsulation of functional cells by sol–gel silica: actual progress and perspectives for cell therapy. *J Mater Chem* 2004;14(14):2087-2098.
- [16] Bartkowiak A, Canaple L, Ceausoglu I, Nurdin N, Renken A, Rindisbacher L et al. New Multicomponent Capsules for Immunoisolation. *Ann NY Acad Sci* 1999;875(1):135-145.
- [17] Arcangeli G, Cupelli V, Giuliano G. Effects of silica on human lung fibroblast in culture. *Sci Total Environ* 2001;270(1-3):135-139.
- [18] Di Pasqua A, Sharma KK, Shi YL, Toms BB, Ouellette W, Dabrowiak JC et al. Cytotoxicity of mesoporous silica nanomaterials. *J Inorg Biochem* 2008;102(7):1416-1423.
- [19] Orive G, Gascón AR, Hernández RM, Igartua M, Pedraz JM. Cell microencapsulation technology for biomedical purposes: novel insights and challenges. *Trends Pharmacol Sci* (2003);24(5):207-210.
- [20] Perullini M, Jobbagy M, Bermudez Moretti M, Correa Garcia S, Bilmes SA. Optimizing silica encapsulation of living cells: in situ evaluation of cellular stress. *Chem Mater* 2008;20(9):3015-3021.
- [21] Boninsegna S, Dal Toso R, Dal Monte R, Carturan G. Alginate microspheres loaded with animal cells and coated by a siliceous layer. *J Sol-Gel Sci Technol* 2003;26(1-3):1151-1157.
- [22] Carturan G, Dellagiacoma G, Rossi M, Dal Monte R, Muraca M. Encapsulation of viable animal cells for hybrid bioartificial organs by the Biosil method. *Proc of SPIE* 1997;3136:366-373.
- [23] Sakai S, Ono T, Ijima H, Kawakami K. Synthesis and transport characterization of alginate/aminopropyl-silicate/alginate microcapsule: application to bioartificial pancreas. *Biomaterials* 2001;22(21):2827-2834.

- [24] Sakai S, Ono T, Ijima H, Kawakami K. Alginate/aminopropyl-silicate/alginate membrane immunoisolation and insulin secretion of encapsulated islets. *Biotechnol Prog* 2002;18(2):401-403.
- [25] Sakai S, Kawabata K, Ono T, Ijima H, Kawakami K. Development of mammalian cell-enclosing subsieve-size agarose capsules (<100 μm) for cell therapy. *Biomaterials* 2005;26(23):4786-4792.
- [26] Bass JD, Grosso D, Boissière C, Belamie E, Coradin T, Sanchez C. Stability of mesoporous oxide and mixed metal oxide materials under biologically relevant conditions. *Chem Mater* 2007;19,4349-4356.
- [27] Nieto A, Areva S, Wilson T, Viitala R, Vallet-Regi M. Cell viability in a wet silica gel. *Acta Biomater* 2009;5(9):3478-3487.
- [28] Dandoy P, Meunier CF, Michiels C, Su BL. Animal cells within biocompatible hybrid beads: towards the design of “artificial organs”. Submitted to PLoS One.
- [29] Coradin T, Livage J. Synthesis and characterization of alginate/silica biocomposites. *J Sol-Gel Sci Tech* 2003;26(1-3):1165-1168.
- [30] de Vos P, De Haan BJ, Wolters GHJ, Strubbe JH, Van Schilfgaarde R. Improved biocompatibility but limited graft survival after purification of alginate for microencapsulation of pancreatic islets. *Diabetologia* 1997;40(3):262-270.

Chapitre 6.

Conclusions générales & perspectives

*« Life is the art of drawing sufficient conclusions from
insufficient premises. »*

Samuel Butler, écrivain, 1912.

Conclusions générales

Cette thèse de doctorat a porté sur la conception d'une matrice inorganique adaptée à l'immobilisation de cellules animales dans le cadre de la thérapie cellulaire. Les progrès réalisés dans ce contexte devraient permettre d'étudier les potentialités d'en faire un organe artificiel pour des maladies non-infectieuses comme le diabète de type 1 par exemple. Le rôle de cette matrice est d'enfermer les cellules dans un réseau qui doit impérativement être poreux, biocompatible et robuste ; chacun de ces paramètres devant rencontrer plusieurs attentes :

- La porosité de la matrice doit être contrôlée pour se trouver dans une fenêtre bien précise du diamètre de ses canaux. En effet, plus les pores sont larges, meilleure sera la diffusion des nutriments et des métabolites. Mais leur taille ne doit pas permettre l'entrée des molécules du système immunitaire sous peine de détruire les cellules hébergées dans le matériau une fois implanté dans un corps.
- La biocompatibilité signifie que les cellules immobilisées doivent être insensibles aux matériaux qui constituent la matrice dans un premier temps. Les conditions de synthèse doivent être totalement inoffensives pour ces cellules, mais leur contention à long terme au sein du réseau également. Dans un second temps, l'organisme-hôte qui accueillera l'implant devra également être indifférent à sa présence. Cette indifférence se caractérise de deux façons distinctes : la composition et la forme de la matrice ne doivent pas affecter le corps, ensuite l'immuno-isolation des cellules immobilisées doit satisfaire aux critères déjà énoncés pour la porosité.
- Enfin, la résistance de la matrice va grandement intervenir sur son efficacité à long terme. Il ne faut pas que le matériau puisse être dissout par les fluides corporels ou que sa morphologie change avec le temps sous peine de ne plus assurer ses propriétés.

Un matériau avec une immuno-isolation parfaite mais affectant les tissus qui l'entourent sera forcément rejeté par l'organisme. Au cours de ce processus, le corps se défendra de façon à isoler ces tissus de leur agresseur et ce matériau imaginé comme idéal se retrouvera enfermé dans du tissu fibreux (fibrose).

En premier lieu, nous nous sommes concentrés à établir les paramètres de base pour la conception d'un matériau biocompatible. Au cours de la formation du sol, certains produits peuvent se montrer très rapidement néfastes pour les cellules. La toxicité étant intrinsèquement liée à la concentration du composé, en-dessous de laquelle elle n'est pas encore révélée, nous avons d'abord travaillé à déterminer les potentialités de précurseurs de silice commerciaux. Devant leur inefficacité, nous avons synthétisé des précurseurs de silice dont le produit secondaire ne conduisait pas à la mort des cellules. Malgré la réussite de leur synthèse, les gels de silice qui en résultaient n'étaient pas adéquats pour l'immobilisation de cellules. De même pour les gels de silice obtenus en poursuivant la voie aqueuse où il n'y avait aucun alcool relargué au cours de la formation du sol. Le problème récurrent de ces gels étant imputé au temps de gel qui est prolongé et à la nécessité d'éviter les variations brutales de l'environnement direct des cellules.

Face à ces constatations, nous nous sommes alors portés vers l'alginate comme système de pré-encapsulation. En effet, la viabilité des cellules immobilisées dans des capsules d'alginate fut grandement améliorée. Cependant, ces capsules de biopolymères ont la fâcheuse propriété de gonfler avec le temps. Les ions calciums complexés dans les chaînes qui la forment et la rendent solide, s'en échappent avec le temps et fragilisent la structure. Pour cette raison, une union de l'alginate et de la silice s'est tout naturellement présentée. Si l'immobilisation de capsules d'alginate dans un bloc de silice n'est pas envisageable, c'est bien la minéralisation de la capsule d'alginate par de la silice qui a apporté les résultats les plus encourageants. En effet, l'idée de développer une microencapsulation apporta beaucoup plus de succès. L'intrusion de la silice dans la capsule d'alginate et sa gélification ont considérablement contribué à la robustesse de la matrice. Ce matériau hybride alors recouvert d'une fine couche d'alginate concentré a réellement porté cette bille minéralisée vers une très bonne biocompatibilité. En effet, les conditions de synthèse et la proportion des deux précurseurs ont produit une matrice dont la taille de pore respecte les critères d'immuno-isolation les plus souvent cités dans la littérature et l'étude *in vivo* tend à suggérer que la bille alginate-silice/alginate (ASA) n'est pas source de désagrément envers l'organisme.

