



Université de Namur

Faculté des Sciences
DÉPARTEMENT DE CHIMIE
Laboratoire de Chimie des Matériaux Inorganiques

**Conception de biomatériaux hybrides poreux
adaptés à l'encapsulation de cellules animales pour
la thérapie cellulaire**

- Version finale -

Dissertation présentée par
Grégory LEROUX
en vue de l'obtention du grade
de Docteur en Sciences

Composition du jury :

Prof. Johan Wouters (UNamur, Namur, président du jury)
Prof. Nathalie Caron (UNamur, Namur)
Prof. Alain Krief (UNamur, Namur)
Dr. Christophe Meunier (Cebedeau, Liège)
Prof. Carine Michiels (UNamur, Namur, co-promotrice)
Prof. Bao-Lian Su (UNamur, Namur, promoteur)

Janvier 2014

Université de Namur
FACULTÉ DES SCIENCES
Rue de Bruxelles 61—5000 NAMUR
Tél. +32 (0)81 72 41 11 - Fax. +32 (0)81 23 03 91

Conception de biomatériaux hybrides poreux adaptés à l'encapsulation de cellules animales pour la thérapie cellulaire

Grégory Leroux

Parmi les maladies induites par des carences en protéine ou en hormone, le diabète sucré de type 1 prend chaque année de plus en plus d'ampleur et rend la vie très difficile aux personnes qui en sont atteintes. Cette maladie est caractérisée par la destruction auto-immune des cellules pancréatiques β sécrétrices d'insuline. Le traitement le plus couramment utilisé consiste en une administration discontinue d'insuline par injection (insulinothérapie), impliquant un régime drastique et une attention de tous les instants de la part du patient qui court constamment un risque d'hyper- ou d'hypoglycémie. Une première alternative est la transplantation de pancréas ou d'une partie de celui-ci, les îlots de Langerhans, mais le faible nombre de donneurs et la nécessité de suivre un traitement médicamenteux immunosuppresseur pour éviter le rejet constituent de sérieux inconvénients. Une solution prometteuse pour le traitement de ce type de maladies est de piéger des cellules xénogéniques dans un matériau biocompatible, robuste et semi-perméable qui va les protéger du système immunitaire et de tout stress mécanique.

Cette thèse met en évidence la possibilité d'utiliser des microcapsules minéralisées en TiO_2 , synthétisées dans des conditions douces, en tant qu'« organe artificiel ». Ce matériau original a été développé en s'affranchissant des contraintes provoquées par l'utilisation de précurseurs alkoxydiques dans la préparation traditionnelle des matériaux inorganiques par le procédé sol-gel, telles que la toxicité des additifs et sous-produits de réaction ou la contraction matricielle au cours du temps. Cet organe artificiel est obtenu grâce à des capsules d'alginate piégeant des cellules animales et exploitées en tant que milieu protecteur pour le dépôt de films de dioxyde de titane. L'utilisation de multiples techniques a permis de mettre en évidence la biocompatibilité, la robustesse et la porosité adaptée des microcapsules tout en démontrant le maintien de la viabilité et de l'activité des cellules modèles HepG2 encapsulées.

Des études *in vivo* réalisées chez le rat ont ensuite permis de démontrer la biocompatibilité des microcapsules vis-à-vis d'un organisme hôte et l'immuno-isolation efficace des cellules encapsulées.

Enfin, l'encapsulation de cellules d'un insulinome de rat sécrétrices d'insuline, les INS-1E, a mis en évidence le maintien de la production d'insuline *in vitro* de ces cellules en réponse à une stimulation par du glucose et la diffusion de cette hormone en dehors de la matrice.

Au terme de cette thèse, nous sommes parvenus à concevoir et développer un matériau résistant, biocompatible et poreux adapté à une utilisation en tant qu'organe artificiel pour la thérapie cellulaire.

Dissertation présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences
Janvier 2014

Promoteur : Prof. Bao Lian-SU

Co-promotrice : Prof. Carine MICHIELS

University of Namur
FACULTY OF SCIENCE
Rue de Bruxelles 61—5000 NAMUR
Tél. +32 (0)81 72 41 11 - Fax. +32 (0)81 23 03 91

Conception of porous hybrid biomaterials adapted to animal cells encapsulation for the cell therapy

Grégory Leroux

Among the diseases induced by protein or hormone deficiencies, type 1 diabetes mellitus is becoming increasingly widespread and makes life very difficult for people who are affected. It is characterized by the destruction of the insulin secreting β -cells by the immune system. The most commonly used treatment is the insulinotherapy which implies a drastic diet and much attention from the patient who is all the time put at risk of hyper- or hypoglycemia. A first alternative is the transplantation of pancreas or islets of Langerhans but the low number of donor and the necessity to follow an immunosuppressive medication to prevent the graft rejection are serious drawbacks. A promising solution for the treatment of this type of disease is the encapsulation of xenogeneic cells within a biocompatible, robust and semi-permeable material which will protect them against immune system or mechanical stress

This thesis highlights the possibility of using mineralized TiO_2 microcapsules synthesized under mild conditions as “artificial organ”. This original material has been developed by overcoming constraints induced by the use of alkoxy precursors in the inorganic materials preparation by sol-gel process such as the toxicity of some additives and of the by-products of reaction or the matrix contraction over time. This artificial organ is obtained by using alginate capsules entrapping animal cells as a template for the deposition of a TiO_2 layer. Various techniques underscored the biocompatibility, the high mechanical strength and the ideal porosity of the microcapsules while showing the prolongation of the viability and of the activity of the encapsulated HepG2 model cells.

In vivo experiments realized on rats highlighted the biocompatibility of the microcapsules towards a living host organism and the efficient encapsulated cells immune-isolation.

Finally, the encapsulation of insulin secreting rat insulinoma-derived INS-1E cells showed that these cells retained their *in vitro* responsive property to glucose for insulin secretion and that this hormone diffused well outside of the microcapsules.

This work allowed designing and developing a robust, biocompatible and porous biomaterial as an artificial organ suitable for the cell therapy.

Thesis submitted for the Degree of Doctor of Philosophy (Ph.D.)
January 2014

Supervisor: Prof. Bao Lian-SU

Co-supervisor: Prof. Carine MICHIELS

Merci !

En préambule à cette thèse, je tiens à remercier chaleureusement toutes les personnes côtoyées avec grand plaisir durant ces 6 dernières années et ayant participé de quelque manière que ce soit à l'aboutissement de ce travail de longue haleine.

Je remercie tout d'abord Bao-Lian Su pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour m'avoir donné l'opportunité d'ajouter quelques cordes à mon arc. Je n'oublie pas son épouse Isabelle, qui a constamment veillé à nous faciliter la vie en nous épargnant certaines tâches fastidieuses et qui nous a à chaque fois très bien reçu lors des barbecues de fin d'année.

Ce fut également un plaisir d'être encadré par Carine Michiels, qui a toujours su trouver les mots pour me booster lors des périodes de doute et qui possède un enthousiasme particulièrement communicatif ! Vous avez assurément joué un très grand rôle dans l'aboutissement de ce travail.

Il en va de même pour Christophe qui aura su me remettre sur les bons rails à une période où je m'égarais et songeais sérieusement à changer de cap. Merci pour tes conseils et ton aide.

Je remercie vivement Nathalie Caron pour m'avoir permis de réaliser les expériences sur animaux de laboratoire dans son Unité. L'aide de son équipe aura été plus que précieuse. Un énorme merci à Virginie, Isabelle, Laetitia et Vanessa.

Je remercie également les autres membres du jury, Prof. Wouters et Prof. Krief pour le temps consacré à l'évaluation de ces travaux et pour tout l'intérêt qu'ils y porteront.

Ma gratitude va également aux membres de l'URBC qui ont toujours eu la gentillesse de me procurer au plus vite des boîtes de cellules ou de m'expliquer patiemment certaines manipulations. Merci à Antoine, Édith, aux deux Lionel, à Marie ainsi qu'à tous les autres.

Les membres du LabCeTi ne sont certainement pas oublié et plus particulièrement Daniel, Yves Poumay et Valérie dont l'aide fut très utile dans une discipline inconnue pour moi, à savoir l'histologie et dont je retiendrai la grande gentillesse et disponibilité.

Je remercie les membres de la cellule didactique de chimie, Isabelle, Diane Philippe et Sarah ainsi que tous les assistants s'étant succédé. J'ai une pensée particulière pour Daniel, personnage ô combien truculent qui aura toujours été de bonne compagnie lors des TP de bac1 et qui avait systématiquement le mot pour rire.

Viennent ensuite tous les membres du laboratoire CMI, qui auront été nombreux à y passer au cours de ces dernières années. Ne m'en voulez pas si j'ai oublié de vous citer. Je commencerai par ceux que je connaissais déjà auparavant et dont certains sont devenus des amis (et qui j'espère le resteront), Johnny, Mémé et Pon' (tu n'as jamais fait partie du CMI mais je ne savais où te citer) ainsi qu'Arnaud, Pip's et Panpan. Ce fut également un plaisir de côtoyer les mémorants de cette année, une belle cuvée à n'en pas douter : Benja, Cyrille Mitrovic, Dedeck' et Goreux ainsi que leurs aînés, Cass Al Tono et l'Ourson. Je n'oublie pas les (très) anciens Vahit et Guy ainsi que Jo from Southampton, Philippe, Timothée, Mini- et Grand-Ben, Jérèm, Alex, Sam, Noan, Claire, François, Fred, etc... Je garderai toujours en mémoire les diverses activités de fin d'année, les fêtes de l'unif ou encore les congrès remplis d'anecdotes.

Je sors du cadre de l'Université et dis un sincère merci à tous ceux qui se sont enquis de l'avancement de ce travail, à commencer par mes parents qui m'ont donné l'opportunité de poursuivre des études, mon frerot Lio, Naïm, Thierry, Nadine, Annick et tout le reste de ma famille, mes beaux-parents, David, Katleen ainsi que tous les autres. Je n'oublie pas ma toute jeune filleule qui ne manquera certainement pas de me soutenir à sa façon lors de la défense de cette thèse.

Enfin, je garde le meilleur pour la fin, à savoir ma petite famille. Merci à mon épouse Laurence pour son amour et son soutien ainsi qu'à Maxence, le meilleur fils que je puisse avoir et à ma petite Léa, le rayon de soleil qui égaye mon quotidien. Vous êtes tout pour moi.

Table des matières

1 Introduction générale

1.1	Avant-propos : la chimie des matériaux au service de la santé	1
1.2	Le diabète	3
1.2.1	Historique	3
1.2.2	Le pancréas et la sécrétion d'insuline	5
1.2.3	Le diabète sous ses différentes formes	9
1.2.4	Les causes du diabète insulino-dépendant	11
1.2.5	Les conséquences du diabète	13
1.2.6	Les traitements	14
1.2.6.1	L'insulinothérapie	14
1.2.6.2	La greffe de pancréas ou d'îlots de Langerhans	16
1.3	L'encapsulation cellulaire : vers la création d'un pancréas artificiel	19
1.3.1	Les méthodes d'encapsulation et leurs applications	20
1.3.2	L'encapsulation <i>in situ</i> par le procédé sol-gel	26

2 Objectifs et stratégie scientifique

2.1	Objectifs	30
2.2	Stratégie scientifique	31
2.2.1	Les cellules modèles	32
2.2.1.1	Les cellules HepG2	32
2.2.1.2	Les cellules INS-1E	32
2.2.2	Conception des matrices	34

3 Partie expérimentale

3.1	Culture cellulaire	37
3.1.1	Culture des cellules HepG2	37
3.1.2	Culture des cellules INS-1E	39
3.2	Caractérisation des matrices synthétisées	40

3.2.1 Le séchage au CO ₂ supercritique	40
3.2.2 L'adsorption-désorption d'azote (BET)	41
3.2.3 La microscopie électronique à balayage (MEB)	42
3.2.4 L'analyse dispersive en énergie (EDX)	43
3.2.5 La spectroscopie UV-visible	43
3.2.6 La spectrofluorimétrie	44
3.2.7 Le dosage de la LDH	45
3.3 Evaluation de la viabilité et de l'activité des cellules encapsulées	47
3.3.1 Mesure de la densité cellulaire	47
3.3.2 L'oxymétrie	48
3.3.3 La microscopie à fluorescence	49
3.3.4 Le dosage ELISA	50

4 Conception d'une matrice poreuse, résistante et biocompatible pour l'encapsulation de cellules animales

4.1 Les matrices sol-gel	53
4.1.1 Choix des précurseurs et agents stabilisants	55
4.1.2 Le glycérol comme agent stabilisant	57
4.1.2.1 Synthèse des matrices	57
4.1.2.2 Analyse de la morphologie et de la composition	58
4.1.2.3 Analyse de la porosité	59
4.1.3 L'éthylène glycol comme agent stabilisant	61
4.1.3.1 Synthèse des matrices	61
4.1.3.2 Analyse de la morphologie et de la composition	62
4.1.3.3 Analyse de la porosité	62
4.1.4 Evaluation de la survie cellulaire par l'étude de la cytotoxicité des agents stabilisants et des sous-produits	65
4.2 Les matrices <i>core/shell</i>	67
4.2.1 L'alginate, une matrice naturelle	67
4.2.1.1 Purification de l'alginate	70
4.2.1.2 Synthèse de capsules d'alginate	70
4.2.1.3 Analyse de la porosité et de la morphologie	71

4.2.1.4 Evaluation de la viabilité des cellules encapsulées dans une matrice d'alginate	73
4.2.2 Synthèse de matrices <i>core/shell</i>	73
4.2.3 Etude de la survie des cellules encapsulées	74
4.3 Conception de capsules hybrides alginate@TiO ₂	75
Article: Design of Hybrid Alginate@TiO ₂ Microcapsules as a Reservoir of Animal Cells and Drug Delivery System for Cell Therapy	78
 5 Etudes <i>in vivo</i> de la biocompatibilité des matrices hybrides et de l'immuno-isolation des cellules encapsulées	
5.1 Etudes précédentes	113
5.2 Avant-propos	114
Article: Alginate-Based Hybrid Materials as an « Artificial Organ » Model: <i>In Vivo</i> Biocompatibility and Evaluation of Entrapped Human Cell Immune-Isolation	115
 6 Encapsulation de cellules β au sein des matrices poreuses pour la délivrance d'insuline sous stimulation par le glucose	
6.1 Avant-propos	146
Article: Encapsulation of beta INS-1E Cells in Alginate@TiO ₂ Microcapsules for the Controlled Delivery of Insulin	148
 7 Conclusions générales et perspectives	
Bibliographie	176
Annexe I : Composition des milieux de culture	194
Annexe II : L'adsorption-désorption d'azote (BET)	199
Annexe III : Publications scientifiques	206

Liste des abréviations employées dans cette thèse

ADN	Acide désoxyribonucléique
AS	Bille alginate-silice
ASA	Bille alginate-silice/alginate
ATP	Adénosine triphosphate
BET	Brunauer, Emmett et Teller, du nom des inventeurs de la théorie relative à la méthode d'analyse par adsorption-désorption d'azote
BJH	Barret, Joyner et Halenda, du nom des auteurs de la méthode permettant de calculer la distribution de taille de pores des matériaux mésoporeux à partir des isothermes obtenues par analyse BET
β TC	Beta-tumour cells
DGS	Diglycérylsilane
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium, milieu de culture
EDTA	Acide éthylène diamine tétra-acétique
EDX	Energy-dispersive X-ray spectroscopy
EGTA	Acide éthylèneglycol tétra-acétique
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EthD-1	Ethidium homodimère-1
Fas	Protéine transmembranaire médiatrice de la mort par apoptose de cellules transformées via les lymphocytes T activés
FDA	Diacétate de fluorescéine
Figure a.b	Figure où a correspond au numéro de chapitre et b au numéro de figure
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
GLUT	Transporteur de glucose
HepG2	Hépatome G2
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)pipérazine-1-éthanesulfonique

HOMO	Highest occupied molecular orbital
IgG	Immunoglobuline G
IL-6	Interleukine 6
INS-1	Insulinome de rat (insulinoma cell line)
INS-1E	Lignée clonale d'INS-1
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
kDa	Kilo Dalton
keV	Kilo électron-volt
LDH	Lactate déshydrogénase
LUMO	Lowest unoccupied molecular orbital
MCP-1	Protéine chimiotactique monocyttaire-1
MEB	Microscopie électronique à balayage
MIN	Transgenic C57BL/6 mouse insulinoma cell line
NOD	Non-obese diabetic
PBS	Phosphate buffer solution
PDDAC	Chlorure de poly(diallyl diméthyl ammonium)
PLL	Poly-L-lysine
PLO	Poly-L-ornithine
RIN	Rat insulinoma cell line
Rpm	Rotation par minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute, milieu de culture
S _{BET}	Surface spécifique obtenue par la technique d'adsorption-désorption d'azote
SEM	Scanning electron microscopy
Tableau a.b	Tableau où a correspond au numéro de chapitre et b au numéro de tableau
TiBALDH	Bis(ammonium lactato) dihydroxyde de titane(IV)
Ti(OiPr) ₄	Isopropoxyde de titane(IV)
Ti(Obu) ₄	n-butoxyde de titane (IV)
UV-visible	Ultra-violet - Visible

Chapitre 1.

Introduction générale

Chapitre 1

Introduction générale

1.1. Avant-propos : la chimie des matériaux au service de la santé

La chimie occupe une place importante dans le domaine de la santé. En effet, son utilité paraît évidente dans la conception de nouveaux médicaments et dans la compréhension des divers mécanismes enzymatiques intervenant dans notre organisme. Ces études permettent de mieux comprendre les effets d'une maladie afin de la traiter et d'améliorer la qualité de vie des patients. Ainsi, l'acide acétylsalicylique ou aspirine, synthétisé pour la première fois par Charles Frederik Gerhardt, un chimiste strasbourgeois, en 1853 et commercialisé par Bayer dès 1899, permet chaque année de procurer à des milliards de personnes à travers le monde un moyen efficace de soulager la douleur, de réduire l'inflammation ou encore de prévenir les risques de maladies cardiovasculaires (*figure 1.1*).