Parmi les expériences réalisées *in vitro*, l'albumine sécrétée par les cellules HepG2 a bien été détectée dans le surnageant des billes pendant plusieurs semaines, preuve que les échanges vers l'extérieur s'opèrent sans difficulté. Ensuite, la taille des canaux qui forment leur réseau fut déterminée avec davantage de précision par l'emploi de molécules fluorescentes calibrées (dextran-FITC). Les plus petites diffusaient sans encombre à travers les billes, mais au-delà de 30 nm, aucune ne traversait. En parallèle, les mesures par oxymétrie de la respiration cellulaire ont corroboré les résultats obtenus par le dosage de l'albumine prouvant la viabilité pendant 50 jours.

De telles améliorations ont conduit à éprouver la biocompatibilité de la bille ASA en l'implantant dans un rat de laboratoire. En effet, d'autres tests *in vitro*, mettant en évidence la réponse proinflammatoire de l'alginate et de la silice ont montré leur innocuité sur les cellules HepG2 mais également envers la non-activation de défenseurs immunitaires couramment utilisés en laboratoire, les monocytes THP-1. Confrontée à une bille obtenue par co-gélification de l'alginate et la silice (bille AS), la bille ASA obtint des meilleures performances d'après les analyses comportementales des animaux ainsi que suite aux interprétations des coupes histologiques des 23 rats utilisés pour cette expérience.

La bille minéralisée alginate-silice/alginate a permis de faire un grand pas en avant dans la synthèse d'organe artificiel puisqu'elle autorise la survie des cellules immobilisées, les échanges des nutriments et des métabolites avec l'extérieur, et suggère une immuno-isolation des entités immobilisées d'après les tests de diffusion et l'étude *in vivo*.

Perspectives

Les perspectives de ces travaux peuvent se décliner en deux plans principaux traitant de la biologie et de la chimie.

Le premier plan est très certainement l'application de ce protocole de synthèse aux cellules β . Pour cela, il est nécessaire de répéter les opérations pour caractériser la viabilité des cellules HepG2 sur un laps de temps de plusieurs mois dans les matériaux et pour étudier les modifications texturales de la matrice. Ensuite, viendra le temps d'appliquer les modes opératoires aux cellules β . En effet, les objectifs à long terme sont bien de concevoir un organe artificiel où le diabète de type 1 représente la première maladie à pouvoir être traitée par cette nouvelle technologie. Si elle rencontre autant de succès qu'au cours de cette thèse, cette méthode pourra également s'ouvrir à l'immobilisation de cellules-souches, domaine où énormément de recherches sont entreprises pour contrôler leur différenciation notamment¹, puisque c'est au cours de cette étape de leur maturation que les cellules développent les marqueurs de l'immunité. L'alliance de ces travaux pourrait conduire à élargir l'arsenal thérapeutique des médecins pour amener de nouveaux traitements auxquels leur imagination n'a pas encore osé penser.

Le second plan s'attarderait sur la composition des matériaux. Comme une immobilisation étendue sur une année n'a pas pu être effectuée, il y a lieu de s'informer de la préservation des propriétés de la bille minéralisée à très long terme, si les résultats obtenus avec la bille minéralisée développée dans ce manuscrit ne montraient pas une robustesse suffisante après un tel laps de temps. Quelques publications font actuellement l'état de recherches sur d'autres matériaux. Les alternatives envisageables concerneraient des matériaux comme le dioxyde titane ou l'alumine^{2,3}. Le nombre d'articles les concernant n'est pas aussi abondant que ceux relatifs à la silice et un plus grand nombre de travaux

¹ http://reflexions.ulg.ac.be/cms/c_27268/un-drole-de-zebre-pour-lutter-contre-le-diabete, consulté le 18 mars 2011.

² K.E. La Flamme, G. Mor, D. Gong, T. La Tempa, V.A. Fusaro, C.A. Grimes, T.A. Desai (2005), *Diabetes Technol. Ther.* 7, 684-694.

³ M. Amoura, N. Nassif, C. Roux, J. Livage, T. Coradin (2007), *Chem. Commun.* 39, 4015-4017.

doivent être poursuivis pour mieux juger de leur pertinence en tant qu'organe artificiel. Néanmoins, ils méritent de s'y attarder pour explorer les possibilités qu'ils peuvent offrir. Par exemple, la liaison Ti-O du dioxyde de titane est plus solide (600 kJ/mol) que la liaison siloxane (450 kJ/mol), si l'on parvient à contrôler l'hydrolyse de précurseurs de titane, le matériau obtenu devrait être plus résistant a priori. C'est en poursuivant les recherches dans ce sens, de façon acharnée qu'un réel soulagement pourra être apporté aux patients souffrant de maladies non-infectieuses telles que le diabète de type 1.

Annexes.

- A. Les matériaux sol-gel**
- B. L'adsorption-désorption d'azote (BET)**
- C. La microscopie électronique à balayage (MEB)**
- D. L'oxymètre**
- E. La chambre de Neubauer**
- F. Le dosage de la LDH**

« I never did anything worth doing by accident, nor did any of my inventions come by accident; they came by work. »

Thomas Alva Edison, ingénieur, 1889.

Annexe A

Les matériaux sol-gel¹

Le premier matériau obtenu par voie sol-gel fut préparé par Ebelmen en 1845. Il constata la gelification inattendue d'une de ses solutions selon les termes suivants : *sous l'action d'une atmosphère humide, un éther silicique se transformait en une masse solide transparente qui n'était autre que de la silice comparable au cristal de roche le plus limpide* »². Il était bien loin d'imaginer la portée de sa découverte mais promettait déjà un grand avenir aux matériaux obtenus via ce type de synthèse en déclarant : « *Il est permis d'espérer que cet hydrate de silice pourra être utilisé dans la construction des instruments d'optique* ». Fin des années 30, Geffcken montre les potentialités de ces réactions en préparant des films d'oxydes³. De nombreuses recherches ont été poursuivies par la suite pour comprendre ces gels d'alkoxydes, contrôler leurs caractéristiques et établir la théorie de leur formation.

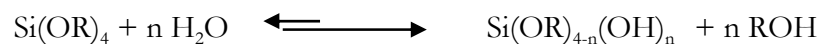
Basé sur la polymérisation d'une dispersion colloïdale de précurseurs inorganiques (le sol), le procédé sol-gel permet l'obtention de matériaux dans des conditions qui sont dites « douces » puisque les réactions ont lieu à température et pression ambiantes. Le sol est obtenu au bout de deux étapes chimiques conjointes : l'hydrolyse et la condensation. Les équations ci-dessous reprennent l'exemple typique des oxydes de silicium déjà reporté *supra* dans cet ouvrage.

¹ J.D. Wright, N.A.J.M. Sommerdijk (2001), *Sol-Gel Materials : Chemistry and Applications*

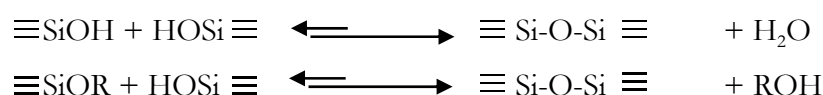
² J.J. Ebelmann (1845), *C. R. Acad. Sci.* 21, 502.

³ W. Geffcken, E. Berger (1939), Deutsches Reichspatent 736411 pour Jenaer Glaswerk Schott & Gen.

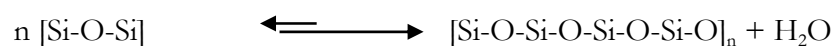
Au cours de l'hydrolyse, le groupe alkoxyde ($-OR$) est remplacé par des groupes hydroxyles suite à l'attaque nucléophile de l'oxygène de l'eau sur le silicium :



La condensation des groupements silanols formés conduit aux liaisons siloxanes $Si-O-Si$, avec élimination d'eau et d'alcool. Ce mécanisme implique l'attaque nucléophile d'un silanol déprotonné sur l'espèce silicatée. Lorsque le nombre de ponts siloxanes augmente, les molécules sont liées en particules primaires qui ont un diamètre de l'ordre de 2 nm, qui s'agglomèrent en particules secondaires d'une taille de 6 nm :



S'ensuit la polycondensation où les clusters commencent à croître dans le sol par condensation des unités polymériques et agrégation des particules. A mesure que la taille des clusters augmente, la probabilité qu'ils entrent en collision grandit. Ils vont alors pouvoir se lier et de former des agrégats de plus en plus grands. Le processus continue jusqu'à la formation d'un seul cluster géant, qui détermine le « temps de gel ».



Ces phénomènes se poursuivent au cours du temps pendant lequel une troisième étape, dite de vieillissement, prend lieu. La polycondensation continue amenant un phénomène de rétraction du réseau et d'expulsion du solvant consécutifs au phénomène de cross-linking engendré par les groupements silanols à la surface des canaux du gel.

Le matériau inorganique final est caractérisé par un réseau qui dépend des conditions de préparation et du post-traitement réalisé sur le gel (Figure A.1). En fonction du post-traitement que le gel subit (temps de vieillissement, séchage, densification), la taille de ces pores change. Ce phénomène est principalement dû à la méthode exploitée pour sécher le matériau. Typiquement pour un séchage de quelques jours, à température ambiante, des pores de quelques dizaines de nanomètres sont obtenus. Après être séché, une étape de densification peut être utilisée pour la production de verres et de céramiques. Il s'agit alors

de chauffer à température très élevée des intermédiaires du procédé sol-gel jusqu'à provoquer l'effondrement total du système poreux de manière à obtenir des matériaux très denses.

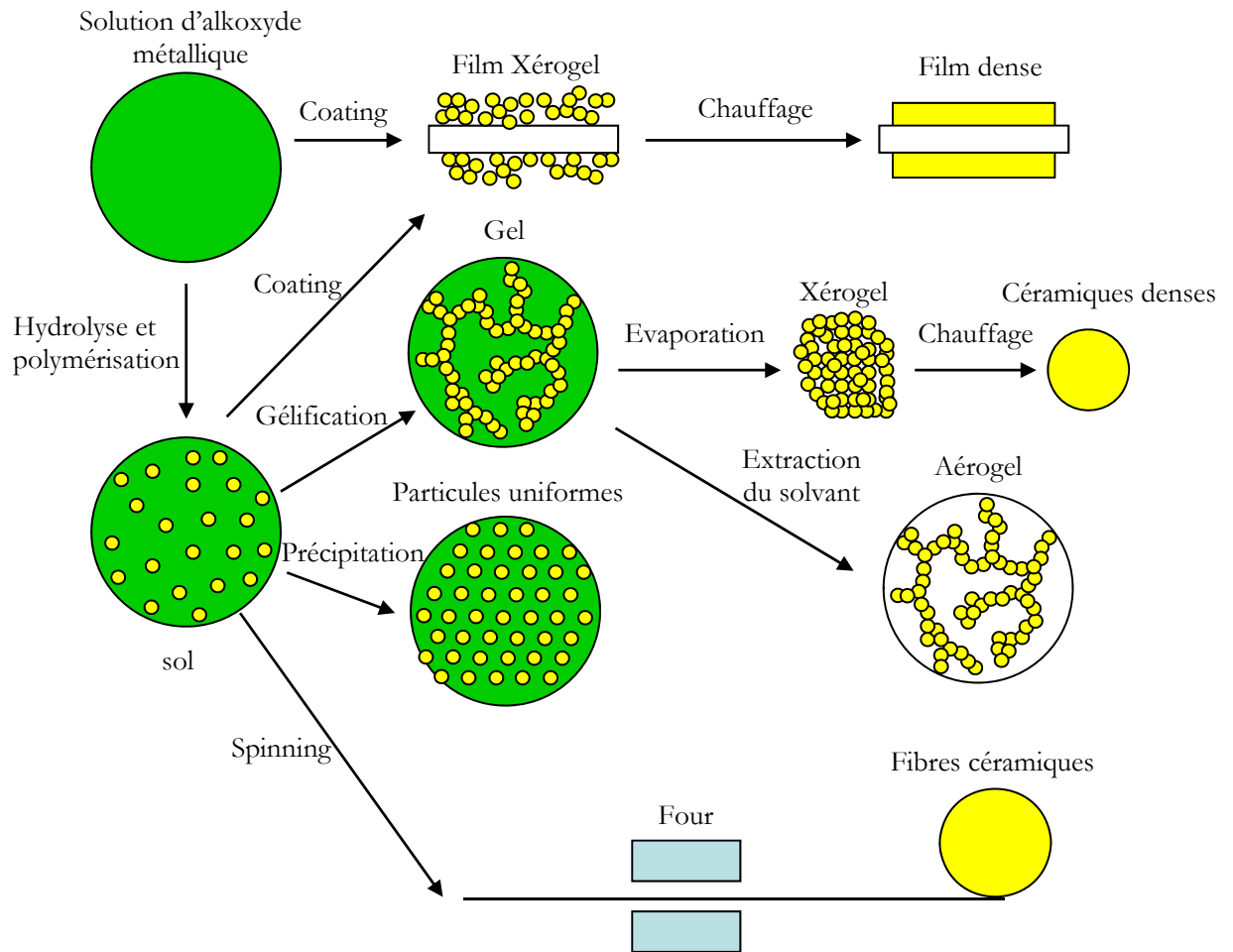


Figure A.1 : Schéma résumant le procédé sol-gel et les différents produits qui en découlent.

Annexe B

L'adsorption-désorption d'azote (BET)¹

L'adsorption-désorption d'azote est une technique d'analyse des matériaux rendant compte de leurs diverses propriétés texturales :

- la surface spécifique ;
- le volume poreux ;
- le diamètre et la forme de ses pores, ainsi que leur distribution.

Cette technique s'est développée grâce aux travaux de trois scientifiques (Brunauer, Emmet et Teller : BET) qui se sont basés sur les hypothèses de l'adsorption physique qu'avaient posées Langmuir avant eux :

- ✓ l'adsorption est le résultat d'un équilibre adsorption-désorption ;
- ✓ l'adsorption forme toujours une monocouche ;
- ✓ la surface est homogène et tous les sites sont équivalents, ils ont tous la même énergie ;
- ✓ l'adsorption d'une molécule est indépendante de l'occupation des sites voisins, il n'y a pas d'influence réciproque des particules absorbées.

¹ S. Brunauer, P. Emmet, E. Teller (1938), *J. Am. Chem. Soc.* 60, 309-319.