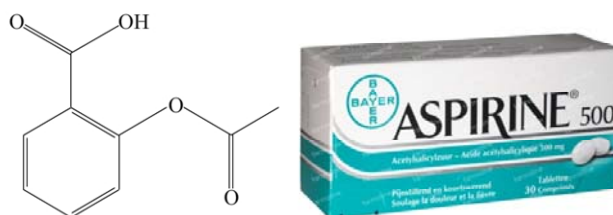


Figure 1.1 : L'acide acétylsalicylique synthétisé par Gerhardt en 1853 et commercialisé par Bayer à partir de 1899 comme antidouleur et antipyrétique.

Cependant, il existe certaines pathologies qui ne pourront jamais être traitées à l'aide de médicaments, comme peuvent l'être les maladies infectieuses provoquées par des virus ou des bactéries. Ainsi, les maladies d'Alzheimer et de Parkinson sont dues à une détérioration du fonctionnement des cellules nerveuses pouvant conduire à leur mort (*figure 1.2*). L'anémie, elle, est causée par une diminution de la concentration en hémoglobine intra érythrocytaire. Quant au diabète de type 1, il s'agit d'une maladie auto-immune menant à la destruction des cellules pancréatiques β

sécrétrices d'insuline chargées du contrôle de la glycémie. Selon le dernier rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS)¹, le diabète affecte 347 millions de personnes de par le monde² et sera la 7^{ème} plus importante cause de mortalité d'ici 2030. Si les moyens mis en œuvre à l'heure actuelle améliorent considérablement la qualité de vie des patients, ils ne font généralement que retarder les complications et ne résolvent en aucun cas le cœur du problème.

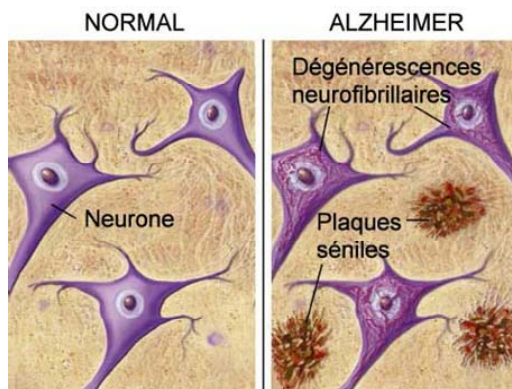


Figure 1.2 : Illustration de neurones normaux et détériorés chez un individu atteint de la maladie d'Alzheimer³.

Depuis quelques années, le mariage des matériaux inanimés et des systèmes vivants, créant des matériaux *vivants*, ouvre de grandes perspectives dans la guérison de maladies chroniques graves ou dans d'autres applications dans le domaine de la santé⁴. Ainsi, l'exploitation de cellules photosynthétiques produisant des métabolites d'intérêt permet-elle de réduire les contraintes liées à des méthodes de synthèse complexes, lentes et coûteuses^{5,6,7}. Ces matériaux permettraient également d'intervenir, non plus sur les effets, mais sur les causes de la maladie telles que la destruction des cellules sécrétrices d'insuline dans le cas du diabète de type 1.

¹ Organisation Mondiale de la Santé (OMS), <http://www.who.int>, consulté le 21 août 2013.

² G. Danaei, M.M. Finucane, Y. Lu, G.M. Singh, M.J. Cowan, C.J. Paciorek, J.K. Lin, F. Farzadfar, Y.-H. Khang, G.A. Stevens, M. Rao, M.K. Ali, L.M. Riley, C.A. Robinson, M. Ezzati, *Lancet*, 2011, **378**, 31-40.

³ L.C. Silbert, *Neurology*, 2007, **69**, E8-E11 (figure modifiée à partir d'une image originale).

⁴ A. Léonard, P. Dandoy, E. Danloy, G. Leroux, C.F. Meunier, J.C. Rooke, B.-L. Su, *Chem. Soc. Rev.*, 2011, **40**, 860-885.

⁵ G. Carturan, R. Dal Monte, G. Pressi, S. Secondin, P. Verza, *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 1998, **13**, 273-276.

⁶ H. Dörnenburg, *Process Biochem.*, 2004, **39**, 1369-1375.

⁷ J.-S. Cheng, Y.-J. Yuan, *Proteomics*, 2006, **6**, 2199-2207.

1.2. Le diabète

1.2.1. Historique

Le diabète est une maladie décrite depuis l'Antiquité et se caractérisant, à l'origine, par une soif excessive, ainsi qu'une miction, une déshydratation et une perte de poids importante. Le terme diabète réfère généralement au diabète *mellitus* (*sucré*, en latin), par opposition au diabète *insipidus* (voir *point 1.2.3*) car la grande majorité des patients présentent une urine sucrée. Bien que les médecins de tout temps s'intéressèrent en masse à cette pathologie, l'issue s'est avérée fatale pour les malades pendant près de trois millénaires, jusqu'aux découvertes majeures effectuées au début du 20^{ème} siècle. En 1874, Georg Ebers, un égyptologue allemand, édita un document écrit aux alentours de 1500 avant Jésus-Christ et excavé d'un tombeau de l'Egypte antique à Thèbes en 1862, le Papyrus d'Ebers⁸. Cette référence médicale de l'époque décrivait une maladie entraînant *une grande soif et une perte d'urine trop importante, menant irrémédiablement à la mort*. Les médecins de l'Egypte antique recommandaient *la prise de grains de blé, de fruits et de bière*. La première description clinique de cette maladie fut développée à la même époque en Inde par les médecins locaux. Ils observèrent en effet que l'urine des patients attirait les fourmis et les mouches. Ils nommèrent cette pathologie « *Madu Méhé* »⁹, signifiant « *urine de miel* » et notèrent qu'elle touchait surtout les personnes les plus nanties en raison de leur grande consommation de produits sucrés. Ils répertorièrent également divers symptômes tels que *la soif intense, les urines abondantes, l'haleine fétide et l'amaigrissement*. De la même manière, à l'époque de l'antiquité gréco-romaine, Hippocrate (~460-370 av. J.-C.), le père de la médecine, reconnaissait les diabétiques sur l'Agora au *grand nombre d'abeilles voltigeant autour de leur toge dont l'entrejambe était probablement imprégnée de glucose*. Le médecin grec Claude Galien (129-201 ap. J.-C.) décrivit ensuite la maladie comme spécifique aux reins, ceux-ci perdant leurs propriétés de rétention, les boissons étant éliminées directement par les urines sans altération et lui donna le nom de « *diarrhea urinosa* »¹⁰ (diarrhée d'urine) alors qu'Apollonius de Memphis, en 230 après Jésus-Christ, utilisa pour la première fois le terme « diabète », signifiant, en grec, « *passer au*

⁸ Le Papyrus d'Ebers (1600 ACN).

⁹ J.-J. Peumery, « Histoire illustrée du diabète de l'antiquité à nos jours », 1987, Ed. Dacosta, Paris.

¹⁰ J. Zajac, A Shrestha, P. Patel, L. Poretsky, « Principle of Diabetes Mellitus », 2010, Ed. Leonid Poretsky, 3-16.

travers (διαβήτης) ». Aretée de Cappadoce, médecin grec ayant exercé à Rome et Alexandrie au II^{ème} siècle après Jésus-Christ répertoria dans son manuscrit « *On the Causes and Indications of Acute and Chronic Diseases* » certaines observations telles que le fait que *l'apparition de la maladie faisait suite à une blessure ou un stress émotionnel*, que *les patients souffraient de dessèchement et de nausées à partir du moment où ils s'abstiennent de boire* et décrit le diabète comme *la liquéfaction de la chair et des membres dans l'urine*. Au X^{ème} siècle après Jésus-Christ, deux médecins indiens du nom de Sushruta et Charaka furent les premiers à différencier deux types de diabète sucré en observant que *les diabétiques minces développaient la maladie à un jeune âge alors que les diabétiques de corpulence plus forte la développaient à un âge plus avancé et vivaient plus longtemps que les premiers après le diagnostic*. Deux siècles plus tard, Li Hsuan remarqua que les diabétiques présentaient des furoncles et des infections pulmonaires et suggéra comme traitement l'abstinence et la non-consommation de vin. Au XI^{ème} siècle de notre ère, Avicenne ou Ibn Sina, médecin Perse, publia les détails de la symptomatologie du diabète, identifiant notamment la gangrène.

Il fallut ensuite attendre le XVI^{ème} siècle pour que de nouvelles découvertes sur cette maladie voient le jour. Ainsi, un médecin suisse connu sous le nom de Paracelse (1494-1541) corréla, de manière erronée, le diabète à la présence de sel dans les reins après avoir constaté la présence de résidu blanc suite à l'évaporation de l'urine des patients. Thomas Willis, médecin à Oxford, fut ensuite le premier à distinguer le diabète sucré du diabète insipide, en 1670, en goutant l'urine des malades qui se révélait *étonnamment douce, comme si elle contenait du sucre ou du miel*, confirmant les observations de l'Antiquité. Le XVIII^{ème} siècle marque alors la découverte du glucose dans les urines. En 1776, Matthew Dobson, médecin anglais, écrivit dans ses travaux « *Experiments and Observations on the Urine in Diabetics* » que *la saveur douce de l'urine des malades est due à la présence effective de sucre* et découvrit également la notion d'hyperglycémie (taux de sucre dans le sang trop élevé) en notant le goût sucré du sérum des diabétiques, supposant le passage du sucre dans le sang¹¹.

Les premières théories métaboliques visant à expliquer le diabète sont exposées dès 1797 avec le médecin écossais de la marine anglaise John Rollo selon qui *le sucre en excès dans les urines provient d'une transformation anormale des glucides alimentaires par l'estomac*. En 1815, le glucose est identifié comme étant le sucre présent dans les urines des diabétiques par le chimiste français Michel Eugène Chevreul tandis

¹¹ G. Eknayan, J. Nagy, *Adv.Chronic Kidney Dis.*, 2005, **12(2)**, 223-229.

qu'un peu plus tard, Appollinaire Bouchardat (1830-1879) découvrit que les symptômes pouvaient être diminués en réduisant la consommation de sucre. Vint alors la découverte du rôle du pancréas par Oscar Minkowski et Joseph von Mering en 1889, à l'Université de Strasbourg. Ces chercheurs allemands observèrent que le diabète se développa chez un chien à qui ils pratiquèrent une pancréatectomie (ablation du pancréas), et que les symptômes disparurent après la greffe d'un nouveau pancréas.

1.2.2. Le pancréas et la sécrétion d'insuline

En 1869, Paul Langerhans explique dans sa thèse « Contributions sur l'anatomie microscopique du pancréas » (*Beiträge zur mikroskopischen Anatomie der Bauchspeicheldrüse*) que le pancréas est constitué de cellules particulières. Ces amas de cellules endocrines furent baptisés plus tard *îlots de Langerhans*. En 1910, Sir Edward Albert Sharpey-Schafer, un des pères de l'endocrinologie, identifia que le diabète résultait du manque d'une hormone régulant la glycémie (le taux de sucre dans le sang) qu'il nomma « insula », signifiant « île » en latin, en référence aux îlots de Langerhans du pancréas qui produisent cette hormone. En 1921, les travaux de Minkowski et von Mering furent reproduits par Sir Frederick Grant Banting, médecin canadien et l'un de ses étudiants, Charles Herbert Best. Ils démontrèrent que des chiens rendus diabétiques pouvaient être traités en leur administrant des extraits d'îlots de Langerhans de chiens sains. En collaboration avec le chimiste James Collip et sous la direction de John James Richard Macleod, ils réussirent à préparer de l'insuline purifiée à partir de pancréas de vaches à l'Université de Toronto, ce qui constitua l'invention du premier traitement du diabète et sa mise à disposition à des millions de patients. Cette découverte leur valut le Prix Nobel de Physiologie ou Médecine en 1923. Leonard Thompson, un diabétique de 14 ans fut la première personne à être traitée par des injections d'insuline, ce qui lui permit de vivre 13 années supplémentaires avant de mourir d'une pneumonie. Depuis, l'insulinothérapie fait toujours partie des principaux traitements de la maladie.

Le pancréas est un organe abdominal d'environ 15 cm de long pour un poids de plusieurs dizaines de grammes. Il s'agit plus spécifiquement d'une glande à sécrétion exocrine (sécrétion d'une ou plusieurs substances en dehors du sang) et endocrine (sécrétion d'une ou plusieurs hormones dans le sang), annexée au tube digestif et située derrière l'estomac (*figure 1.3*). Le pancréas exocrine contribue à la

digestion en produisant du suc pancréatique. Les îlots de Langerhans constituent la partie endocrine du pancréas et ne représentent que 1 % du nombre de cellules de cet organe. Ces îlots, d'une taille comprise entre 50 et 900 μm , sont dénombrés à raison de une à deux millions d'unités chez l'adulte.

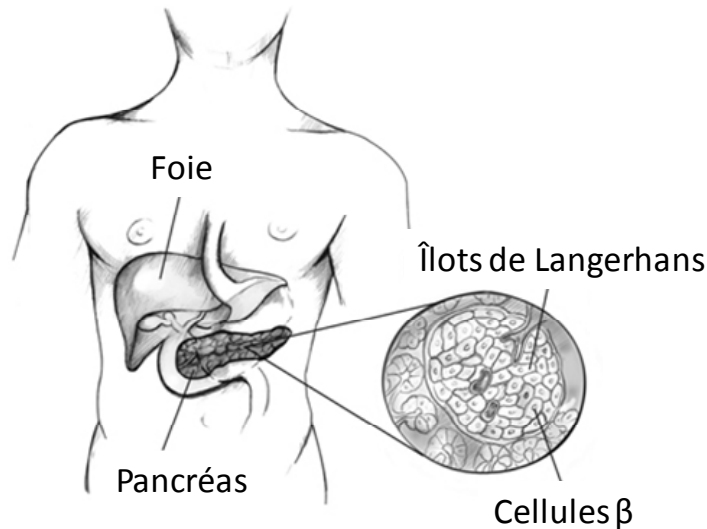


Figure 1.3 : Illustration du pancréas dans le corps humain et des îlots de Langerhans composés, notamment, de cellules β ¹².

Les îlots peuvent contenir jusqu'à 5000 cellules de quatre types différents, sécrétant chacun une hormone spécifique :

- Les cellules α , produisant le **glucagon** (hormone hyperglycémiante) (15-20 %) ;
- Les cellules β , sécrétant l'**insuline** (hormone hypoglycémiante) (65-80 %) ;
- Les cellules δ , libérant la **somatostatine** (hormone inhibant la sécrétion d'insuline et de glucagon) et la **gastrine** (3-10 %) ;
- Les cellules PP ou F, qui inhibent la sécrétion de somatostatine via la libération de **polypeptide pancréatique** (1%).

Les cellules β constituent le cœur des îlots alors que les autres sont situées en périphérie. Les cellules α et β sont donc les régulateurs de la glycémie. Pour pouvoir exercer son rôle de principale source d'énergie du corps, le glucose doit être assimilé

¹² <http://solutionsgreffe.wifeo.com/iv-a-la-therapie-cellulaire.php>, consulté le 21 août 2013 (figure modifiée à partir d'une image originale).

par les cellules. Le glucose provient essentiellement de l'alimentation mais une partie peut également être fournie à partir des réserves hépatiques de glycogène. L'insuline est hypoglycémiante dans le sens où elle permet au glucose de traverser la membrane cellulaire et d'être ainsi métabolisé.

Après un repas, le taux de sucre dans le sang augmente. Les cellules β possèdent sur leur membrane une série de transporteurs GLUT-2 permettant l'entrée du glucose dans la cellule suivant un gradient de concentration (*figure 1.4*).

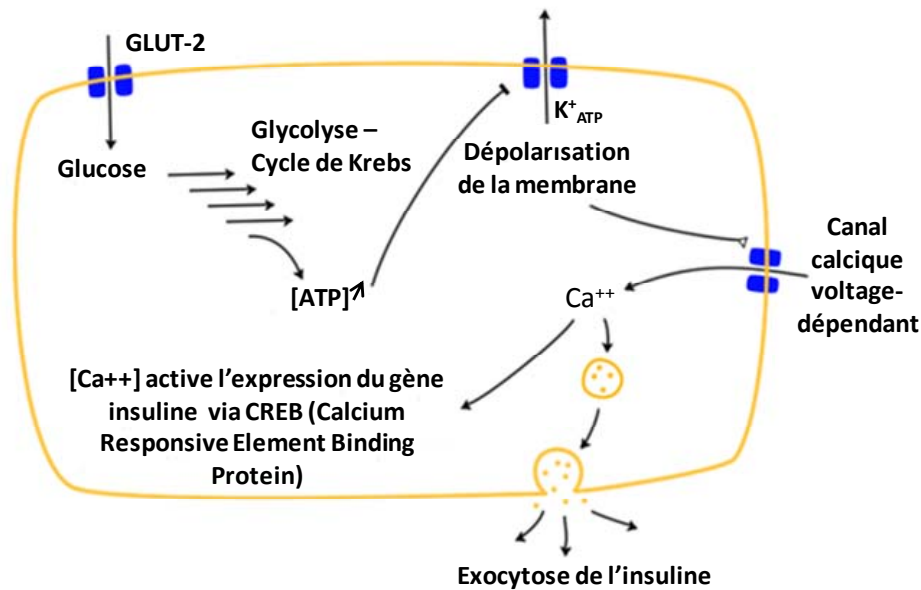


Figure 1.4 : Mécanisme de la libération d'insuline par une cellule β suite à l'augmentation de la concentration en glucose dans le sang¹³.