Cela signifie que si nous connaissons la surface occupée par 1 molécule d'adsorbat (l'azote dans notre cas), il est possible de connaître la surface spécifique du matériau :

- la vitesse d'adsorption est proportionnelle à la surface libre $(1 - \theta)$ et à la pression (P).
- la vitesse de désorption est proportionnelle à la surface couverte (θ).

$$\Rightarrow \text{à l'équilibre ces 2 vitesses sont égales : } \underbrace{k_1 \cdot (1 - \theta) \cdot P}_{\text{ion}} = \underbrace{k_{-1} \cdot \theta}_{\text{ésorption}} \quad (1)$$

$$\boxed{\text{ion}} = \boxed{\text{ésorption}}$$

où k_1 et k_{-1} sont des constantes selon lesquelles $a = \frac{k_1}{k_{-1}}$ est la constante d'équilibre d'adsorption-désorption ; et

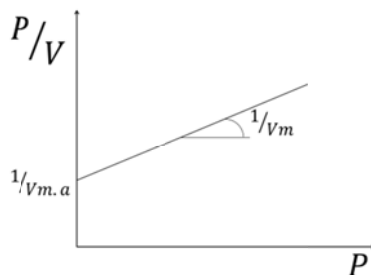
θ est le taux de recouvrement de la surface.

Or, le taux de recouvrement θ est égal au rapport entre le volume adsorbé (V) et le volume de la monocouche (V_m) : $\theta = \frac{V}{V_m}$ (2)

$$\text{Par (1), } \theta \text{ est isolé et } \theta = \frac{aP}{aP+1} \quad (3)$$

$$\text{Comme (2) = (3) : } \frac{P}{V} = \frac{1}{V_m \cdot a} + \frac{P}{V_m} \quad (4)$$

Cette équation (4) est l'équation d'une droite $y = B + A \cdot x$ reprise dans le graphe ci-dessous :



Ce graphe permet alors de connaître la surface spécifique du matériau selon :

$$S = Am \cdot N \cdot \frac{V_m}{24790} \quad (5)$$

où S est la surface spécifique (m^2/g) ;

Am est la surface de section de la molécule d'adsorbat, ici l'azote : $16,2 \cdot 10^{-20} \text{m}^2$ à 77°K ;

N est le nombre d'Avogadro ($6,6023 \cdot 10^{23} \text{mol}^{-1}$) ;

V_m est le nombre de molécules d'azote adsorbées ;

24790 est le volume molaire du gaz dans les conditions STP (cm^3/mol).

A ces considérations, B.E.T. rajoutent :

- ✓ L'adsorption est multicouche (par forces de Van der Waals) et la chaleur d'adsorption des couches suivantes est différentes de celle de la monocouche ;
- ✓ Cette chaleur d'adsorption est égale à la chaleur de condensation du gaz.

Il en résulte :

$$\frac{P/P_0}{V \cdot (1 - P/P_0)} = \frac{1}{V_m \cdot C} + \frac{C - 1}{V_m \cdot C} \cdot \frac{P}{P_0} \quad (6)$$

Ce qui est l'équation d'une droite : $y = B + A \cdot x$

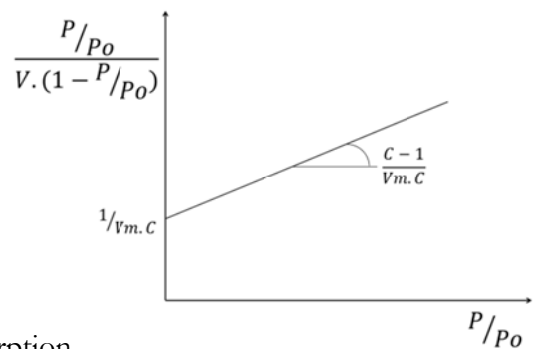
où P est la pression à l'équilibre ;

P_0 est la pression de saturation du gaz à une pression donnée ;

V est le volume de gaz adsorbé à la pression d'équilibre ;

V_m est le volume de la monocouche ;

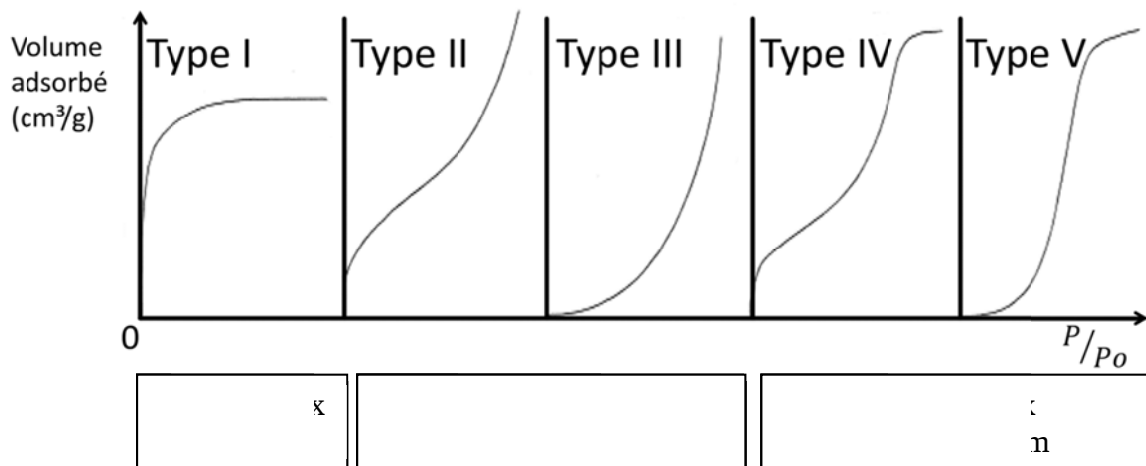
C est une constante relative à la chaleur d'adsorption.



L'équation (6) permet de connaître V_m selon : $V_m = \frac{1}{A+B}$ ce qui nous donne la surface spécifique S_{BET} de l'équation (5).

Cependant, ce modèle théorique se limite à des pressions relatives (P/P_0) comprises entre 0,05 et 0,35 pour le calcul de la surface spécifique parce qu'il ne tient compte ni de l'hétérogénéité de la surface (qui se manifeste aux faibles pressions), ni des interactions entre molécules (ayant cours aux fortes pressions). En-dessous de 0,05, la formation de la monocouche est difficile et il n'y a pas d'équilibre adsorption-désorption ; au-dessus de 0,35, il y a un risque de former une multicouche.

Une analyse par adsorption-désorption se réalise à température constante, c'est pourquoi on parle communément d'une courbe isotherme pour caractériser le matériau étudié. Une isotherme est la quantité d'adsorbat (volume adsorbé) retenue par le matériau (l'adsorbant) en fonction de la pression relative à température constante. Il existe 5 types d'isotherme classés selon l'IUPAC. L'allure de l'isotherme donne une indication directe sur la force d'interaction entre l'adsorbat et l'adsorbant et donc de sa porosité.



La différence entre les types II et III et entre les types IV et V n'est présente qu'aux faibles pressions relatives. Elle provient des interactions différentes existant entre les molécules de gaz adsorbées à la surface du matériau : à faible pression relative, lorsque la courbure est concave (chez le type III et V), la chaleur d'adsorption est supérieure à celle de désorption. Les interactions entre molécules d'adsorbat sont plus fortes que celles entre les molécules d'adsorbat et d'adsorbant. Il existe un Type VI, non représenté ici, qui est une combinaison de plusieurs isothermes.

Dans les canaux de ces matériaux, extrêmement étroits, il peut se produire le phénomène de condensation capillaire. Comme le ménisque du liquide remplissant ces canaux est concave, la pression de vapeur P au-dessus de lui est inférieure à la pression de saturation P_0 pour une même température sur une surface plane. Cela peut alors engendrer une condensation de la vapeur dans les pores. En effet, ce phénomène est très marqué pour les isothermes de type IV, caractéristique des mésoporeux et son expression mathématique fut avancée par Kelvin :

$$\ln \frac{P}{P_0} = - \frac{2\gamma V_m}{RT(rp-t)} \quad (7)$$

où γ est la tension superficielle à la température T ;

rp est le rayon du pore ; et

t est l'épaisseur d'une couche adsorbée à la paroi des pores avant la condensation capillaire : $t = 0,43 \left(\frac{5}{\ln(P/P_0)} \right)^{1/3}$

Connaissant la pression relative à laquelle la condensation capillaire a lieu, l'équation (7) permet de calculer le rayon des pores du matériau.

En conclusion, grâce à l'équation de BET (6) nous avons une relation entre V et P/P_0 , et en la combinant avec l'équation de Kelvin (7), nous avons une relation entre V et le rayon du pore (r_p).

Annexe C

La microscopie électronique à balayage (MEB)

Pour observer un objet, et pouvoir le discriminer des autres en y distinguant sa forme et ses limites, il convient de posséder un pouvoir de résolution suffisant. La résolution d'un microscope étant dépendante de la longueur d'onde qui parcourt son système (1), le microscope optique se retrouve limité quand il s'agit d'observer des objets d'une taille inférieure à 300 nm. En conséquence, de manière à pouvoir observer des objets plus petits, il est impératif d'utiliser un rayonnement de longueur d'onde plus faible. Au lieu d'utiliser des photons ($\lambda = 400$ à 800 nm), le microscope électronique emploie des électrons ($\lambda = 10^{-3}$ nm).

$$R = \frac{0,61 \lambda}{n \sin u} \quad (1)$$

où λ est la longueur d'onde,

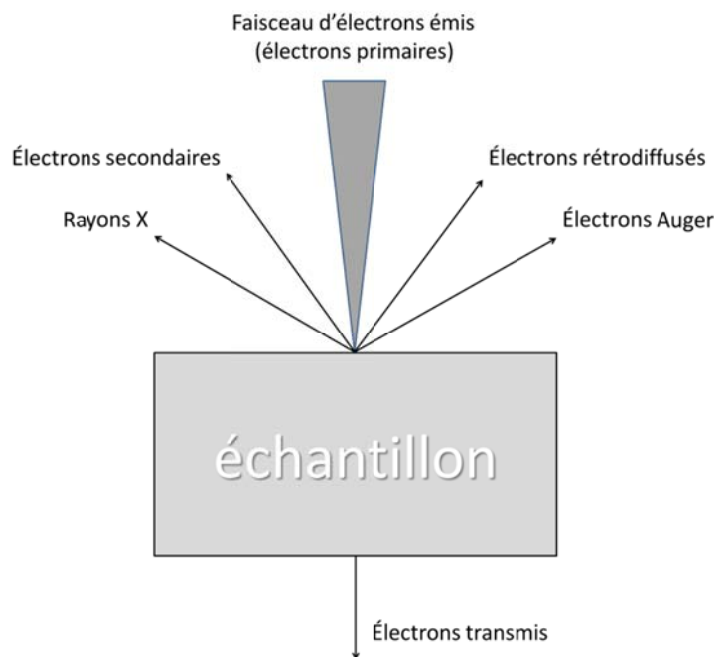
n est l'indice de réfraction du milieu¹ et

u l'ouverture du faisceau.

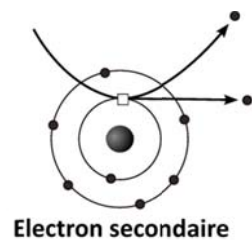
Le microscope électronique à balayage est composé d'un filament de tungstène (la cathode) qui est parcouru par un courant (allant jusqu'à 30 kV) afin de le faire chauffer et produire les électrons. Le filament se trouvant dans un cylindre percé (le Wehnelt), les électrons émis vont être dirigés vers l'anode située en dessous de trou du Wehnelt.

¹ Indice de réfraction dans le vide ($n = 1$), dans l'air ($n = 1,003$), dans l'eau ($n = 1,33$), dans le verre ($n = 1,5$ à $1,7$)

Elle-même percée, un faisceau d'électrons la traverse pour descendre vers l'échantillon. Au cours de sa descente, il est limité par des diaphragmes et focalisé sur l'échantillon à l'aide de lentilles électromagnétiques. Comme son nom l'indique, le MEB balaie la surface de l'échantillon point par point grâce à des bobines de déflexion en x et en y. A chaque impact du flux d'électrons sur l'échantillon, d'autres électrons venant de l'échantillon recouvert d'or sont réémis. Ces derniers sont détectés et transmis à un écran cathodique synchronisé avec le déplacement faisceau permettant de reconstruire l'image. Parmi la somme d'électrons réémis (et détaillés ci-après), seuls les électrons secondaires sont d'intérêt et détectés.

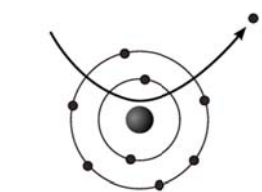


Les électrons secondaires : Il s'agit d'électrons arrachés par l'ionisation causée par le faisceau. Leur énergie est faible (< 50 eV) et ils proviennent de la bande de conduction où ils étaient peu liés. Ils viennent de la surface de l'échantillon (< 5 nm) et informent sur la topographie de l'échantillon.



Electron secondaire

Les électrons rétrodiffusés : Les électrons au voisinage d'un atome subissent une forte attraction et sont réémis avec une énergie identique (collision élastique). L'angle formé entre les électrons



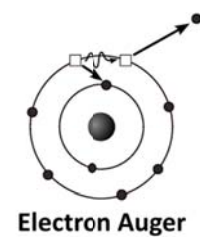
Electron rétrodiffusé

incidents et rétrodiffusés est proche de 180° . Comme ces derniers proviennent de plus loin (> 5 nm de la surface) la résolution topographique est moins bonne, raison pour laquelle ils ne sont pas privilégiés.

L'émission de rayons X : L'impact des électrons primaires ionise les autres. La désexcitation se produit avec émission de rayons X. L'analyse de ces rayons permet d'obtenir des informations sur la nature chimique de l'échantillon (EDX : Energy Dispersive X-ray).



Les électrons Auger : Lorsqu'un atome excité se désexcite, un électron périphérique descend et vient occuper la place laissée vide. Cette transition provoque l'éjection d'un électron périphérique et va renseigner sur la composition chimique de l'échantillon et sur le type de liaison.



Les électrons transmis : Ce sont des électrons venant du faisceau d'électrons incidents possédant une énergie suffisante pour traverser l'échantillon.

Les électrons secondaires étant les particules d'intérêt pour cette technique, les échantillons ont toujours été recouverts d'une fine pellicule d'or (20 à 30 nm) pour augmenter le nombre d'électrons secondaires émis ainsi que pour améliorer la conduction entre l'échantillon et la pastille sur laquelle il est posé et éviter une accumulation de charges de manière à obtenir une meilleure résolution. Ce procédé est appelé la métallisation : par production d'une décharge électrique qui va ioniser les atomes d'argon, ceux-ci vont être accélérés vers une cathode en or et la frapper suivant ce qu'on appelle une pulvérisation cathodique. L'impact va provoquer l'éjection d'atomes d'or, notamment sur l'échantillon.

Annexe D

L'oxymètre

La cellule de Clark, ou *capteur à oxygène de Clark*, est un oxymètre. Il permet de déterminer la concentration en oxygène d'une solution par mesure du courant électrique en appliquant une tension qui favorise la polarisation de l'électrode de travail.