Le glucose est alors métabolisé et le cycle de Krebs permet la production d'ATP (adénosine triphosphate). Donc, plus la glycémie est élevée, plus de l'ATP est produit. Cette production entraîne la fermeture d'un canal potassique ATP-dépendant, dépolarisant de ce fait la membrane plasmique. En réaction à cette dépolarisation, un canal calcique *voltage-dépendant* est ouvert, permettant l'entrée du calcium au sein de la cellule. L'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire favorise l'exocytose de vésicules contenant l'insuline, une hormone constituée de deux chaînes polypeptidiques reliées entre elles par deux ponts disulfures (plus un intrachaîne) : la chaîne A comportant 21 acides aminés et un pont disulfure et la chaîne B constituée de 30 acides aminés (*Figure 1.5*).

¹³ <http://www.diabetesdaily.com/wiki/File:Glucose-insulin-release.png>, consulté le 21 août 2013 (figure modifiée à partir d'une image originale).

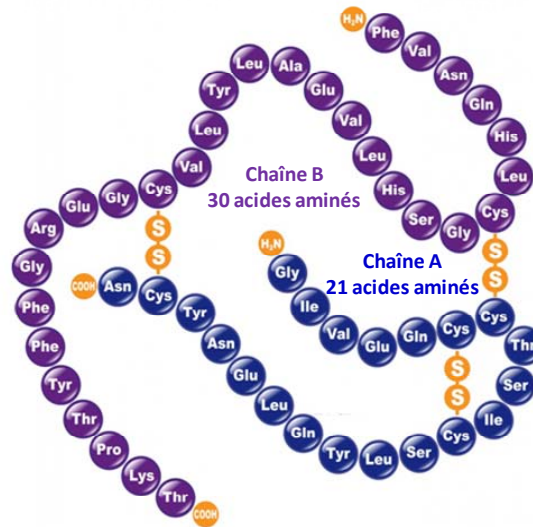


Figure 1.5 : Molécule d'insuline constituée de deux chaînes de 21 (chaîne A) et 30 (chaîne B) acides aminés reliées entre elles par 3 ponts disulfures (dont un intrachaîne)¹⁴.

Elle est d'abord produite sous la forme de préproinsuline au niveau du réticulum endoplasmique rugueux pour être ensuite clivée et donner la proinsuline, où l'on retrouve les trois ponts disulfures. L'élimination du peptide C dans l'appareil de Golgi permet l'obtention de l'insuline sous sa forme active (MW = 5,8 kDa), stockée dans des vésicules au sein du cytoplasme (*figure 1.6*).

Une fois dans les vaisseaux sanguins, l'insuline permet l'entrée du glucose dans les cellules de l'organisme qui possèdent le récepteur spécifique. Ces dernières vont polymériser le glucose en glycogène pour stocker les réserves d'énergie, principalement dans les cellules du foie et des muscles ainsi que dans le tissu adipeux. L'insuline est donc sécrétée en permanence par les cellules β avec des pics de production après les repas pour induire la mise en réserve du glucose absorbé. Lorsque l'organisme a besoin de glucose, le glucagon sécrété par les cellules α stimule la dépolymérisation du glycogène pour libérer du glucose, qui se retrouve alors dans le sang et est consommé par les cellules du corps.

La régulation de la glycémie est perturbée chez les personnes atteintes d'un diabète sucré. Cette maladie se décline en deux formes principales, le type 1 et le type 2, auxquels il faut ajouter le diabète gestationnel et quelques autres formes beaucoup plus rares.

¹⁴ <http://www.interactive-biology.com/3730/the-basics-of-protein-structure-and-function/>, consulté le 21 août 2013 (figure modifiée à partir d'une image originale).

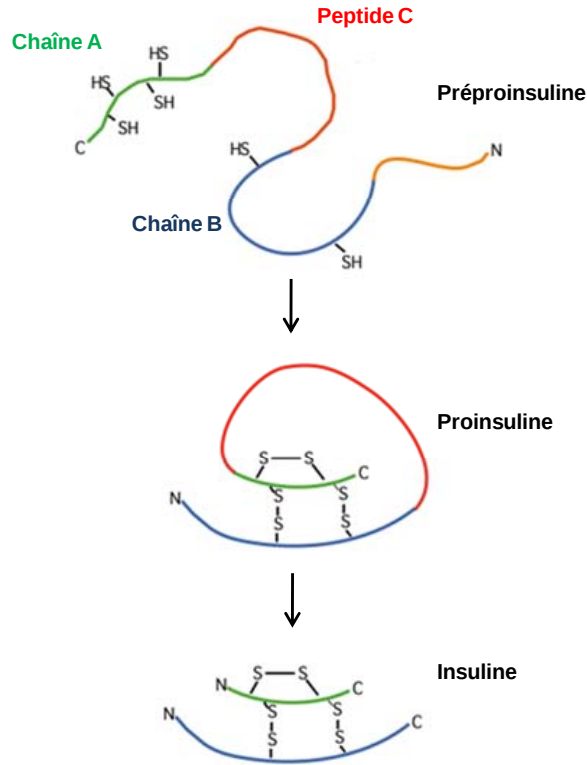


Figure 1.6 : Illustration de la maturation de l'insuline sous sa forme active¹⁵.

1.2.3. Le diabète sous ses différentes formes

La classification des différentes formes de diabète se base sur les causes, les facteurs et les manifestations de la maladie, soit son *étiologie*. Nous ne parlerons ici que du diabète sucré (*diabetes mellitus*) et non du diabète insipide (*diabetes insipidus*), ce dernier se différenciant par l'absence de goût sucré des urines et étant causé par un désordre hormonal empêchant la concentration de l'urine dans les reins, à savoir un déficit ou une résistance à la vasopressine, hormone antidiurétique.

Le diabète de **type 1** ou diabète *insulinodépendant* (ou encore diabète *juvénile*) est une maladie auto-immune au cours de laquelle le pancréas ne remplit plus son rôle de producteur d'insuline. Par maladie auto-immune, on entend que le corps attaque ses propres cellules β et les détruit. Un individu sain possède plus d'un milliard de cellules β , alors qu'une personne atteinte du diabète de type 1 en possède moins de deux millions et ne produit alors plus assez d'insuline nécessaire à la régulation de la glycémie. Ce type de diabète ne concerne que 5 à 10 % des cas. La vitesse de

¹⁵ http://bass.bio.uci.edu/~hudel/bs99a/lecture26/lecture7_3.html, consulté le 26 août 2013 (figure modifiée à partir d'une image originale).

dégradation des cellules β peut être assez variable : rapide chez les enfants et plus lente chez les adultes. La destruction auto-immune des cellules β peut provenir de prédispositions génétiques ou encore de facteurs environnementaux mais sans que l'on puisse les définir avec précision¹⁶. Ainsi, l'incidence de cette pathologie peut varier très fortement en fonction de la zone géographique (*figure 1.7*). Les patients sont également sujets à d'autres maladies auto-immunes telles que la sclérose en plaques par exemple. Les symptômes sont, comme déjà évoqué, une soif intense, une polyurie, une perte de poids importante et une grande fatigue.

Le diabète de **type 2** ou diabète *insulino-résistant*, est plus répandu (90-95 % des cas), est souvent associé à l'obésité et résulte en l'incapacité du corps à répondre efficacement à l'insuline, celle-ci étant toujours produite par le pancréas. Le problème ne vient donc pas d'une destruction auto-immune des cellules β , les malades en ayant toujours suffisamment mais plutôt d'une résistance à l'insuline. Les adultes sont majoritairement affectés mais l'on peut noter une forte augmentation de cas chez les adolescents. Les symptômes sont les mêmes que pour le diabète de type 1 mais d'une importance moindre. Si les risques de contracter ce type de diabète peuvent être réduits par une activité physique quotidienne et une alimentation saine et équilibrée, il n'existe pas de prévention pour le diabète de type 1.

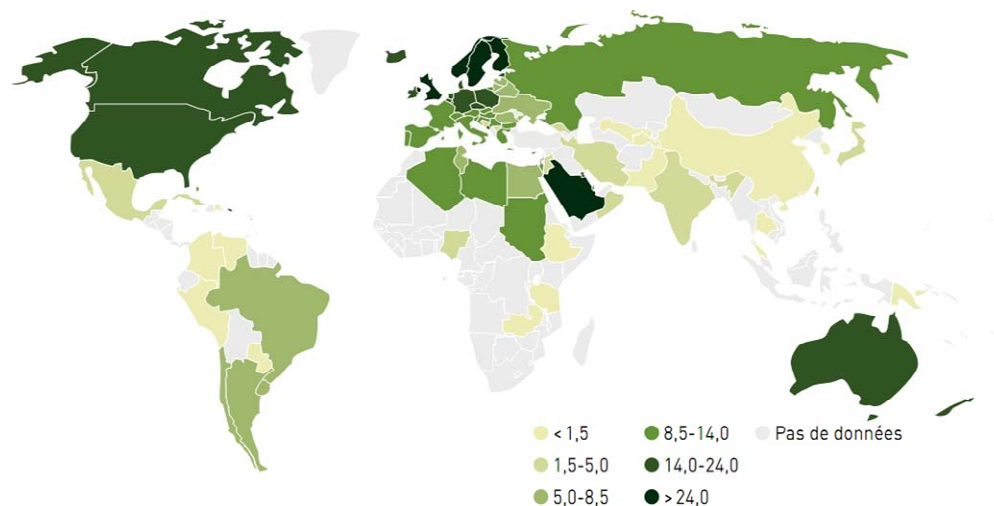


Figure 1.7 : Incidence des nouveaux cas de diabète de type 1 chez les enfants de 0-14 ans par 100.000 individus en 2011¹⁷.

¹⁶ American Diabetes Association, *Diabetes Care*, 2013, **36(1)**, S67-S74.

¹⁷ International Diabetes Federation, <http://www.idf.org/diabetesatlas/5e/diabetes-in-the-young>, consulté le 26 août 2013.

Le diabète **gestationnel** est défini comme une hyperglycémie diagnostiquée pour la première fois durant la grossesse, lors du dépistage prénatal, avec des symptômes similaires au diabète de type 2.

L'Organisation Mondiale de la Santé définit un diabétique comme *un individu dont la glycémie obtenue à jeun est à deux reprises supérieure ou égale à 7 mmol/L (1,26 g/L) ou comme un individu qui, en présence de signes cliniques évocateurs du diabète, présente une glycémie supérieure à 11 mmol/L (2 g/L), quelles que soient les conditions de prélèvement¹⁸.*

1.2.4. Les causes du diabète insulino-dépendant

L'origine du diabète de type 1 reste encore incertaine. Toutefois, les lymphocytes T, qui jouent un rôle important dans la réponse immunitaire, semblent fortement impliqués dans le processus de destruction des cellules β , selon un mode de mort cellulaire programmée ou apoptose (*figure 1.8*)^{18,19,20,21}. Chez certaines personnes, il semblerait que, durant la mort physiologique des cellules des îlots de Langerhans, les antigènes des cellules β soient excrétés. Ceux-ci sont détectés par les lymphocytes T spécifiques, qui sont alors activés et envahissent les îlots de Langerhans. Ces lymphocytes T activés pourront dès lors se différencier en cellules hautement spécialisées de caractéristiques différentes :

- Les cellules CD8+ ou lymphocytes T cytotoxiques (CTL) qui tuent les cellules β par un contact direct via des récepteurs spécifiques (récepteurs *Fas*) ou secrètent des médiateurs (cytokines) fournissant des signaux pour que davantage de leucocytes (cellules du système immunitaire : lymphocyte T, monocyte, macrophage, etc...) envahissent les îlots de Langerhans et créent de l'inflammation.
- Les cellules CD4+ qui induisent l'immunosuppression par la sécrétion d'autres types de cytokines.

L'infiltration de CTL et de macrophages dans les îlots de Langerhans est appelée insulite et décrit l'inflammation des îlots de Langerhans²².

¹⁸ D. Mathis, L. Vence, C. Benoist, *Nature*, 2001, **414**, 792-798.

¹⁹ J.D. Trudeau, J.P. Dutz, E. Arany, D.J. Hill, W.E. Fieldus, D.T. Finegood, *Diabetes*, 2000, **49**, 1-7.

²⁰ S. Turley, L. Poirot, M. Hattori, C. Benoist, D. Mathis, *J. Exp. Med.*, 2003, **198**(10), 1527-1537.

²¹ M. Woo, *Endocrinologie – Conférences scientifiques*, 2004, **4**(3).

²² J.W. Yoon, H.S. Jun, P. Santamaria, *Autoimmunity*, 1998, **27**(2), 109-122.

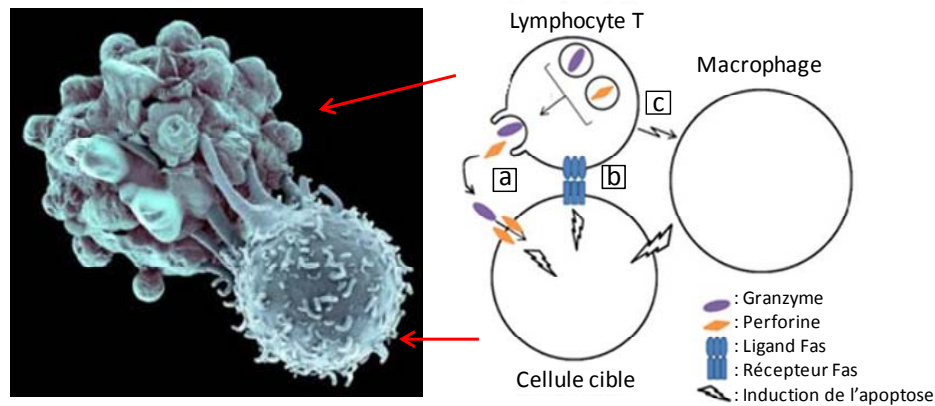


Figure 1.8 : Induction de l'apoptose de cellules cibles par les lymphocytes T via l'entrée de sérine estérase (granzyme) au travers d'un canal formé de perforine (a), l'interaction entre un ligand exprimé par les lymphocytes T et un récepteur exprimé par la cellule cible (b) ou l'activation de macrophages digérant les pathogènes ou activant d'autres lymphocytes T (c)²³.

Le diabète de type 1 est donc une maladie très complexe dont les causes peuvent être multiples mais dont les deux principaux facteurs semblent être ceux d'ordre génétique ou surtout environnemental. Ainsi, plusieurs études épidémiologiques ont mis en relation l'incidence du diabète insulino-dépendant et l'infection par des entérovirus²⁴ et rotavirus^{25,26}. Certaines substances chimiques peuvent également induire la maladie, comme la streptozotocine chez le rat ou le vacor chez l'homme, par la génération de radicaux libres, la modification de l'ADN ou l'inhibition du transport actif de calcium^{27,28}. Le facteur génétique fait également l'objet de plusieurs études notamment via l'expérimentation sur la souris NOD (non-obese diabetic) présentant des similitudes aux niveaux génétique et physiologique avec le diabète de type 1 chez l'homme. Ces études ont permis de découvrir certains gènes susceptibles de provoquer la maladie, localisés sur des loci (emplacements spécifiques et invariables sur un chromosome, où peut se situer un gène) nommés *idd* (*insulin-dependent diabetes genes*)²⁹.

²³ A. Grimaldi, « Traité de diabétologie », 2005, Ed. Flammarion – Médecine-Sciences, 117-118 (figure modifiée à partir d'une image originale).

²⁴ J. Fohlman, G. Friman, *Ann. Med.*, 1993, **25**(6), 569-574.

²⁵ M.C. Honeyman, B.S. Coulson, N.L. Stone, S.A. Gellert, P.N. Goldwater, C.E. Steele, J.J. Couper, B.D. Tait, P.G. Colman, L.C. Harrison, *Diabetes*, 2000, **49**, 1319-1324.

²⁶ M.C. Honeyman, N.L. Stone, L.C. Harrison, *Mol. Med.*, 1998, **4**, 231-239.

²⁷ J.W. Yoon, C.J. Kim, R.G. McArthur, *Clin. Invest. Med.*, 1987, **10**(5), 457-469.

²⁸ L.V. Miller, J.D. Stokes, C. Silpipat, *Diabetes Care*, 1978, **1**(2), 73-76.

²⁹ L.M. Maier, L.S. Wicker, *Curr. Opin. Immunol.*, 2005, **17**, 601-608.

1.2.5. Les conséquences du diabète

A terme, les complications liées au diabète peuvent s'avérer dramatiques et mener jusqu'au décès du patient¹ (*figure 1.9*) :

- Les complications cardiovasculaires, une des principales causes de mortalité et de handicap chez les diabétiques, parmi lesquelles nous pouvons citer l'artériopathie, les AVC (accidents vasculaires cérébraux), l'angine de poitrine ou l'infarctus du myocarde ;
- Les complications rénales (néphropathie) comme l'insuffisance rénale chronique résultant de dommages aux vaisseaux sanguins des reins qui ne parviennent plus à filtrer les protéines ;
- Les complications neurologiques telles que la neuropathie affectant le système nerveux périphérique, dont peuvent résulter des douleurs ou une perte de sensibilité au niveau des pieds principalement, pouvant mener à des infections plus ou moins sévères et à des amputations. Des problèmes de digestion, d'impuissance, d'impotence, etc... peuvent également se manifester ;
- Les complications oculaires comme la rétinopathie, provoquée également par l'obstruction de vaisseaux sanguins et pouvant mener jusqu'à la cécité.