Son fonctionnement se fonde sur une voltampérométrie hydrodynamique : le potentiel est fixé et la mesure du courant électrique dans la solution donne la concentration en oxygène. L'oxymètre utilisé au cours de cette recherche est un Oxy-Lab de chez Hansatech dont le fonctionnement est schématisé à la figure D.1.

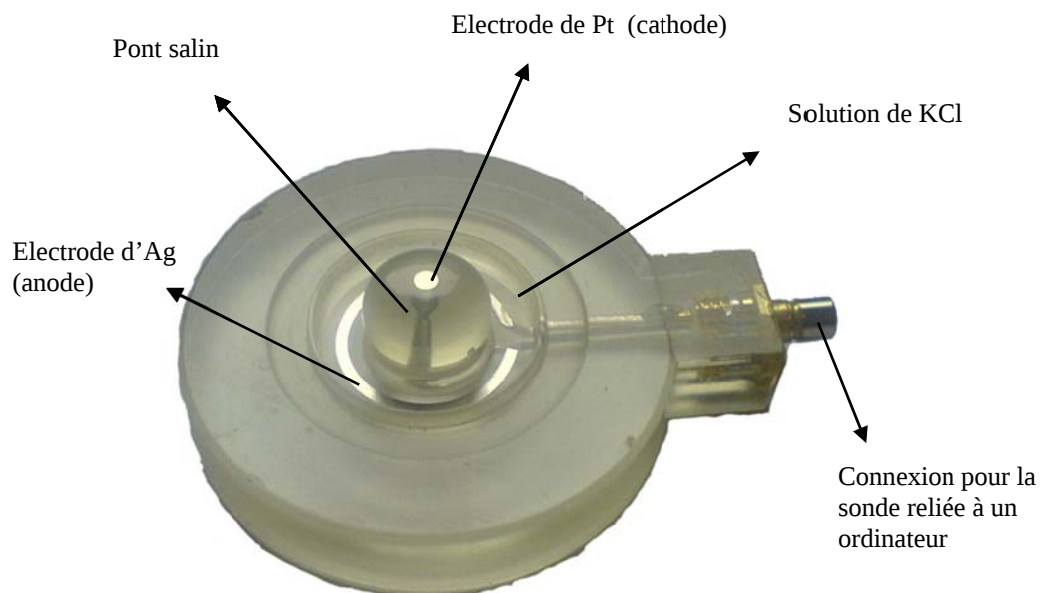


Figure D.1 : Photographie du capteur à oxygène de Clark.

Description du senseur à oxygène (figure D.2):

La cathode est un petit anneau de platine centré dans un isolant. Elle est reliée à l'électrode de référence (l'anode Ag-AgCl) qui est la bague faisant tout le tour de la demi-lune d'isolant sur laquelle repose la cathode. Le contact électrique entre ces deux électrodes est assuré à l'aide d'un pont salin fait d'un fin film en polytetrafluoroéthylène (Téflon, 10 µm) et d'une solution de KCl (50 % saturé). Ce film permet de séparer la solution à analyser de la cathode. Comme il est hydrophobe, l'eau, les ions et les molécules polaires ne peuvent pas le traverser. Seul l'oxygène réalise ce chemin pour entrer en contact avec l'électrode de travail.

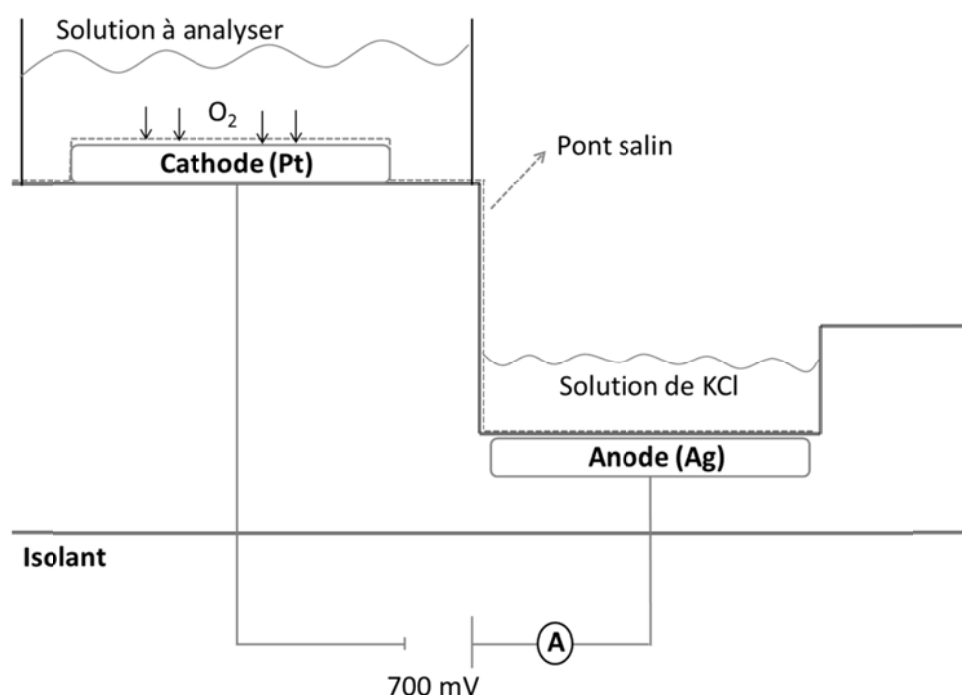


Figure D.2 : Coupe transversale du senseur à oxygène.

Les deux électrodes sont maintenues à une différence de potentiel de 700 mV de façon à réduire l' O_2 d'abord en H_2O_2 puis en OH^- à la cathode comme montrés par les équations de la figure D.3.

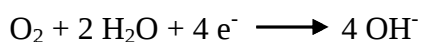
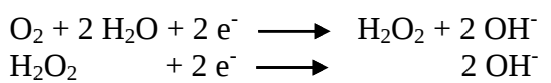
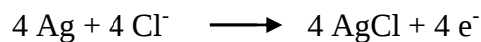
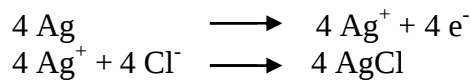
Cathode (électrode de Pt) :**Anode (électrode d'Ag) :**

Figure D.3 : Réactions électrochimiques mises en jeu dans l'oxymètre.

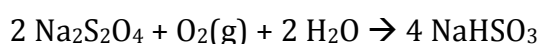
Principe :

La solution à analyser est agitée à l'aide d'un barreau et repose sur l'électrode Pt qu'une cuve vient recouvrir pour étanchéifier le système. L'oxygène diffuse à travers le film de Téflon et les réactions électrochimiques démarrent. Quand le système est à l'équilibre (agitation régulière, température constante) la quantité d'oxygène à la surface de la cathode est proportionnelle à la quantité d'oxygène dissout dans la solution. La sonde reliée au dispositif va alors mesurer le courant qui parcourt le circuit et transmettre ces données à un ordinateur. Un logiciel reprend tous les points enregistrés par la sonde et les applique sous forme graphique de la concentration en O₂ en fonction du temps. Il apparaît alors à l'écran une pente orientée suivant la consommation ou la production d'oxygène dans la solution.

La mesure du courant est influencée par la vitesse d'agitation et la température à laquelle l'opération est effectuée. A une pression de 1 atm, la concentration de saturation en oxygène dissout dans l'eau (Cs) est donnée en fonction de la température (°C) par la relation empirique : $Cs = 14,16 - 0,3943 T + 0,007714T^2 - 0,0000646 T^3$.

Etalonnage :

Avant toute mesure, la cellule doit être étalonnée. Dans un premier temps, le courant est mesuré dans une solution de 1 mL d'eau pure à une température contrôlée et constante sous 1 atm. Par la relation précédente, le logiciel est alors capable de relier le courant qui passe à la concentration en oxygène. Dans un second temps, le zéro est effectué. Pour cela, tout l'oxygène est retiré de la solution par addition de cristaux de dithionite de sodium :



Ensuite, la solution exempte d'oxygène est retirée et remplacée par 1 mL d'eau pure à température constante où le logiciel recalcule qu'une même intensité de courant que précédemment passe dans le système.

Annexe E

La chambre de Neubauer

La chambre de Neubauer est un hématimètre (figure E.1), c'est-à-dire un outil permettant de compter le nombre de cellules dans une suspension. Il en existe plusieurs types qui diffèrent principalement par leur quadrillage mais tous ont le même objectif : connaître le nombre de cellules présentes par unité de volume.

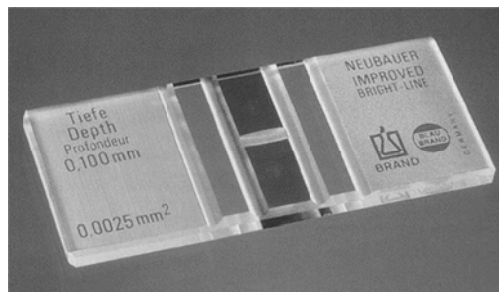


Figure E.1 : Chambre de Neubauer.

Il s'agit d'une petite pièce de verre subdivisée très précisément en petits carrés recouverte par une lamelle de verre. Les cellules sont placées à l'aide d'une pipette Pasteur sur le socle en verre. Par capillarité, le milieu va remplir l'interstice entre le socle et la lamelle entraînant les cellules avec lui. Le trop-plein allant directement dans les canaux situés en bordure de la zone de comptage (figure E.2).

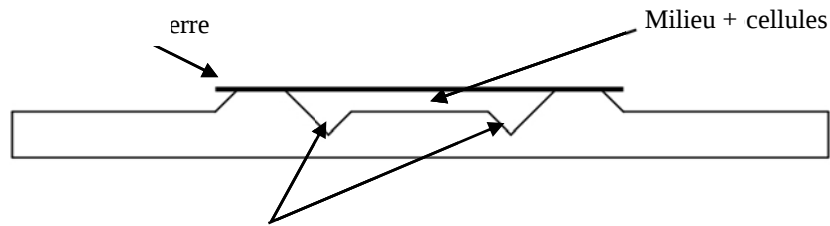


Figure E.2 : Vue de profil d'une chambre de Neubauer.

Une fois les cellules disposées dans la chambre, elles sont comptées au moyen d'un microscope en s'aidant du quadrillage. Ce système de numération de cellules est créé de façon à compter celles dans un carré rouge (figure E.3). Le chiffre obtenu, multiplié par 10.000, correspond au nombre de cellules par millilitre pour une chambre dont la profondeur est de 0,1 mm et d'une surface égale à 0,0025 mm² pour le carré rouge. Il est impératif de dénombrer les cellules de tous les carrés et d'en faire la moyenne pour plus d'exactitude.

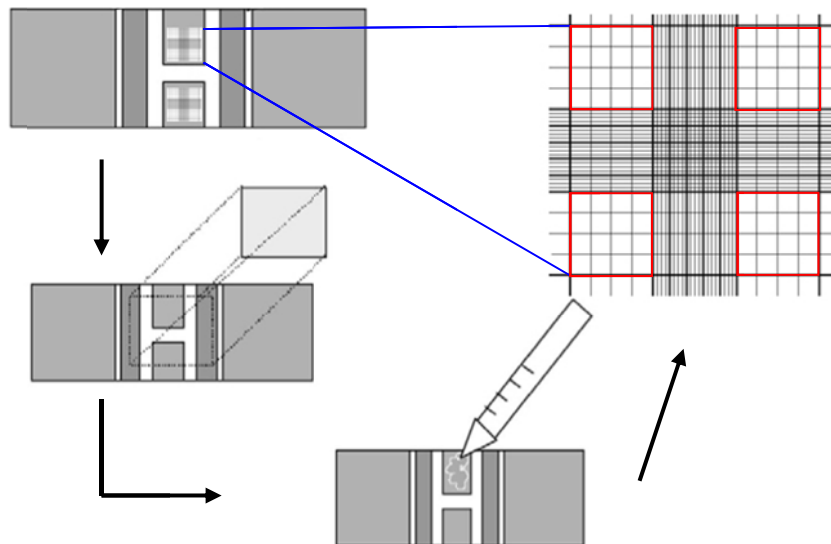


Figure E.3 : Schéma de principe de la chambre de Neubauer.

La photo de la figure E.4 montre le quadrillage observé au cours de ce comptage de cellules.

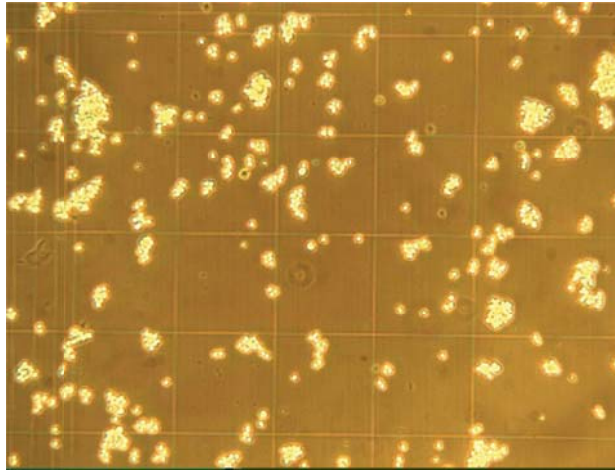


Figure E.4 : Photographie de cellules déposées sur chambre de Neubauer (carré rouge inférieur droit).

Dans le cadre de cette thèse, l'objectif était d'obtenir une densité de 50.000 cellules par millilitre. Pour la reproductibilité des mesures et la concordance entre les expériences, précisément le même nombre de cellules étaientensemencées dans chaque puits. Par conséquent, en fonction de la densité obtenue grâce à cette méthode, nous connaissions la dilution à effectuer pour que chacun des puits utilisés lors du dosage de la LDH contienne un même nombre connu de cellules.

Annexe F

Le dosage de la LDH

Le principe de ce test de cytotoxicité se base sur un dosage de la quantité de LDH (Lactate déshydrogénase) présente dans le surnageant d'une culture cellulaire suite au stress provoqué par des composés d'intérêt (alcools, NaCl et silice dans notre cas).

La LDH est une enzyme intracytoplasmique des HepG2, elle n'est pas présente dans le milieu de culture si les cellules sont intactes. En présence d'un choc (osmotique, température, ...) entraînant la mort de la cellule, la membrane cellulaire perd sa fonction, devient perméable et la LDH peut alors se retrouver dans le milieu de culture, où elle sera détectée.

Un kit de détection composé de lactate, de NAD^+ , du sel de tetrazolium (jaune) et d'un catalyseur (une diaphorase) permet de doser la LDH. La quantité de LDH est directement proportionnelle à la quantité de formazan (rouge) formé comme le montre la figure F.1. Une mesure de l'absorbance par spectrométrie visible informe de l'activité de LDH relarguée dans le milieu, proportionnelle à la toxicité du composé.