De manière générale, le risque de décès d'un diabétique est au minimum deux fois plus élevé que celui d'une personne ne présentant pas cette pathologie¹.

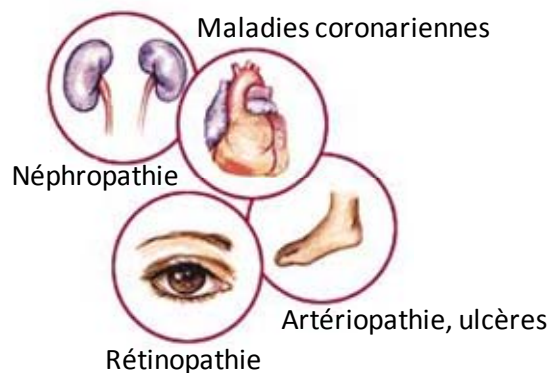


Figure 1.9 : Diverses complications provoquées par le diabète³⁰.

³⁰ <http://www.kidcyber.com.au/topics/diabetes2.htm>, consulté le 26 août 2013 (figure modifiée à partir d'une image originale).

1.2.6. Les traitements

1.2.6.1. L'insulinothérapie

Le traitement le plus couramment utilisé à l'heure actuelle consiste en une administration discontinue d'insuline par injection sous-cutanée à l'aide d'une seringue ou d'un stylo-injecteur, combinée à une alimentation saine et à une activité physique régulière. En effet, il a été démontré qu'une *meilleure forme physique permettait de maintenir un meilleur contrôle de la glycémie*³¹. Dès lors que l'injection sous-cutanée rebute certains patients, de nouveaux moyens d'administration de l'insuline ont récemment été développés, tels que des patchs ou encore des inhalateurs. Ce traitement nécessite un régime draconien et une très grande attention de la part du patient qui risque à tout instant l'hyper- ou l'hypoglycémie. La pompe à insuline possède l'avantage de réduire cette demande d'attention. Elle possède un mécanisme relié à l'organisme, lui permettant de connaître à tout moment sa glycémie. Quand le corps nécessite de l'insuline, la pompe est enclenchée de façon à subvenir aux besoins du malade (*figure 1.10*).



Figure 1.10 : L'insulinothérapie par injection sous-cutanée via la seringue (A), le stylo injecteur (B) et la pompe à insuline (C)³².

Depuis le Prix Nobel de Banting et Macleod, l'insuline est devenue un médicament commercialisé. Au début, il s'agissait d'extrait de pancréas de bœuf ou de porc, imparfaitement purifié et administré via 3 ou 4 injections quotidiennes. Ce n'est

³¹ S.F. Michaliszyn, G.Q. Shaibi, L. Quinn, C. Fritschi, M.S. Faulkner, *Pediatr. Diabetes*, 2009, 10(6), 389-394.

³² <http://vulgariz.com/medecine-sante/diabete/un-pancreas-artificiel-pour-diabetiques/>, consulté le 27 août 2013 (figure modifiée à partir d'une image originale).

qu'en 1955, avec la description de la structure chimique de l'insuline (*figure 1.5*) par Frederick Sanger³³, biochimiste anglais récompensé du Prix Nobel de chimie en 1958, que l'on découvre que l'insuline est particulière à l'espèce, les insulines de porc et de bœuf différant de respectivement un et trois acides aminés par rapport à l'insuline humaine. De plus, en 1960, Rosalyn Yalow et Solomon Berson, médecins américains, mettent au point la méthode de dosage radio-immunologique³⁴ permettant de démontrer que les impuretés sont responsables des réactions allergiques observées chez les patients, ainsi que de la formation d'anticorps contre l'insuline. En 1965, Panayotis G. Katsoyannis développa la synthèse chimique de l'insuline³⁵ et, 15 ans plus tard, se distinguent différentes techniques pour la production d'insuline humaine :

- **L'hémisynthèse** permettant la conversion enzymatique de l'insuline porcine pour la faire correspondre à l'insuline humaine. Cette méthode de synthèse n'est plus utilisée à ce jour ;
- La **biosynthèse** où un plasmide recombiné avec une séquence d'ADN codant est inséré dans un microorganisme dont la multiplication en culture permet de produire l'hormone qui est ensuite purifiée.

Cette méthode de préparation est la plus couramment utilisée de nos jours et permet d'obtenir divers types d'insuline³⁶, généralement classés selon leurs cinétiques d'action. Les « **analogues rapides** » sont ainsi des insulines modifiées par un changement au niveau de la séquence des acides aminés, entraînant une cinétique d'action très rapide et un effet peu prolongé par élimination des interactions hydrophobes. La cinétique d'action de l'insuline peut également être adaptée par mélange avec un excipient qui va modifier sa solubilité pour obtenir des **insulines à action intermédiaire**. Enfin, les « **analogues retard** », obtenus de la même manière que les analogues rapides, permettent d'obtenir une action prolongée et de réduire le nombre d'injections mais apportent un contrôle glycémique moins efficace. Le *tableau 1.1* répertorie de manière non-exhaustive les différents types d'insuline et leurs propriétés cinétiques. A l'heure actuelle, l'insuline que les patients s'administrent est généralement composée d'un mélange des diverses préparations citées afin de bénéficier d'un effet hypoglycémiant rapide tout en étant prolongé dans le temps.

³³ A.P. Ryle, F. Sanger, L.F. Smith, R. Kitai, *Biochem J.*, 1955, **60(4)**, 541-556.

³⁴ R.S. Yalow, S.A. Berson, *J. Clin. Invest.*, 1960, **39**, 1157-1175.

³⁵ P.G. Katsoyannis, A. Tometsko, *Proc. Natl.Acad. Sci. USA.*, 1966, **55(6)**, 1554-1561.

³⁶ M. Lepore, S. Pampanelli, C. Fanelli, F. Porcelatti, L. Bartocci, A. Di Vincenzo, C. Cordoni, E. Costa, P. Brunetti, G.B. Bolli, *Diabetes*, 2000, **49**, 2142-2148.

Tableau 1.1 : Les différents types d'insuline proposés à la commercialisation et leurs propriétés cinétiques³⁷.

Types d'insuline	Délai d'action	Activité maximale	Durée d'action	Moment d'injection
Action rapide				
				Avant les repas
Lispro	0 à 15 min	1 à 2 h	3 à 5 h	0 à 15 min
Aspart	10 à 20 min	1 à 3 h	3 à 5 h	0 à 10 min
Insuline humaine	30 min à 1 h	2 à 3 h	3 à 6 h	30 à 45 min
Action intermédiaire				
NPH	2 à 4 h	7 à 8 h	10 à 12 h	Le matin et/ou
Insuline Zinc	4 à 6 h	6 à 12 h	18 à 24 h	le soir
Action prolongée ou « retard »				
Insuline glargine	1,5 à 4 h	/	24 heures	1x/jour

L'insulinothérapie est donc le traitement le plus répandu mais n'est pas sans contraintes et ne solutionne en aucun cas le problème de manière définitive. Le patient se voit obligé d'être particulièrement attentif à son régime alimentaire et de respecter scrupuleusement les moments d'injection. Comme déjà évoqué, les dispositifs tels que les pompes à insuline limitent cette contrainte mais ne sont également pas sans inconvénients. En effet, avoir un tel dispositif collé en permanence à la peau n'est pas des plus agréables et peut s'avérer contraignant au quotidien, aussi bien miniaturisé soit-il. L'injection d'insuline peut également provoquer certains effets indésirables tels que des réactions allergiques, une prise de poids due à l'action anabolisante de l'insuline ou encore un coma par hypoglycémie, pouvant mener jusqu'à la mort.

1.2.6.2. La greffe de pancréas ou d'îlots de Langerhans

Une première alternative est la greffe de pancréas, débutée en 1966 à l'Université du Minnesota et réalisée à partir de donneurs cadavériques avec bien peu de succès et un taux de survie des patients très faible³⁸. Depuis, ce sont plus de 23000 personnes à travers le monde qui ont pu bénéficier de cette transplantation,

³⁷ Plate-forme de formation de la SSPF (Société Scientifique des Pharmaciens Francophones), <http://ssp.f.claroline.com/index.php>, consulté le 29 août 2013.

³⁸ W.D. Kelly, R.C. Lillehei, F.K. Merkel, Y. Idezuki, F.C. Goetz, *Surgery*, 1967, **61(6)**, 827-837.

généralement réalisée de manière conjointe avec la greffe de reins, dû à leur dysfonctionnement provoqué par le diabète, avec un taux de survie du greffon un an après opération atteignant 85% en 2003, selon l'IPTR (International Pancreas Transplant Registry)³⁹. Néanmoins, si la transplantation d'organe entier améliore la qualité de vie⁴⁰, plusieurs risques, parfois mortels, restent présents tels que des infections bactériennes ou virales, des anastomoses et des thromboses⁴¹. Une méthode moins invasive et susceptible de restaurer une normoglycémie sans avoir à assurer la vascularisation d'un organe entier est la transplantation de cellules β ou d'îlots de Langerhans. En effet, la masse des îlots, distribués aléatoirement dans le pancréas, ne correspond qu'à 1% de la masse totale de l'organe. Ainsi, en 2000, sept patients ayant subi une allogreffe d'îlots de Langerhans associée à la prise d'un mélange d'immunosuppresseurs maintinrent une indépendance à l'insuline pendant une période allant de trois mois à un an⁴². Cinq ans plus tard, le groupe ayant appliqué ce protocole, appelé « protocole d'Edmonton », observèrent 58% d'indépendance à l'insuline un an après la dernière opération⁴³. Une étude internationale menée en 2006 sur la reproductibilité de ce protocole a mis en évidence que la transplantation d'îlots pouvait restaurer la production d'insuline et le contrôle de la glycémie chez les diabétiques de type 1 mais que l'indépendance à l'insuline ne durait guère plus d'une année⁴⁴. De plus, la disponibilité des îlots est limitée et un patient a généralement besoin de plus d'un donneur³⁴. Ces problèmes de disponibilité et de perte de fonction proviennent du fait que les îlots ne peuvent proliférer et qu'un manque d'oxygène et de nutriments des îlots implantés peut engendrer la mort des cellules β ⁴⁵. La transplantation d'organe, d'îlots ou de cellules β nécessite également de suivre un régime médicamenteux immunosuppresseur indispensable à la réussite de la transplantation, se devant d'être suivi indéfiniment et présentant de nombreux et

³⁹ A.C. Gruessner, D.E.R. Sutherland, *Clin. Transplant.*, 2005, **19**, 433-455.

⁴⁰ D.M. Nathan, H. Fogel, D. Norman, P.S. Russell, N. Tolkoff-Rubin, F.L. Delmonico, H. Auchincloss Jr., J. Camuso, A.B. Cosimi, *Transplantation*, 1991, **52**, 85-91.

⁴¹ R.W.G. Gruessner, D.E.R. Sutherland, C. Troppmann, E. Benedetti, N. Hakim, D.L. Dunn, A.C. Gruessner, *J. Am. Coll. Surg.*, 1997, **185**, 128-144.

⁴² 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, *N. Engl. J. Med.*, 2000, **343**, 230-238.

⁴³ E.A. Ryan, B.W. Paty, P.A. Senior, D. Bigam, E. Alfadhli, N.M. Kneteman, J.R.T. Lakey, A.M.J. Shapiro, *Diabetes*, 2005, **54**, 2060-2069.

⁴⁴ A.M.J. Shapiro, C. Ricordi, B.J. Hering, H. Auchincloss, R. Lindblad, R.P. Robertson, A. Secchi, M.D. Brendel, T. Berney, D.C. Brennan, E. Cagliero, R. Alejandro, E.A. Ryan, B. DiMercurio, P. Morel, K.S. Polonsky, J.-A. Reems, R.G. Bretzel, F. Bertuzzi, T. Froud, R. Kandaswamy, D.E.R. Sutherland, G. Eisenbarth, M. Segal, J. Preiksaitis, G.S. Korbitt, F.B. Barton, L. Viviano, V. Seyfert-Margolis, J. Bluestone, J.R.T. Lakey, *N. Engl. J. Med.*, 2006, **355**, 1318-1330.

⁴⁵ J. Beck, R. Angus, B. Madsen, D. Britt, B. Vernon, K.T. Nguyen, *Tissue Eng.*, 2007, **13(3)**, 589-599.

sévères effets secondaires^{46,47,48}, ce qui conduit généralement les diabétiques à opter pour l'insulinothérapie.

Diverses stratégies pour solutionner le problème de disponibilité des îlots ou cellules β sont investiguées :

- La xénogreffe de cellules de porc^{49,50,51}, présentant des risques de rejet de la part du système immunitaire de l'organisme hôte ou de transmission d'un pathogène du porc à l'homme⁵² ;
- La greffe de cellules souches adultes, nécessitant de les transformer en cellules sécrétrices d'insuline. Ainsi, en 2009, Burt *et al*⁵³ ont réalisé une autogreffe de cellules souches prélevées dans la moelle osseuse de 23 patients atteints du diabète de type 1 rendus insulino-indépendants. Les travaux de Kuwabara⁵⁴ mettent eux en évidence le traitement de rats insulino-dépendants par la greffe de cellules souches neurales transformées en cellules pancréatiques ;
- La greffe de cellules souches embryonnaires^{55,56}.

Ces stratégies peuvent être combinées à la conception d'une matrice ou bouclier protecteur pour encapsuler les îlots ou cellules β et jouer le rôle de membrane semi-perméable, empêchant l'entrée des défenseurs immunitaires tout en autorisant la

⁴⁶ B. Ludwig, A. Rotem, J. Schmid, G.C. Weir, C.K. Colton, M.D. Brendel, T. Neufeld, N.L. Block, K. Yavriyants, A. Steffen, S. Ludwig, T. Chavakis, A. Reichel, D. Azarov, B. Zimmermann, S. Maimon, M. Balyura, T. Rozenshtein, N. Shabtay, P. Vardi, K. Bloch, P. de Vos, A.V. Schally, S.R. Bornstein, U. Barkai, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012, **109**, 5022-5027.

⁴⁷ E.A. Ryan, J.R.T. Lakey, R.V. Rajotte, G.S. Korbutt, T. Kin, S. Imes, A. Rabinovitch, J.F. Elliott, D. Bigam, N.M. Kneteman, G.L. Warnock, I. Larsen, A.M.J. Shapiro, *Diabetes*, 2001, **50**, 710-719.

⁴⁸ A. Hyder, C. L. Laue, J. Schrezenmeir, *Toxicol. In Vitro*, 2005, **19**, 541-546.

⁴⁹ S.A. Rogers, F. Chen, M. Talcott, M.R. Hammermann, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2004, **286**, E502-E509.

⁵⁰ D. Tchorsh-Yutsis, G. Hechet, A. Aronovich, E. Shezen, Y. Klionsky, C. Rosen, R. Bitcover, S. Eventov-Friedman, H. Katchman, S. Cohen, O. Tal, O. Milstein, H. Yagita, B.R. Blazar, Y. Reisner, *Diabetes*, 2009, **58**, 1585-1594.

⁵¹ G. Hecht, S. Eventov-Friedman, C. Rosen, E. Shezen, D. Tchorsh, A. Aronovich, E. Freud, H. Golan, R. El-Hasid, H. Katchman, B.J. Hering, A. Zung, Z. Kra-Oz, P. Shaked-Mishan, A. Yusim, A. Shtabsky, P. Idelevitch, A. Tobar, A. Harmelin, E. Bachar-Lustig, Y. Raisner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009, **106**(21), 8659-8664.

⁵² K. Paradis, G. Langford, Z. Long, W. Heneine, P. Sansdtrom, W.M. Switzer, L.E. Chapman, C. Lockey, D. Onions, The XEN 111 Study Group, E. Otto, *Science*, 1999, **285**, 1236-1241.

⁵³ C.E.B. Couri, M.C.B. Oliveira, A.B.P.L. Stracieri, D.A. Moraes, F. Pieroni, G.M.N. Barros, M.I.A. Madeira, K.C.R. Malmegrim, M.C. Foss-Freitas, B.P. Simões, E.Z. Martinez, M.C. Foss, R.K. Burt, J.C. Voltarelli, *JAMA*, 2009, **301**(15), 1573-1579.

⁵⁴ T. Kuwabara, M. Asashima, *J. Mol. Cell Biol.*, 2012, **4**(3), 133-139.

⁵⁵ K.A. D'Amour, A.G. Bang, S. Eliazer, O.G. Kelly, A.D. Agulnick, N.G. Smart, M.A. Moorman, E. Kroon, M.K. Carpenter, E.E. Baetge, *Nature Biotechnology*, 2006, **24**, 1392-1401.

⁵⁶ S. Assady, G. Maor, M. Amit, J. Itskovitz-Eldor, K.L. Skorecki, M. Tzukerman, *Diabetes*, 2001, **50**, 1691-1697.

diffusion des nutriments et métabolites. Cette matrice permettrait donc de supprimer la prise de médicaments immunosuppresseurs et formerait, en combinaison avec les cellules encapsulées, un « organe artificiel » régulant la glycémie des patients pour les rendre insulino-indépendants.