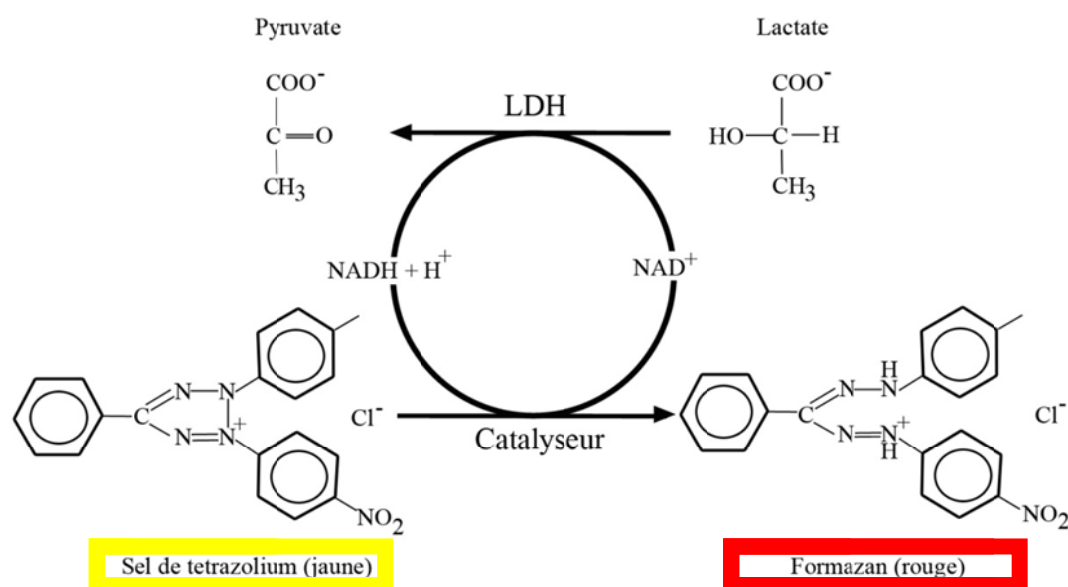


Figure F.1 : Principe du test de cytotoxicité par dosage de la LDH.

Dans une plaque 24 puits sontensemencées 50.000 cellules HepG2. Un triplicat de chaque composé est présent pour chacune des concentrations testées, ce qui permet 8 conditions par plaque. Sur chaque plaque, un triplicat est dédié à être le contrôle (milieu avec cellules, sans composé testé pour connaître le taux de LDH dans le surnageant suite à la mort naturelle des cellules) et un second à être un blanc (milieu sans cellules). Les 6 triplicats restants (A, B, C, D, E, et F) concernent les composés dont la toxicité doit être estimée (figure F.2).

A l'aide d'une chambre de Neubauer, les cellules dans leur milieu sont comptées,ensemencées dans 21 puits et placées dans l'étuve de culture. Le lendemain, le milieu de culture avec sérum est retiré et remplacé par du milieu mélangé avec le composé à tester. Les cellules sont incubées pendant une période 5 h au cours de laquelle les composés vont altérer ou non l'état des cellules.

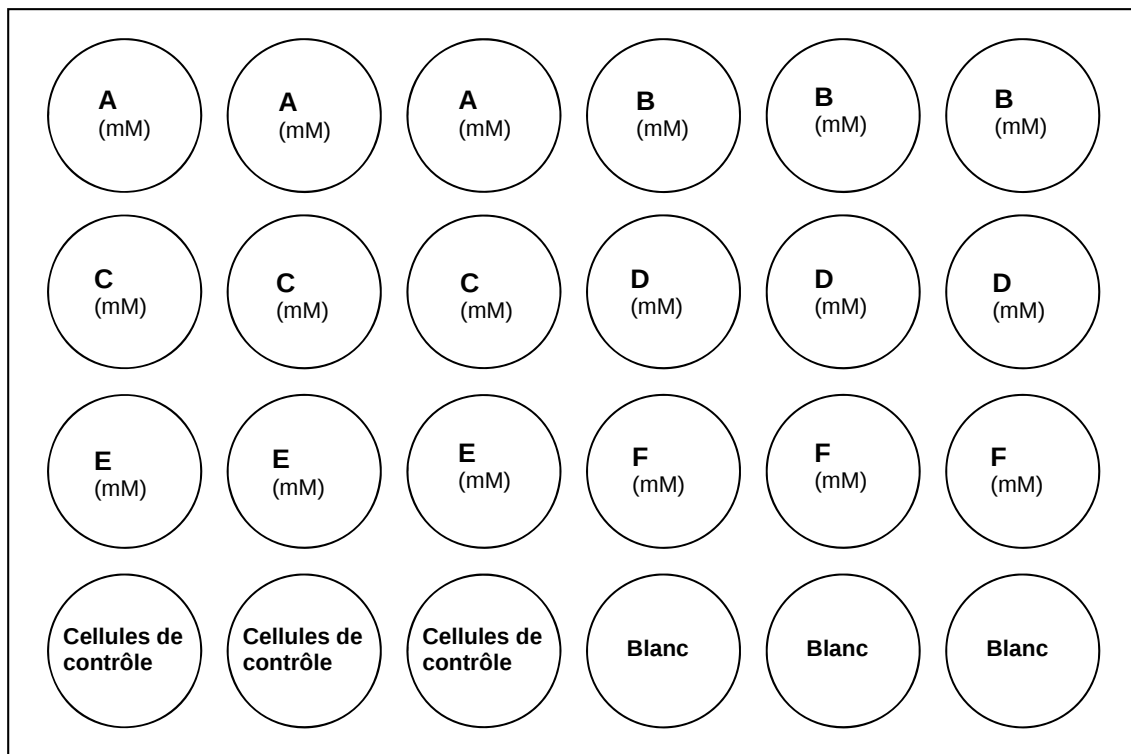


Figure F.2 : Représentation simplifiée d'une plaque 24 puits avec les 6 triplicats des différentes concentrations et les puits des cellules contrôles et du blanc.

Ce laps de temps écoulé, le surnageant est récolté. Les cellules au fond du puits sont lysées volontairement à l'aide d'une solution de triton X-100 (10 %) pour connaître la concentration en LDH associée aux cellules toujours vivantes adhérentes au fond du puits et en dégager le pourcentage relargué dans le surnageant selon l'équation ci-dessous. Plus ce pourcentage est élevé, plus il y a eu de cellules mortes dans cette condition.

$$\text{Cytotoxicité (\%)} = \frac{\left(\frac{\text{Absorbance du surnageant} - \text{Absorbance du blanc}}{\text{Absorbance du lysat} - \text{Absorbance du lysat des blancs}} \right) \times 100}{\left(\frac{\text{Absorbance du surnageant} - \text{Absorbance du blanc}}{\text{Absorbance du lysat} - \text{Absorbance du lysat des blancs}} \right) + \left(\frac{\text{Absorbance du surnageant} - \text{Absorbance du blanc}}{\text{Absorbance du lysat} - \text{Absorbance du lysat des blancs}} \right)} \times 100$$

La concentration en LDH est déterminée par le test enzymatique suivant (figure E.1) : La réduction du NAD^+ en $\text{NADH} + \text{H}^+$ se fait grâce à la conversion du lactate en pyruvate catalysée par la LDH. La diaphorase va alors permettre de réduire le sel de tetrazolium (jaune) en formazan (rouge) grâce au transfert des électrons à partir du cofacteur ($\text{NADH} + \text{H}^+$). L'absorbance de la solution à 492 nm est mesurée pour chaque échantillon et un calcul tenant compte dans la concentration de LDH dans le surnageant en

fonction de la concentration totale permet de connaître le pourcentage de toxicité du composé à une concentration donnée.

Dans le cadre de cette thèse, le dosage de la LDH fut un moyen de mettre en évidence la cytotoxicité des produits secondaires en fonction de leur concentration. Les informations recueillies ont servi à établir la fenêtre de concentrations dans laquelle ces produits ne sont pas toxiques pour les cellules HepG2 et ont dicté la façon de préparer le sol avant d'y incorporer les cellules.