1.3. L'encapsulation cellulaire : vers la création d'un pancréas artificiel

La transplantation de cellules β pour le traitement du diabète de type 1 constitue l'alternative la plus prometteuse à l'insulinothérapie, contraignante au quotidien pour les patients et ne résolvant pas le problème de manière radicale et définitive. Néanmoins, cette procédure est limitée par le nombre réduit de donneurs compatibles et par l'obligation pour le patient transplanté de suivre un régime médicamenteux immunosuppresseur pour éviter le rejet. L'exploitation des cellules souches est un domaine en plein essor et pourrait à terme constituer la solution pour les diabétiques. En parallèle, les recherches portant sur la conception d'organes artificiels sont d'un grand intérêt pour la thérapie cellulaire visant à substituer l'organe déficient par des cellules étrangères aux fonctions particulières. Cette notion d'organe artificiel englobe non seulement les cellules transplantées mais également l'édifice ou la matrice qui va relier les différentes cellules entre elles et à l'organisme et va les protéger. Cette matrice se base sur le concept d'immuno-isolation illustré par une membrane poreuse semi-perméable (*figure 1.11*) remplissant certains critères essentiels :

- La matrice doit maintenir la viabilité et l'activité des cellules encapsulées et les protéger de tout stress mécanique. Elle ne doit pas non plus provoquer de réponses inflammatoires chez le patient implanté ;
- Elle doit également permettre la diffusion des nutriments essentiels (oxygène, sucre, vitamines, acides aminés) et des métabolites et substances sécrétés par les cellules ;
- Elle doit enfin empêcher les cellules inflammatoires et les anticorps de reconnaître les cellules encapsulées.

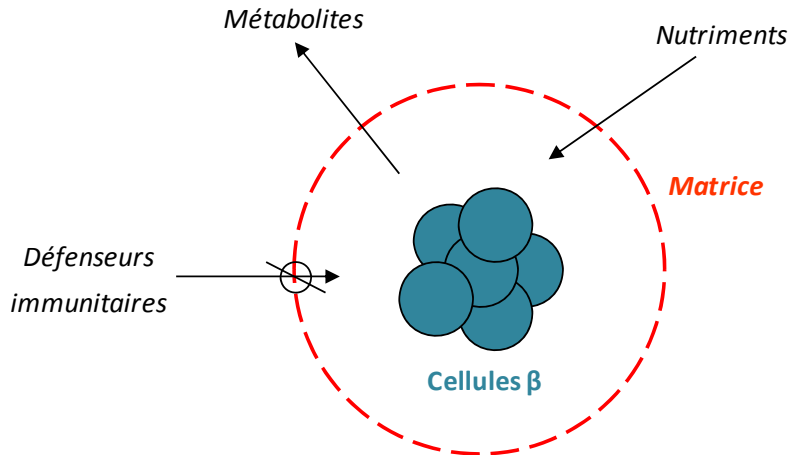


Figure 1.11 : Représentation du concept d'immuno-isolation de cellules encapsulées au sein d'une matrice poreuse biocompatible permettant la diffusion des nutriments et des substances sécrétées tout en évitant l'attaque des cellules du système immunitaire⁵⁷.

C'est en 1933 que l'idée de transplanter des cellules encapsulées fut imaginée. En effet, Vincenzo Bisceglie⁵⁸ étudia les effets de l'absence de vascularisation sur la survie de cellules tumorales de souris encapsulées dans une membrane de nitrocellulose. C'est Agire *et al*⁵⁹, en 1943, qui ont introduit le concept d'immuno-isolation par l'étude de la technique de la chambre de diffusion, consistant en deux membranes poreuses entre lesquelles se trouvaient des cellules mais ce n'est qu'en 1980 que Lim et Sun exposèrent la notion de membrane semi-perméable en encapsulant des îlots de Langerhans dans des capsules d'alginate⁶⁰. Depuis lors, de nombreuses variétés de méthodes, de types de matériaux et d'applications ont été imaginés pour l'encapsulation de cellules au sein de matrices poreuses.

1.3.1. Les méthodes d'encapsulation et leurs applications

En 1995, Galletti⁶¹ répertoria les maladies pouvant être traitées à l'aide d'organes artificiels et depuis, nombre d'entre elles ont fait l'objet d'études : le diabète insulino-dépendant^{46,62}, la maladie de Parkinson⁶³, la maladie d'Alzheimer⁶⁴, l'anémie⁶⁵

⁵⁷ G. Orive, A.R. Gascón, R.M. Hernández, M. Igartua, J.L. Pedraz, *Trends Pharmacol. Sci.*, 2003, **24**, 207-210.

⁵⁸ V. Bisceglie, *Ztschr. Krebsforsch.*, 1933, **40**, 122-140.

⁵⁹ R.T. Prehn, J.M. Weaver, G.H. Algire, *J. Natl. Cancer Inst.*, 1954, **15(3)**, 509-517.

⁶⁰ F. Lim, A.M. Sun, *Science*, 1980, **21**, 908-910.

⁶¹ P.M. Galletti, P. Aebischer, M.J. Lysaght, *ASAIO Journal*, 1995, **41**, 49-57.

⁶² P. de Vos, A.F. Hamel, K. Tatarkiewicz, *Diabetologia*, 2002, **45(2)**, 159-173.

ou encore l'hémophilie⁶⁶. Mais d'autres types de cellules encapsulées dans des réseaux poreux peuvent démontrer toute leur utilité dans un large domaine d'applications. Ainsi, des levures, bactéries, (micro)algues et autres cellules végétales encapsulées sont utilisées en tant que bioréacteur^{5,6,67,68,69,70,71}, biosenseur^{72,73,74,75} ou comme système de dépollution^{76,77,78}.

La variété d'applications et de systèmes cellulaires développés durant les dernières décennies dans le domaine de l'encapsulation est tout aussi large que la gamme de supports ayant été investigués pour maintenir et prolonger la viabilité, l'activité et les fonctionnalités du matériel biologique encapsulé⁴. Aux premières membranes semi-perméables de Bisceglie⁵⁸ et Agire⁵⁹ ont succédé des matrices à base de biopolymères tels que l'agar⁷⁹, l'agarose^{80,81,82}, le chitosan^{83,84,85,86}, le collagène⁸⁷, la fibrine⁸⁸ ou l'alginate^{89,90}, et de polymères synthétiques⁹¹ comme le polyacrylamide, le

⁶³ M. Ming, X. Li, X. Fan, D. Yang, L. Li, S. Chen, Q. Gu, W. Le, *J. Transl. Med.*, 2009, **7**:53, DOI : 10.1186/1479-5876-7-53.

⁶⁴ C. Spuch, D. Antequera, A. Portero, G. Orive, R.M. Hernández, J.A. Molina, F. Bermejo-Pareja, J.L. Pedraz, E. Carro, *Biomaterials*, 2010, **31**, 5608-5618.

⁶⁵ C. Rinsch, P. Dupraz, B.L. Schneider, N. Déglon, P.H. Maxwell, P.J. Ratcliffe, P. Aebischer, *Kidney Int.*, 2002, **62**, 1395-1401.

⁶⁶ P.L. Chang, J.M. Van Raamsdonk, G. Hortelano, S.C. Barsoum, N.C. MacDonald, T.L. Stockley, *Trends Biotechnol.*, 1999, **17**, 78-83.

⁶⁷ M. Gavrilescu, Y. Christi, *Biotechnol. Adv.*, 2005, **23**, 471-499.

⁶⁸ K.E. Apt, P.W. Behrens, *J. Phycol.*, 1999, **35**, 215-226.

⁶⁹ S. Charlet, F. Gillet, M.L. Villareal, J.N. Barbotin, M.A. Fliniaux, J.E. Nava-Saucedo, *Plant. Physiol. Biochem.*, 2000, **38**, 875-880.

⁷⁰ J.C. Rooke, A. Léonard, H. Sarmento, C.F. Meunier, J.-P. Descy, B.-L. Su, *J. Mater. Chem.*, 2011, **21**, 951-959.

⁷¹ C.F. Meunier, J.C. Rooke, A. Léonard, H. Xie, B.-L. Su, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 3843-3859.

⁷² S. Daunert, G. Barrett, J.S. Feliciano, R.S. Shetty, S. Shrestha, W. Smith-Spencer, *Chem. Rev.*, 2000, **100**, 2705-2738.

⁷³ M. Park, S.-L. Tsai, W. Chen, *Sensors*, 2013, **13**, 5777-5795.

⁷⁴ Y. Lei, W. Chen, A. Mulchandani, *Anal. Chim. Acta.*, 2006, **568**, 200-210.

⁷⁵ J.R. Premkumar, O. Lev, R. Rosen, S. Belkin, *Adv. Mater.*, 2001, **13**, 1773-1775.

⁷⁶ M. Campàs, R. Carpentier, R. Rouillon, *Biotechnol. Adv.*, 2008, **26**, 370-378.

⁷⁷ T. Branyik, G. Kuncova, J. Paca, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2000, **54**, 168-172.

⁷⁸ C.J. Cunningham, I.B. Ivshina, V.I. Lozinsky, J.C. Philip, *Int. Biodeter. Biodegr.*, 2004, **54**, 309-332.

⁷⁹ M.E. Stefanova, A.I. Tonkova, E.P. Dobrova, D.I. Spasova, *Folia Microbiol.*, 1998, **43**(1), 42-46.

⁸⁰ H. Iwata, H. Amemiya, T. Matsuda, H. Takano, R. Hayashi, T. Akutsu, *Diabetes*, 1989, **38**, 224-225.

⁸¹ S. Lahooti, M.V. Sefton, *Biomaterials*, 2000, **21**, 987-995.

⁸² G. Karoubi, M.L. Ormiston, D.J. Stewart, D.W. Courtman, *Biomaterials*, 2009, **30**, 5445-5455.

⁸³ B.A. Zielinski, P. Aebischer, *Biomaterials*, 1994, **15**(13), 1049-1056.

⁸⁴ A.A. Hardikar, M.V. Risbud, R.R. Bhonde, *J. Biosci.*, 1999, **24**(3), 371-376.

⁸⁵ K. Aiedeh, M.O. Taha, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2001, **13**, 159-168.

⁸⁶ C.L. Hastrings, H.M. Kelly, M.J. Murphy, F.P. Barry, F.J. O'Brien, G.P. Duffy, *J. Control. Release*, 2012, **161**, 73-80.

⁸⁷ B.P. Chan, T.Y. Hui, C.W. Yeung, J. Li, I. Mo, G.C. Chan, *Biomaterials*, 2007, **28**, 4652-4666.

⁸⁸ J. Liu, H. Zhou, M.D. Weir, H.H. Xu, Q. Chen, C.A. Trotman, *Tissue Eng. A*, 2012, **18**, 2303-2314.

⁸⁹ S. Sakai, T. Ono, H. Ijima, K. Kawakami, *Biomaterials*, 2002, **23**, 4177-4183.

⁹⁰ T. Joki, M. Machluf, A. Atala, J. Zhu, N.T. Seyfried, I.F. Dunn, T. Abe, R.S. Carroll, P. McL. Black, *Nature Biotechnol.*, 2001, **19**(1), 35-39.

⁹¹ I. Gill, A. Ballesteros, *Trends Biotechnol.*, 2000, **18**, 282-296.

polyuréthane ou le polyéthylène glycol (PEG)⁹², dont les conditions de synthèse, impliquant l'utilisation de solvants toxiques, génèrent une perte de viabilité des cellules encapsulées. Ces dernières années, tous ces polymères ont fait l'objet de recherches dans le cadre de la thérapie cellulaire^{93,94}. Cependant, actuellement, l'alginate constitue le biomatériau le plus utilisé dans le domaine de l'encapsulation cellulaire de manière générale et dans celui du développement de pancréas ou d'îlot de Langerhans artificiel en particulier^{95,96,97,98,99}, principalement à cause de sa biocompatibilité (à condition d'être parfaitement purifié¹⁰⁰) et de ses méthodes de préparation simples et rapides¹⁰¹. L'alginate est un polysaccharide extrait d'algues brunes composé d'acide mannuronique (unités M) et guluronique (unités G) subissant une gélification ionotrope au contact de cations divalents pour se présenter sous la forme de microcapsule sphérique (voir *point 4.2.1*). La proportion d'unités M et d'unités G dépend de la source d'algue utilisée pour l'extraction et ce ratio permet de moduler les propriétés mécaniques du matériau, une grande proportion en unités G résultant en une structure finale plus rigide¹⁰². Récemment, une étude de Jacobs-Tulleneers-Thevissen *et al.*¹⁰³ a démontré que des îlots humains encapsulés dans des capsules d'alginate préservaient toutes leurs fonctionnalités une fois implantés dans la cavité péritonéale de souris mais également chez un humain atteint de diabète de type 1. Cette observation constitue une avancée significative dans le domaine car si de nombreuses études menées chez des rongeurs se sont avérées prometteuses, il y a eu bien peu de succès cliniques chez l'homme^{104,105}. En effet, à l'instar des autres polymères cités ci-dessus, l'alginate possède une faible résistance mécanique, menant à

⁹² S.B. Anderson, C. Lin, D.V. Kuntzler, K.S. Anseth, *Biomaterials*, 2011, **32**, 3564-3574.

⁹³ P. de Vos, H.A. Lazarjani, D. Poncelet, M.M. Faas, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2013, **In Press**, DOI: 10.1016/j.addr.2013.11.005.

⁹⁴ E. Santos, J.L. Pedraz, R.M. Hernández, G. Orive, *J. Control. Release*, 2013, **170**, 1-14.

⁹⁵ V. Vaithilingam, B.E. Tuch, *Rev. Diabet. Stud.*, 2011, **8**, 51-67.

⁹⁶ G.C. Weir, *Diabetologia*, 2013, **56**, 1458-1461.

⁹⁷ J.A.M. Steele, J.-P. Hallé, D. Poncelet, R.J. Neufeld, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2013, **In Press**, DOI: 10.1016/j.addr.2013.09.015.

⁹⁸ D. Dufrane, P. Gianello, *World J. Gastroenterol.*, 2012, **18(47)**, 6885-6893.

⁹⁹ D. Dufrane, M. van Steenberghe, R.-M. Goebeels, A. Saliez, Y. Guiot, P. Gianello, *Biomaterials*, 2006, **27**, 3201-3208.

¹⁰⁰ G. Langlois, J.Dusseault, S. Bilodeau, S.K. Tam, D. Magassouba, J.-P. Hallé, *Acta Biomater.*, 2009, **5**, 3433-3440.

¹⁰¹ E. Santos, J. Zarate, G. Orive, R.M. Hernández, J.L. Pedraz, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2010, **670**, 5-21.

¹⁰² H. Uludag, P. de Vos, P.A. Tresco, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 2000, **42**, 29-64.

¹⁰³ D. Jacobs-Tulleneers-Thevissen, M. Chintinne, Z. Ling, P. Gillard, L. Schoonjans, G. Delvaux, B.-L. Strand, F. Gorus, B. Keymeulen, D. Pipeleers, *Diabetologia*, 2013, **56(7)**, 1605-1614.

¹⁰⁴ R. Calafiore, G. Basta, G. Luca, A. Lemmi, M.P. Montanucci, G. Calabrese, L. Racanicchi, F. Mancuso, P. Brunetti, *Diabetes Care*, 2006, **29(1)**, 137-138.

¹⁰⁵ B.E. Tuch, G.W. Keogh, L.J. Williams, W. Wu, J.L. Foster, V. Vaithilingam, R. Philips, *Diabetes Care*, 2009, **32(10)**, 1887-1889.

une rupture du matériau et un taux de fuite des cellules encapsulées¹⁰⁶. De plus, les capsules possèdent une porosité trop élevée que pour garantir une immunoprotection efficace⁹³. Ces propriétés peuvent toutefois être modulées en variant la concentration de départ en polymère ou en modifiant le ratio des monomères¹⁰⁷. Les cations utilisés pour la gélification ont également une influence sur la résistance mécanique¹⁰⁸, la porosité¹⁰⁹ ou la biocompatibilité¹¹⁰ des capsules. Toutefois, la méthode la plus utilisée à l'heure actuelle pour adapter les propriétés du matériau est le revêtement de la surface chargée négativement de l'alginate par des polymères cationiques, principalement d'origine synthétique, tels que la poly-L-lysine (PLL)¹¹¹ ou la poly-L-ornithine (PLO)¹¹² mais également le chitosan¹¹³ ou l'agarose¹¹⁴. Si ce procédé est censé permettre une meilleure immuno-isolation des cellules encapsulées en réduisant la perméabilité des capsules, il est fréquemment observé la formation d'un tissu fibreux autour des capsules implantées¹¹⁵ et la poly-L-lysine, le polycation le plus étudié, est clairement reconnue comme immunogène¹¹⁶. Enfin, les chercheurs se concentrent de plus en plus sur les interactions matrices-cellules encapsulées^{94,117} et sur la manière dont la surface des matériaux peut fournir des signaux aux cellules, le but étant d'améliorer leurs fonctionnalités et de contrôler leur comportement^{94,118,119}. De plus, l'adhésion cellulaire à la matrice permet d'améliorer la résistance mécanique des capsules^{94,118,120}. Ces recherches sont menées en modifiant la surface des matériaux à l'aide de molécules organiques et en étudiant la réponse des cellules encapsulées^{94,121}.

¹⁰⁶ R.M. Hernández, G. Orive, A. Murua, J.L. Pedraz, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2010, **62**, 711-730.

¹⁰⁷ A. King, S. Sandler, A. Andersson, *J. Biomed. Mater. Res.*, 2001, **57(3)**, 374-383.

¹⁰⁸ Y. Teramura, O.P. Oommen, J. Olerud, J. Hilborn, B. Nilsson, *Biomaterials*, 2013, **34**, 2683-2693.

¹⁰⁹ P. de Vos, A. Andersson, S.K. Tam, M.M. Faas, J.-P. Hallé, *Immunol. Endocr. Metab. Agents Med. Chem.*, 2006, **6(2)**, 139-153.

¹¹⁰ S.A. Saffley, H. Cui, S. Cauffiel, C. Tucker-Burden, C.J. Weber, *J. Diabetes Sci. Technol.*, 2008, **2(5)**, 760-767.

¹¹¹ S.K. Tam, S. Bilodeau, J. Dusseault, G. Langlois, J.P. Hallé, L.H. Yahia, *Acta Biomater.*, 2011, **7**, 1683-1692.

¹¹² G. Basta, P. Sarchielli, G. Luca, L. Racanicchi, C. Nastruzzi, L. Guido, F. Mancuso, G. Macchiarulo, G. Calabrese, P. Brunetti, R. Calafiore, *Transpl. Immunol.*, 2004, **13**, 289-296.

¹¹³ M. Sobol, A. Bartkowiak, B. de Haan, P. de Vos, *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2013, **101(7)**, 1907-1914.

¹¹⁴ G. Orive, R.M. Hernández, A.R. Gascón, M. Igartua, A. Rojas, J.L. Pedraz, *Biotechnol. Bioeng.*, 2001, **76**, 285-294.

¹¹⁵ J.M. Anderson, A. Rodriguez, D.T. Chang, *Semin. Immunol.*, 2008, **20**, 86-100.

¹¹⁶ B.L. Strand, L. Ryan, P.I. Veld, B. Kulseng, A.M. Rokstad, G. Skjåk-Braek, T. Espevik, *Cell Transplant.*, 2001, **10**, 263-275.

¹¹⁷ R.W. Sands, D.J. Mooney, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2007, **18**, 448-453.

¹¹⁸ G. Orive, M. De Castro, H.-J. Kong, R.M. Hernández, S. Ponce, D.J. Mooney, J.L. Pedraz, *J. Control. Release*, 2009, **135**, 203-210.

¹¹⁹ C. Wang, R.R. Varshney, D.-A. Wang, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2010, **62**, 699-710.

¹²⁰ K.Y. Lee, H.J. Kong, R.G. Larson, D.J. Mooney, *Adv. Mater.*, 2003, **15**, 1828-1832.

¹²¹ D.F. Williams, *Biomaterials*, 2011, **32**, 4195-4197.

En parallèle, la recherche s'est orientée vers d'autres voies et matériaux telles que les matrices inorganiques et plus généralement la silice (SiO_2), minéral biocompatible comme l'illustrent bien les diatomées s'entourant d'un exosquelette silicé comme bouclier protecteur vis-à-vis des prédateurs^{122,123} (figure 1.12). Ce matériau procure de plus un environnement aqueux et biologiquement inerte propice à l'encapsulation de cellules vivantes¹²⁴ tout en présentant une stabilité mécanique nettement améliorée par rapport aux polymères. Parmi les nombreux autres avantages de la silice, nous pouvons citer les conditions de synthèse douces (pH physiologique, température ambiante, pression atmosphérique) et la porosité modulable. Les travaux de Pope¹²⁵, dans lesquels l'implantation d'îlots de Langerhans encapsulés chez des souris a donné des résultats encourageants, illustrent les potentialités des matériaux en silice dans le cadre de la thérapie cellulaire. Cependant, une dissolution *in vivo* progressive de ce matériau est observée, probablement provoquée par les fluides corporels¹²⁶.

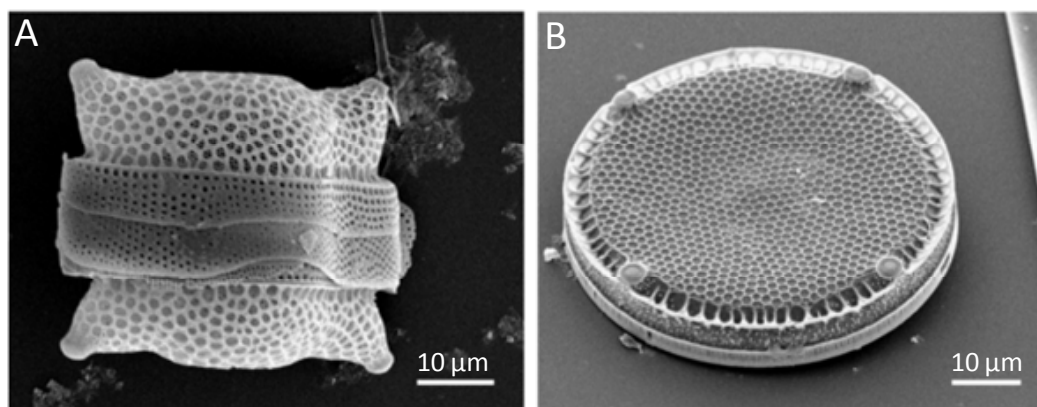


Figure 1.12 : Illustrations du squelette silicé de diatomées (a) *Biddulphia reticulata* et (b) *Diploneis* sp obtenues par microscopie électronique à balayage (MEB)¹²³.

La silice n'est cependant pas la seule source disponible, le dioxyde de titane (TiO_2) étant réputé pour sa compatibilité avec l'organisme, comme le prouve son emploi en tant que pigment et opacifiant dans la nourriture, le dentifrice, les crèmes solaires ou encore les médicaments. Le dioxyde de titane a déjà été utilisé en tant que

¹²² C.E. Hamm, R. Merkel, O. Springer, P. Jurkojc, C. Maier, K. Pecht, V. Smetacek, *Nature*, 2003, **421**, 841-843.

¹²³ J. Bradbury, *PLoS Biol.*, 2004, **2**(10), e306. DOI: 10.1371/journal.pbio.0020306.

¹²⁴ D. Avnir, T. Coradin, O. Lev, J. Livage, *J. Mater. Chem.*, 2006, **16**, 1013-1030.

¹²⁵ E.J.A. Pope, K. Braun, C.M. Peterson, *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 1997, **8**, 635-639.

¹²⁶ A. Nieto, S. Areva, T. Wilson, R. Viitala, M. Vallet-Regi, *Acta Biomater.*, 2009, **5**, 3478-3487.

support pour l'encapsulation de biomolécules^{127,128} et présente une meilleure résistance mécanique et thermique ainsi qu'une stabilité vis-à-vis d'une gamme plus étendue de pH par rapport à la silice^{129,130,131}. En effet, la liaison Ti-O du TiO₂ est plus énergétique (600 kJ/mol) que la liaison siloxane du SiO₂ (450 kJ/mol). Le *tableau 1.2* résume les avantages et inconvénients des différents biomatériaux utilisés dans le domaine de l'encapsulation cellulaire.

Tableau 1.2 : Résumé des avantages et inconvénients des différents types de matériaux étudiés dans le cadre de l'encapsulation cellulaire.

	Avantages	Inconvénients
Polymères	Biocompatibilité, méthode d'encapsulation simple, fonctionnalisation des surfaces, résultats d'implantation <i>in vivo</i> très encourageants	Faible résistance mécanique, porosité trop élevée pour une immuno-isolation efficace, formulations des polymères non-standardisées créant une grande variabilité des résultats inter-laboratoires ^{95,96}
SiO₂	Résistance mécanique, conditions de synthèse douces, porosité modulable	Dissolution <i>in vivo</i> , contraction matricielle, sous-produits toxiques du procédé sol-gel (voir <i>point 1.3.2</i>)
TiO₂	Résistance mécanique, conditions de synthèse douces, porosité modulable	Contraction matricielle, sous-produits toxiques du procédé sol-gel (voir <i>point 1.3.2</i>)

En ce qui concerne les méthodes d'encapsulation employées, deux grandes catégories peuvent être distinguées :

- L'encapsulation **post-synthèse** qui consiste à mélanger le support préalablement préparé avec une suspension cellulaire tamponnée. Cette méthode, simple d'application, est généralement décrite pour l'encapsulation de biomolécules ou enzymes^{132,133}, très rarement pour celle de cellules vivantes¹³⁴. En effet, ce procédé repose sur des interactions physiques impliquant un important taux de fuite ;

¹²⁷ Y. Jiang, Q. Sun, Z. Jiang, L. Zhang, J. Mi, L. Li, X. Sun, *Mater. Sci. Eng. C*, 2009, **29**, 328-334.

¹²⁸ J. Yu, S. Liu, H. Ju, *Biosens. Bioelectron.*, 2003, **19**, 509-514.

¹²⁹ Y. Chen, Y. Yi, J.D. Brennan, M.A. Brook, *Chem. Mater.*, 2006, **18**, 5326-5335.

¹³⁰ Z.-T. Jiang, Y.-M. Zuo, *Anal. Chem.*, 2001, **73**, 686-688.

¹³¹ S. Takemoto, K. Tsuru, S. Hayakawa, A. Osaka, S. Takashima, *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 2001, **21**, 97-104.

¹³² H.P.H. Yiu, P.A. Wright, *J. Mater. Chem.*, 2005, **15**, 3690-3700.

¹³³ L. Washmon-Kriel, V.L. Jimenez, K.J. Balkus Jr, *J. Mol. Catal. B : Enzym.*, 2000, **10**, 453-469.

¹³⁴ A.M. Tope, N. Srinivas, S.J. Kulkarni, K. Jamil, *J. Mol. Catal. B : Enzym.*, 2001, **16**, 17-26.

- L'encapsulation *in situ* permet de synthétiser la matrice autour des cellules en mélangeant les précurseurs ou réactifs nécessaire à la synthèse du matériau avec les cellules en suspension qui, par modification de facteurs physico-chimiques, vont se retrouver complètement englobées et piégées au sein d'un réseau poreux, diminuant les possibilités de relargage.

1.3.2. L'encapsulation *in situ* par le procédé sol-gel

L'encapsulation *in situ* permet d'obtenir une dispersion homogène des cellules au sein du matériau, contrairement à l'encapsulation post-synthèse où ces grosses entités diffusent difficilement. La synthèse des matrices est généralement réalisée selon la méthode sol-gel. Cette dernière permet de générer la matrice autour de l'entité à encapsuler en cours de synthèse par utilisation d'alkoxydes de métaux $M(OR)_n$ (où $M = Si, Ti$ et où R est un groupement organique), ceux-ci subissant des réactions d'hydrolyse et de condensation pour former un réseau d'oxyde.

La *figure 1.13* illustre les différentes étapes du procédé^{135,136} appliqué à l'encapsulation cellulaire. Les précurseurs de type alkoxy sont tout d'abord hydrolysés, en présence ou non d'additifs tels que des agents stabilisants, permettant de contrôler la cinétique de réaction d'hydrolyse, ou des osmoprotecteurs pour former une suspension colloïdale appelée *sol*. C'est à ce moment que les cellules en suspension sont ajoutées et, par modification des facteurs physico-chimiques, la condensation (ou gélification) et polycondensation des espèces réactionnelles pour former un réseau poreux gorgé d'eau (hydrogel) est provoquée. Finalement, l'étape de vieillissement consiste en de multiples réactions de polycondensation provoquant une contraction du réseau et l'expulsion du solvant hors des pores.

Cette méthode est très simple d'application et les conditions de synthèse sont particulièrement adaptées à l'encapsulation de systèmes vivants (température ambiante, pression atmosphérique, pH physiologique). Cependant, les grandes quantités d'alcool libéré par les alkoxydes métalliques durant la réaction d'hydrolyse exercent un effet néfaste sur les cellules, affectant leur perméabilité et provoquant dès

¹³⁵ T. Coradin, M. Boissière, J. Livage, *Curr. Med. Chem.*, 2006, **13(1)**, 99-108.

¹³⁶ C.J. Brinker, G.W. Scherer, « Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing », 1990, Academic Press.

lors leur mort^{124,137,138}. De plus, la contraction matricielle durant l'étape de vieillissement provoque un stress mécanique sur les cellules encapsulées¹³⁹.

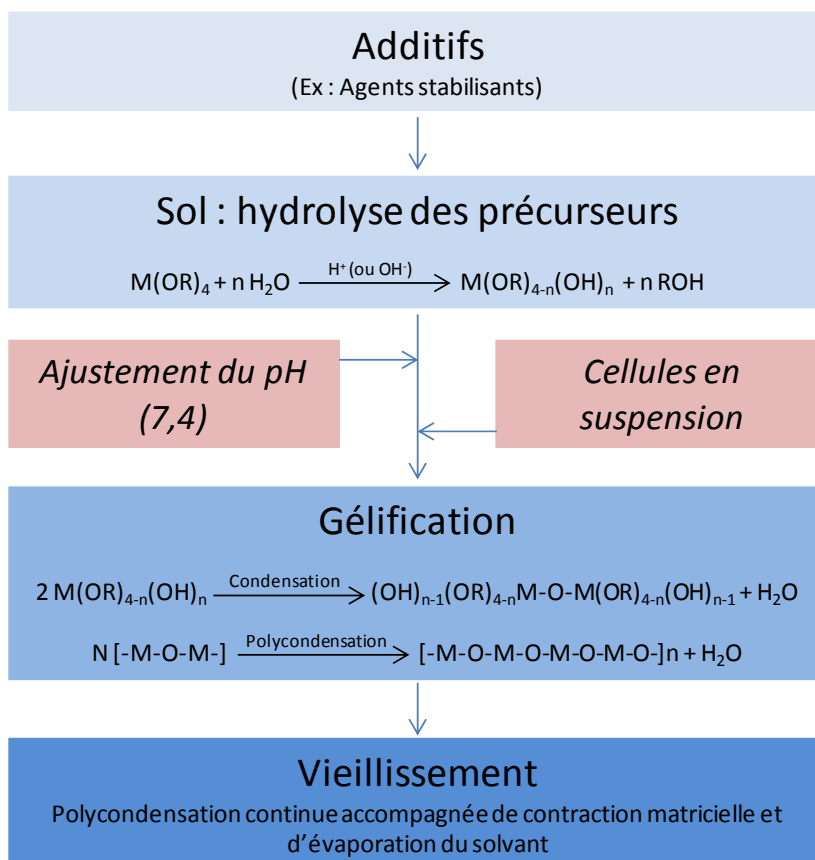


Figure 1.13 : Description de la méthode sol-gel appliquée à l'encapsulation de cellules (M = Si, Ti, autre métal ; R = un groupement organique).

Ces observations ont mené à la mise au point de nouvelles voies de synthèse :

- La voie aqueuse, employant du silicate de sodium (Na_2SiO_3) et des particules colloïdales stabilisées (LUDOX) comme précurseurs^{137,140,141} ;



- Les précurseurs dits « biocompatibles » tels que le diglycérylsilane¹⁴², libérant durant la réaction d'hydrolyse du procédé sol-gel un polyol non-délétère aux cellules ;

¹³⁷ R.B. Bhatia, C.J. Brinker, A.K. Gupta, A.K. Singh, *Chem. Mater.*, 2000, **12**, 2434-2441.

¹³⁸ A. Coiffier, T. Coradin, C. Roux, O.M.M. Bouvet, J. Livage, *J. Mater. Chem.*, 2001, **11**, 2039-2044.

¹³⁹ G. Carturan, R. Dal Toso, S. Boninsegna, R. Dal Monte, *J. Mater. Chem.*, 2004, **14**, 2087-2098.

¹⁴⁰ D.-M. Liu, I.W. Chen, *Acta Mater.*, 1999, **47**, 4535-4544.

¹⁴¹ K.S. Finnie, J.R. Barlett, J.L. Woolfrey, *J. Mater. Chem.*, 2000, **10**, 1099-1101.

- L'élimination de l'alcool du sol par distillation avant ajout du matériel biologique¹⁴³ ;
- Le procédé Biosil^{144,145}, où des précurseurs siliciques sont chauffés (70-90°C), vaporisés et transportés, à l'aide d'un flux d'azote, vers une chambre de réaction où se trouvent les cellules. L'atmosphère humide, à température contrôlée, de la chambre permet de former un film aqueux autour des cellules reposant sur un support solide. Le flux de précurseurs entrant en contact avec les cellules humides subit les réactions d'hydrolyse et de condensation du procédé sol-gel pour former un film de silice autour des cellules. Les sous-produits sont finalement éliminés et évacués par le flux d'azote pour éviter tout contact prolongé avec les cellules ;
- La pré-encapsulation au sein d'un biopolymère tel que des microcapsules d'alginate, dans lesquelles les cellules ne subiront pas le stress engendré par la formation du réseau d'oxyde. Le polymère, dont le principal défaut est la faible résistance mécanique, sera ensuite renforcé par la formation d'un film d'oxyde métallique recouvrant la capsule^{145,146,147,148}.

L'encapsulation *in situ* de cellules sécrétrices d'insuline au sein d'un matériau inorganique poreux, biocompatible et robuste semble donc être une voie très prometteuse pour le traitement du diabète de type 1, une maladie aux conséquences désastreuses, dont l'incidence ne cesse d'augmenter de par le monde et dont les traitements employés à l'heure actuelle s'avèrent particulièrement contraignants pour les patients. Les recherches portant sur la conception et le développement de nouveaux biomatériaux pour la thérapie cellulaire sont dès lors d'une importance capitale.

¹⁴² M.A. Brook, Y. Chen, K. Guo, Z. Zhang, W. Jin, A. Deisingh, J. Cruz-Aguado, J.D. Brennan, *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 2004, **31**, 343-348.

¹⁴³ M.L. Ferrer, F. Del Monte, D. Levy, *Chem. Mater.*, 2002, **14**, 3619-3621.

¹⁴⁴ R. Campostrini, G. Carturan, R. Caniato, A. Piovan, R. Filippini, G. Innocenti, E.M. Cappelletti, *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 1996, **7**, 87-97.

¹⁴⁵ E. Callone, R. Campostrini, G. Carturan, A. Cavazza, R. Guzzon, *J. Mater. Chem.*, 2008, **18**, 4839-4848.

¹⁴⁶ S. Boninsegna, R. Dal Toso, R. Dal Monte, G. Carturan, *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 2003, **26**, 1151-1157.

¹⁴⁷ T. Coradin, N. Nassif, J. Livage, *Appl. Microbiol. Technol.*, 2006, **61**, 429-434.

¹⁴⁸ S. Sakai, T. Ono, H. Ijima, K. Kawakami, *J. Membr. Sci.*, 2002, **205**, 183-189.

Chapitre 2.

Objectifs et stratégie scientifique

Chapitre 2

Objectifs et stratégie scientifique

2.1. Objectifs

Cette thèse a pour but de concevoir un « îlot de Langerhans artificiel », c'est-à-dire une matrice hybride poreuse adaptée à l'encapsulation de cellules animales pour le traitement de maladies causées par un dysfonctionnement cellulaire de manière générale, et pour le diabète de type 1 plus spécifiquement. En effet, cette maladie affecte un nombre croissant de personnes de par le monde et les traitements employés à l'heure actuelle présentent leurs limites. L'insulinothérapie ne résout pas le problème de manière définitive et est particulièrement contraignante au quotidien tandis que la greffe de pancréas ou d'îlots de Langerhans oblige le patient à suivre indéfiniment un régime médicamenteux immunosuppresseur sévère et à subir une lourde chirurgie. En effet, la transplantation de l'organe entier requiert une anesthésie générale tandis que la greffe d'îlots, réalisée par cathétérisme de la veine porte acheminant le sang vers le foie, implique notamment un risque d'hémorragie au point de ponction ou de thrombose.

L'objectif consiste donc à proposer un traitement en constante relation avec les besoins du corps, limitant toute intervention humaine et toute contrainte liée à la compatibilité entre donneur et receveur et au rejet de l'implant. Il s'agit donc d'immuno-isoler les cellules β sécrétrices d'insuline pour pouvoir les greffer sans avoir à lutter contre les défenseurs immunitaires à l'aide de médicaments présentant de graves effets secondaires. Cette immuno-isolation est réalisée à l'aide d'un édifice ou matériau semi-perméable qui relie les cellules entre elles et à l'organisme hôte pour former un organe artificiel et qui joue également le rôle de bouclier protecteur contre toute contrainte mécanique et contre toute attaque des défenseurs immunitaires pouvant provoquer le rejet de la greffe. De plus, la transplantation de cet édifice peut se pratiquer par une chirurgie légère, telle une implantation sous-cutanée.

Cette matrice se doit d'être totalement **inerte** et **biocompatible** vis-à-vis des cellules encapsulées et de l'organisme hôte ; tant dans sa forme finale qu'au niveau de ses méthodes de synthèse. En effet, la matrice et les réactifs employés pour sa

préparation ne doivent pas être traumatisants vis-à-vis des tissus du receveur ni provoquer de pression sur les membranes des cellules contenues dans la matrice ou les perméabiliser. La **porosité** du matériau est également un facteur clé dans le sens où celle-ci doit être suffisamment importante pour permettre la diffusion des nutriments essentiels à la viabilité des cellules encapsulées, des métabolites et des substances d'intérêt (l'insuline dans le cas du traitement du diabète de type 1) et assez petite que pour empêcher l'entrée des défenseurs immunitaires. Enfin, la matrice doit présenter une **stabilité** et **résistance mécanique** importante lui permettant de protéger les cellules *in vivo* pendant plusieurs dizaines d'années¹.

2.2. Stratégie scientifique

La première étape de ce projet consiste à sélectionner une cellule modèle pouvant être obtenue rapidement et en grande quantité afin de faciliter les études d'encapsulation.

Deuxièmement, il faut s'attarder sur le choix de matériaux répondant aux critères définis pour notre application. Pour ce faire, les matériaux seront caractérisés par diverses méthodes permettant de définir leurs propriétés de biocompatibilité, porosité et résistance mécanique.

Il s'agira ensuite de combiner les cellules et les matrices retenues pour concevoir un organe artificiel dont les potentialités seront évaluées en vérifiant le maintien de l'activité des cellules encapsulées *in vitro*.

Nous pourrons alors évaluer la biocompatibilité des matériaux et l'immuno-isolation des cellules *in vivo*.

Enfin, une fois toutes les conditions réunies, l'encapsulation pourra être adaptée aux cellules β afin de vérifier qu'elles sécrètent bien de l'insuline lors d'une stimulation par du glucose.

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

2.2.1. Les cellules modèles

2.2.1.1. *Les cellules HepG2*

Les cellules d'hépatome HepG2 sont des cellules cancéreuses de foie largement employées dans les recherches fondamentales des biologistes^{2,3}. Leurs principaux avantages sont, d'une part, leur prolifération très rapide et leur grande disponibilité et, d'autre part, leur similitude de taille et de forme avec les cellules β (*figure 2.1*). Ces cellules ont dès lors été sélectionnées pour optimiser les méthodes de préparation des matrices et les diverses encapsulations et évaluations de la survie cellulaire. De plus, leur sécrétion d'albumine, protéine intervenant notamment dans le maintien de la pression osmotique chez l'homme, permet d'étudier la diffusion des métabolites en dehors de la matrice et de vérifier le maintien de l'activité des cellules encapsulées. L'insuline (5,8 kDa) étant bien moins volumineuse que l'albumine (66 kDa), nous pouvons dès lors nous assurer que celle-ci peut également diffuser au travers des pores du matériau.

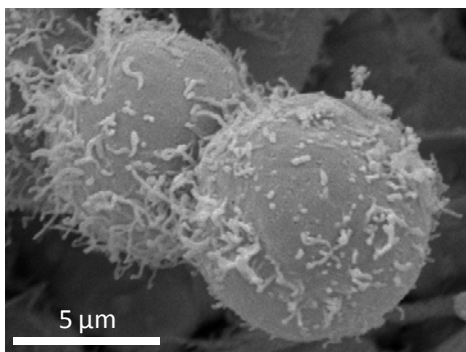


Figure 2.1 : Micrographie de cellules HepG2 obtenue par microscopie électronique à balayage.

2.2.1.2. *Les cellules INS-1E*

Une fois les méthodes d'encapsulation mises au point, réunissant toutes les conditions définies de biocompatibilité (vis-à-vis des cellules encapsulées d'une part et de l'organisme implanté d'autre part), de porosité et de résistance mécanique, il convenait de vérifier que des cellules β encapsulées répondait bien à une stimulation

² S.Y. Tsang, S.C. Tam, I. Bremner, M.J. Burkitt, *Biochem. J.*, 1996, **317**, 13-16.

³ D. Mottet, V. Dumont, Y. Deccache, C. Demazy, N. Ninane, M. Raes, C. Michiels, *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**, 31277-31285.

par du glucose *in vitro* afin d'évaluer les potentialités du ou des matériaux conçus en tant que pancréas artificiel pour le traitement du diabète de type 1. Cependant, les cellules β sont tellement différenciées qu'elles ne possèdent plus d'activité mitotique, ce qui rend leur culture en laboratoire pour la recherche fondamentale particulièrement difficile et qui nécessite d'en extraire régulièrement de tissus d'animaux comme le rat ou la souris. De nombreux chercheurs se sont donc penchés sur la conception de lignées de cellules sécrétant de l'insuline de manière régulée⁴. Certains facteurs de croissance favorisent la mitose des cellules⁵ sans toutefois permettre une importante croissance cellulaire en culture. Certaines transformations (irradiation⁶, infection virale⁷, développement de souris transgénique exprimant un oncogène recombinant^{8,9},...) permettent toutefois d'obtenir des lignées de cellules sécrétrices d'insuline avec un phénotype différencié stable pendant plusieurs passages. Ces cellules pourraient très bien être utilisées comme alternatives aux cellules β primaires pour la thérapie cellulaire même si elles ne présentent pas une physiologie totalement similaire.

Parmi ces cellules, nous pouvons citer les cellules INS-1, obtenues par Asfari *et al*¹⁰ en 1992. Il s'agit de cellules d'un insulinome (cellules cancéreuses de pancréas sécrétant de l'insuline) de rat obtenues par irradiation aux rayons X. Ces cellules produisent une grande quantité d'insuline en réponse aux stimulations par du glucose. Elles ne sont toutefois pas très stables après de nombreux passages en culture. En 2004, Merglen *et al*¹¹ ont isolé une lignée clonale, les cellules INS-1E exprimant un phénotype de cellules β stable sur plus de 116 passages et répondant à de plus grandes quantités de glucose que les cellules INS-1. Le seul inconvénient de ces cellules est qu'elles requièrent la présence de mercaptoéthanol dans leur milieu de culture, ce composé étant toxique et dénaturant les protéines.

⁴ M. Skelin, M. Rupnik, A. Cencič, *ALTEX*, 2010, **27**, 105-113.

⁵ B. Soria, E. Andreu, G. Berná, E. Fuentes, A. Gil, T. León-Quinto, F. Martín, E. Montanya, A. Nadal, J.A. Reig, C. Ripoll, E. Roche, J.V. Sanchez-Andrés, J. Segura, *Pflügers Arch – Eur. J. Physiol.*, 2000, **440**, 1-18.

⁶ A.F. Gazdar, W.L. Chick, H.K. Oie, H.L. Sims, D.L. King, G.C. Weir, V. Lauris, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, **77**(6), 3519-3523.

⁷ R.F. Santerre, R.A. Cook, R.M.D. Crisel, J.D. Sharp, R.J. Schmidt, D.C. Williams, C.P. Wilson, *Proc. Natl., Acad. Sci. USA*, 1981, **78**(7), 4339-4343.

⁸ C.B. Newgard, *Diabetes*, 1994, **43**, 341-350.

⁹ S. Efrat, D. Hanahan, *Mol. Cell. Biol.*, 1987, **7**(1), 192-198.

¹⁰ M. Asfari, D. Janjic, P. Meda, G. Li, P.A. Halban, C.B. Wollheim, *Endocrinology*, 1992, **130**(1), 167-178.

¹¹ A. Merglen, S. Theander, B. Rubi, G. Chaffard, C.B. Wollheim, P. Maechler, *Endocrinology*, 2004, **145**(2), 667-678.

Au cours de cette thèse, nous avons eu la chance de pouvoir disposer de ces cellules INS-1E qui nous ont été gracieusement offertes par le Professeur Pierre Maechler de l'Université de Genève (Département de Physiologie Cellulaire et Métabolisme) et par le Professeur Patrick Gilon de l'Université Catholique de Louvain (UCL) (Pôle d'Endocrinologie, Diabète et Nutrition (EDIN)). L'utilisation de ces cellules permet de vérifier qu'elles sécrètent bien de l'insuline en réponse aux stimulations par du glucose une fois encapsulées et que cette hormone diffuse bien au travers de la matrice.

2.2.2. Conception des matrices

La méthode d'encapsulation choisie pour notre application est l'encapsulation *in situ* par procédé sol-gel, permettant de former le réseau poreux autour des cellules à encapsuler en additionnant une suspension de ces dernières aux précurseurs de la matrice à l'état liquide. Par simple modification de facteurs physico-chimiques, les précurseurs se condensent pour former un édifice dont la porosité se développera spontanément autour des cellules, parfaitement dispersées au sein du matériau et immobilisées de manière irréversible (*figure 2.2*).

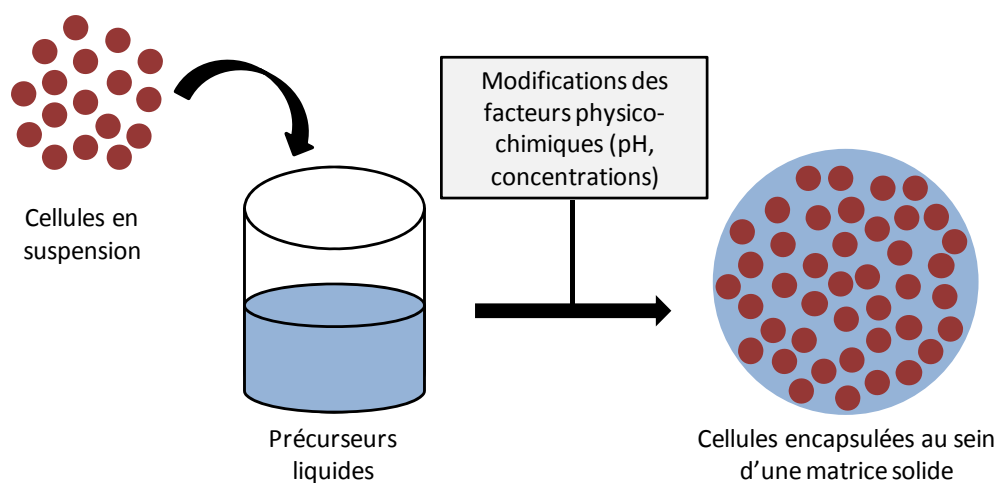


Figure 2.2 : Encapsulation *in situ* de cellules au sein d'une matrice poreuse.

Le choix du type de matériau s'est tout d'abord tourné vers le dioxyde de titane (TiO_2), peu décrit dans la littérature dans le domaine de l'encapsulation cellulaire mais présentant de nombreux avantages comme, à l'instar de la silice, une

porosité modulable^{12,13} permettant de répondre aux critères de diffusion et d'immuno-isolation et des **conditions de synthèse douce**¹⁴ (pH physiologique, température ambiante et pression atmosphérique). Ce matériau présente en outre une **meilleure résistance mécanique**¹⁴ que la silice ou que les polymères cités dans l'introduction générale de cette thèse, ce qui constitue un paramètre clé quand il s'agit de concevoir un matériau censé protéger les cellules encapsulées pendant plusieurs décennies. Le dioxyde de titane a été utilisé en combinaison avec l'alginate, un polymère naturel biocompatible permettant d'éviter tout stress mécanique lié à la contraction matricielle observée lors de l'étape de vieillissement du procédé sol-gel (*figure 1.13*). Ce polymère utilisé comme agent de pré-encapsulation permet également de limiter l'effet néfaste de sous-produits toxiques libérés durant l'hydrolyse des précurseurs.

¹² H. Hirashima, H. Imai, V. Balek, *J. Non-Cryst. Solids*, 2001, **285**, 96-100.

¹³ B. Yao, L. Zhang, *J. Mater. Sci.*, 1999, **34**, 5983-5987.

¹⁴ T. López, E. Ortiz, P. Quintana, R.D. González, *Colloids Surf., A*, 2007, **300**, 3-10.

Chapitre 3.

Partie expérimentale

Chapitre 3

Partie expérimentale

Ce chapitre détaille la culture des cellules HepG2 et INS-1E et leurs méthodes d'encapsulation et expose les différentes techniques employées pour caractériser les matrices synthétisées. Les techniques employées pour évaluer le maintien de la viabilité et de l'activité cellulaire au cours du temps et pour estimer la biocompatibilité *in vivo* des îlots de Langerhans artificiels sont également décrites dans les pages qui suivent.

3.1. Culture cellulaire

Les cultures de cellules HepG2 et INS-1E répondent au même schéma de base mais diffèrent sur quelques détails. Nous décrirons donc la culture de chaque lignée ainsi que les méthodes d'encapsulation de manière séparée.

3.1.1. Culture des cellules HepG2

La culture d'hépatomes HepG2 est réalisée sous hotte à flux laminaire dans le but d'éviter toute contamination bactérienne ou fongique. Il en va de même pour toutes les expériences d'encapsulation, où tous les réactifs nécessaires à la préparation des matériaux doivent être minutieusement stérilisés au préalable, soit par autoclavage (120°C), soit par filtration (0,2 µm).

Les cellules sont repiquées tous les 2-3 jours, une fois arrivée à 100 % de confluence^a. Elles sont entre-temps conservées dans des boîtes de culture T75 (surface de 75 cm²) au fond desquelles elles forment un tapis cellulaire en s'y accrochant après y avoir sécrété une matrice extracellulaire, qui les lie également les unes aux autres. Elles sont recouvertes d'un mélange de milieu de culture (DMEM 31885, Invitrogen : voir *annexe I*) et de sérum de veau fœtal (respectivement 90 et 10

^a La *confluence* d'une culture cellulaire adhérente décrit le degré d'écartement entre les cellules formant un tapis cellulaire en monocouche. Lorsqu'il n'existe plus aucun interstice entre les cellules formant cette monocouche, on dit que les cellules sont à 100 % de confluence.

%), ce dernier fournissant l'ensemble des facteurs de croissance et nutriments qui permettent aux cellules de proliférer.

Les boîtes T75 sont tout d'abord récupérées dans l'étuve humide (37°C, 5 % en CO₂). Le milieu de culture est retiré de la boîte dans laquelle 5 mL de PBS (Phosphate Buffer Solution : solution isotonique composée de NaCl (9000 mg/L), Na₂HPO₄ (795 mg/L), KH₂PO₄ (144 mg/L)) sont versés. Cette dernière solution permet de nettoyer les cellules des ions calcium et magnésium contenus dans le milieu ainsi que du sérum ralentissant l'action de la trypsine, employée à l'étape suivante pour dégrader la matrice extracellulaire. Après le rinçage des ions, tout le PBS est retiré à la pipette et un mélange de trypsine (0,05 %) et d'EDTA (0,02 %) est ajouté (2 mL). La trypsine digère la matrice et l'EDTA joue le rôle d'agent chélatant pour piéger les éventuels ions calcium ou magnésium encore présents. Au bout de quelques minutes dans l'étuve sèche à 37°C, toutes les cellules se sont dissociées et sont resuspendues dans 5 mL de milieu de culture frais avec sérum. Ce mélange est transvasé dans un tube à essai et centrifugé durant 5 minutes à 1000 tours par minute. Le surnageant, contenant toujours de la trypsine, est éliminé et du milieu frais avec sérum (8 mL) est ajouté dans le tube. 2 mL de cette suspension sont prélevés, ajoutés dans une nouvelle boîte de culture et complétés par 18 mL de milieu frais avec sérum. Cette boîte est placée dans une étuve humide où les cellules formeront de la matrice extracellulaire, s'accrocheront au fond de la boîte et proliféreront jusqu'au prochain repiquage.

Lors d'une encapsulation, les cellules sont récupérées après l'étape de centrifugation et d'élimination du surnageant. Elles sont resuspendues dans du milieu frais avec sérum et mélangées avec le sol ou les précurseurs liquides (voir *figure 1.13* et *figure 2.2*) pour amorcer la formation de la matrice qui va les encapsuler *in situ*. Ce procédé nécessite de nombreuses mises au point expérimentales afin d'ajuster les ratios précurseurs : suspension cellulaire (v : v), pour minimiser le temps de formation du matériau hybride tout en conservant une porosité, une robustesse et une biocompatibilité adaptées. Une fois la matrice synthétisée, elle est conservée dans un tube stérile de 10 mL dans lequel elle est recouverte de milieu frais avec sérum et placée dans l'étuve humide. Le milieu est renouvelé tous les 2-3 jours, comme pour la culture cellulaire.

^b La *trypsine* est une enzyme digestive (endoprotéase) du suc pancréatique digérant les protéines par hydrolyse des liaisons peptidiques.

3.1.2. Culture des cellules INS-1E

La culture de cellules INS-1E est fort semblable à la culture de cellules HepG2. Elle est également réalisée sous hotte à flux laminaire et les réactifs employés au cours des expériences d'encapsulation sont stérilisés de la même manière. Des boîtes de culture T75 au fond desquelles se trouve le tapis cellulaire, sont tout d'abord récupérées dans l'étuve humide. Les cellules sont recouvertes de leur milieu de culture spécifique et de sérum de veau fœtal.

Ce milieu de culture (RPMI 160, Invitrogen : voir *annexe I*) contient quelques suppléments nécessaires à la croissance des cellules : de la *glutamine*, acide aminé instable en solution (2 mM), de l'*HEPES*, un tampon qui va maintenir un pH physiologique malgré les changements de concentration en CO₂ provoqués par la respiration cellulaire (10 mM), du *pyruvate de sodium*, source additionnelle d'énergie en tant qu'intermédiaire de la production d'ATP (1 mM) et du *2-mercaptoéthanol*, un agent réducteur limitant le stress oxydatif mais ayant l'inconvénient d'être toxique et de dénaturer les protéines (0,05 mM). Le milieu de culture est retiré de la boîte dans laquelle 5 mL de PBS sont versés. Après le rinçage des ions et du sérum inhibant l'action de la trypsine, tout le PBS est retiré à la pipette pasteur et un mélange de trypsine et d'EDTA (0,05 %/0,02 %) est ajouté (1 mL). Au bout de quelques minutes, toutes les cellules se sont dissociées et sont mélangées à 11 mL de milieu de culture frais (90 % de milieu et de ses additifs et 10 % de sérum) afin de stopper l'action de la trypsine. 3 mL de ce mélange sont prélevés et placés dans une nouvelle boîte de culture contenant 15 mL de milieu de culture frais (avec additifs et sérum). Cette boîte est placée dans l'étuve humide dans laquelle les cellules sédimenteront de la même manière que les cellules HepG2 et proliféreront jusqu'au prochain repiquage, qui doit être effectué tous les 5 jours au maximum ou dès que les cellules sont à 100 % de confluence. Le milieu de culture doit être renouvelé tous les 3 jours maximum.

Lors d'une encapsulation, les cellules sont récupérées après l'action de la trypsine et la dilution dans le milieu de culture avec sérum frais. La suspension cellulaire est alors mélangée avec les précurseurs liquides (voir *figure 2.2*) pour encapsuler les cellules *in situ*. La conservation des matériaux se fait de la même manière que ceux encapsulant des cellules HepG2 et le milieu est également renouvelé tous les 2-3 jours, comme pour la culture cellulaire.

3.2. Caractérisation des matrices synthétisées

Les différents matériaux synthétisés, encapsulant des cellules ou non, ont été caractérisés par diverses techniques dans l'optique de recueillir des informations sur leurs propriétés clés que sont la composition chimique, la morphologie, la porosité et la biocompatibilité.

3.2.1. Le séchage au CO₂ supercritique¹

Afin de pouvoir accéder aux propriétés texturales des matériaux par adsorption-désorption d'azote et aux propriétés morphologiques par microscopie électronique, ceux-ci doivent être préalablement séchés. Cependant, une simple évaporation du solvant réalisée dans une étuve mène à la formation de xérogels, c'est-à-dire des matériaux gardant une grande porosité et surface spécifique mais dont la taille de pores est sous-estimée par rapport aux hydrogels de départ en raison d'un effondrement de la structure. La taille de pores de la matrice étant une des caractéristiques essentielle à notre application, il convient plutôt de caractériser ce que l'on appelle les aérogels, c'est-à-dire les matériaux séchés par extraction du solvant et conservant la structure et la taille de pores des hydrogels.

L'obtention d'aérogels à partir des hydrogels est réalisée par la méthode de séchage au CO₂ supercritique. Cette technique requière tout d'abord de remplacer le solvant présent dans les pores du matériau, c'est-à-dire l'eau, par du dioxyde de carbone. Toutefois, ces deux substances n'étant pas miscibles, il convient de remplacer préalablement l'eau par un solvant miscible au CO₂, l'éthanol. Les hydrogels synthétisés sont donc immergés dans plusieurs bains d'alcools de concentration croissante afin de les déshydrater. Une fois que leurs pores ne contiennent plus que de l'éthanol, ils sont placés dans la cuve d'un appareil (Critical Point Dryer EM CPD 030, Leica) permettant de remplacer l'éthanol par du CO₂ et d'atteindre ensuite ce que l'on appelle le point critique, correspondant à une température de 31,1°C et une pression de 7,4 MPa pour le CO₂ (*figure 3.1*). Au-delà de ce point critique, il n'existe plus d'interface liquide-gaz, ce qui annule toute présence de tension de surface au liquide occupant les pores du matériau et empêchant de la sorte toute déformation de

¹ C.J. Brinker, G.W. Scherer, « Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing », 1990, Academic Press, 501-505.

la structure de ce dernier. Une valve permet alors d'évacuer le dioxyde carbone pour obtenir les aérogels prêts à être caractérisés par analyse BET et MEB.

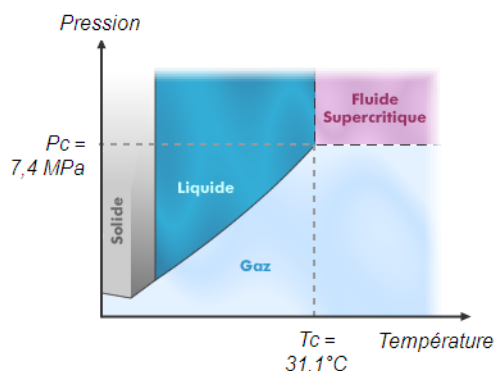


Figure 3.1 : Diagramme d'état du dioxyde de carbone².

3.2.2. L'adsorption-désorption d'azote (BET)³

L'analyse par adsorption-désorption d'azote (description détaillée à l'annexe II) se base sur une mesure de la quantité d'azote adsorbée par un matériau à 77K, la température d'ébullition de l'azote liquide, en fonction de la pression, mesurée à l'équilibre. Le matériau est préalablement dégazé sous vide (70 millitors) à température ambiante pour éliminer les impuretés. Les isothermes ainsi obtenues peuvent être classés selon cinq types définis par IUPAC⁴ (figure 3.2).

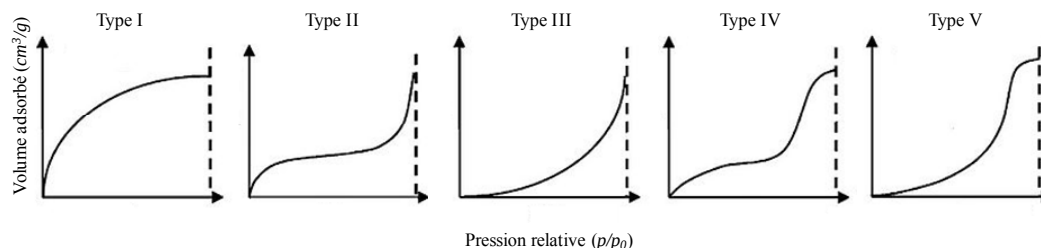


Figure 3.2 : Classification des isothermes selon IUPAC⁵.

Cette technique nous renseigne sur les propriétés texturales des matrices synthétisées, soit la surface spécifique, le volume poreux mais surtout la taille de

² <http://www.supercritical-solutions.com/fr/supercritical-co2>, consulté le 29 août 2013 (figure modifiée à partir d'une image originale).

³ K.S.W. King, S.J. Gregg, « Adsorption, Surface area and Porosity », 1982, London, Academic Press.

⁴ International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC),

<http://www.iupac.org/publications/pac/1985/pdf/5704x0603.pdf>, consulté le 10 décembre 2013.

⁵ <http://www.er.uqam.ca/nobel/r27734/solcon/surfasp.html>, consulté le 29 août 2013 (figure modifiée à partir d'une image originale).

pores, information essentielle à notre application, les pores devant permettre la diffusion des nutriments et métabolites tout en empêchant les défenseurs immunitaires de reconnaître les cellules encapsulées.

L'isotherme de type I correspond aux matériaux microporeux, c'est-à-dire dont le diamètre des pores est inférieur à 2 nm. Les isothermes de type II et III sont obtenues à partir de matrices macroporeuses possédant des pores de diamètre supérieur à 50 nm. Enfin, les types IV et V sont caractéristiques des matériaux mésoporeux ($2 < d_{\text{pores}} < 50$ nm).

La distribution de taille de pores peut être calculée à partir des isothermes par la méthode BJH⁶ (du nom de ses auteurs Barret, Joyner et Halenda) et la surface spécifique par l'équation BET⁷.

Les mesures réalisées dans le cadre de la présente thèse ont été réalisées sur un appareil Tristar 3000 de chez Micromeritics.

3.2.3. La microscopie électronique à balayage (MEB)

La microscopie électronique à balayage fournit des informations quant à la morphologie des matériaux synthétisés. Elle permet notamment d'avoir accès à des informations quant à la porosité ou encore quant à la distribution des cellules encapsulées.

Cette technique consiste à balayer la surface de l'échantillon point par point par un faisceau d'électrons de haute énergie. L'interaction de ce dernier avec l'échantillon permet l'émission, entre autres, d'électrons secondaires proches de la surface (d'une profondeur inférieure à 10 nm) collectés in fine par un détecteur qui va amplifier les signaux qui seront utilisés pour construire une image de la surface de l'échantillon analysé.

Les matériaux synthétisés durant cette thèse n'étant pas conducteurs, ils furent préalablement recouverts par une fine couche d'or (quelques dizaines de nanomètres) par pulvérisation cathodique afin d'éviter une accumulation de charges de surface susceptibles d'affecter la résolution et pour augmenter le rendement en électrons secondaires.

Les micrographies reprises dans les chapitres suivants ont été obtenues à l'aide d'un microscope JEOL JSM-7500F.

⁶ E.P. Barret, L.G. Joyner, P.P. Halenda, *J. Am. Chem. Soc.*, 1951, **73**, 373-380.

⁷ S. Brunauer, P.H. Emmett, E. Teller, *J. Am. Chem. Soc.*, 1938, **60**, 309-319.

3.2.4. L'analyse dispersive en énergie (EDX)

L'analyse dispersive en énergie est une méthode couplée au microscope électronique à balayage décrit ci-dessus permettant de connaître la constitution des matériaux synthétisés par identification des proportions atomiques. L'impact des électrons primaires permet d'ioniser les autres électrons. La désexcitation a alors lieu avec émission de rayons X.

Dans le cadre de cette thèse, cette technique permet de s'assurer que les matrices utilisées pour l'encapsulation sont bien constituées de dioxyde de titane (TiO_2).

3.2.5. La spectroscopie UV-visible⁸

La spectroscopie UV-visible est une technique d'analyse optique mettant en jeu les photons de longueurs d'onde dans le domaine de l'ultraviolet (200-400 nm) et du visible (400-750 nm) voire même du proche infrarouge (750-1400 nm). Les molécules soumises à un rayonnement dans ces gammes de longueurs d'onde sont susceptibles de subir des transitions électroniques en absorbant des photons dont l'énergie est reliée à la longueur d'onde de la manière suivante :

$$E = h \cdot \frac{c}{\lambda}$$

Où E est l'énergie du photon (J).

h est la constante de Planck ($6,626 \cdot 10^{-34}$ J.s).

c est la vitesse de la lumière ($3 \cdot 10^8$ m.s⁻¹).

λ est la longueur d'onde du photon (m).

Cette technique peut notamment être utilisée pour déterminer la concentration d'une entité chimique en solution grâce à la loi de Lambert-Beer :

$$A_{\lambda} = -\log_{10} \frac{I}{I_0} = \epsilon_{\lambda} \cdot l \cdot C$$

⁸ B.J. Clark, T. Frost, M.A. Russell, « UV Spectroscopy: Techniques, Instrumentation and Data Handling », 1993, Chapman and Hall, London, 1-15.

Où I/I_0 est la transmittance de la solution (sans unité).

A est l'absorbance à une longueur d'onde λ donnée (sans unité).

ε est le coefficient d'extinction molaire à une longueur d'onde donnée
($\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).

l est la longueur du trajet optique ou la largeur de la cuvette d'analyse (cm).

C est la concentration de la solution (mol.L^{-1}).

L'utilisation de cette technique fut requise au cours de cette thèse pour les dosages de type ELISA de l'albumine et de l'insuline produites respectivement par les cellules HepG2 et INS-1E ainsi que pour celui des marqueurs inflammatoires lors des études de biocompatibilité *in vivo* (voir *point 3.3.4*). Elle fut également employée pour le dosage du dioxyde de titane dans les matériaux synthétisés et dont la méthode est décrite dans le chapitre suivant ainsi que pour le dosage de la LDH (*point 3.2.7*). Les spectres UV-visible d'échantillons individuels (dosage du TiO_2) furent collectés à l'aide d'un spectrophotomètre Lambda 35 UV/visible de chez Perkin-Elmer. En ce qui concerne les échantillons contenus dans des microplaques multi-puits (les autres mesures), les spectres furent obtenus à l'aide d'un spectrophotomètre pour microplaque xMark de chez Bio-Rad.

3.2.6. La spectrofluorimétrie⁹

La spectrofluorométrie s'apparente à la spectroscopie UV-visible dans le sens où elle permet de doser des molécules fluorescentes en solution. Cette technique permet ici une évaluation du diamètre des pores des matériaux synthétisés, ou MWCO, en dosant au cours du temps la quantité de molécules fluorescentes de différents diamètres dans le surnageant de solutions contenant les matrices à caractériser. La description détaillée de cette manipulation se trouve au chapitre suivant.

Le phénomène de fluorescence provient de transitions électroniques entre les orbitales LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital) et HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) du fluorophore. Celui-ci passe d'un niveau vibrationnel de l'état électronique fondamental S_0 (singulet) à un des niveaux vibrationnels de l'état excité S_n ($n = 1, 2, \dots$) (singulet excité) lorsqu'il absorbe l'énergie d'un photon.

⁹ B. Valeur, « Invitation à la fluorescence moléculaire », 2004, Ed. De Boeck, 21-31.

Il s'ensuit alors un phénomène de désexcitation se déroulant avec des transitions électroniques de type radiative ou non-radiative. En cas de transition entre états de même multiplicité, nous avons affaire à une transition radiative avec émission d'un photon nommée *fluorescence* (10^{-10} - 10^{-7} s) et à une transition non-radiative appelée *conversion interne* (10^{-11} s) tandis qu'en cas de transition impliquant un changement de multiplicité de spin (singulet-triplet), nous sommes en présence de phénomène de *phosphorescence* (10^{-6} - 10^0 s) pour une transition radiative et de *passage inter-système* (10^{-9} s) pour une transition non-radiative (*figure 3.3*). Le spectrofluorimètre utilisé est le LS45 de Perkin-Elmer. Ce phénomène est également exploité dans la microscopie à fluorescence (*point 3.3.3*).

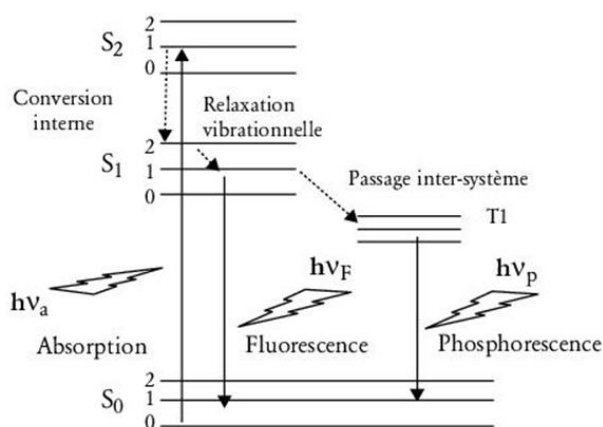


Figure 3.3 : Diagramme de Perrin-Jablonski⁹.

3.2.7. Le dosage de la LDH

Le dosage de la LDH (Lactate DésHydrogénase) libérée par des cellules suite au stress imposé par des composés permet d'évaluer la « *cytotoxicité* » de ces derniers. En effet, la LDH est une enzyme intracytoplasmique. Par définition, cela signifie que jamais cette molécule ne se retrouve dans le milieu de culture des cellules. En mourant ou soumise à un stress (choc osmotique, température, ...), la membrane cellulaire devient perméable et la LDH peut alors diffuser dans le milieu de culture. Un kit de détection (Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS} de chez Roche) composé de lactate, de NAD^+ , de sel de tétrazolium (jaune) et d'un catalyseur permet de doser l'activité de la LDH. La quantité de LDH relarguée est directement proportionnelle à la quantité de formazan (rouge) formé (*figure 3.4*) et est dosée par spectroscopie UV-visible.

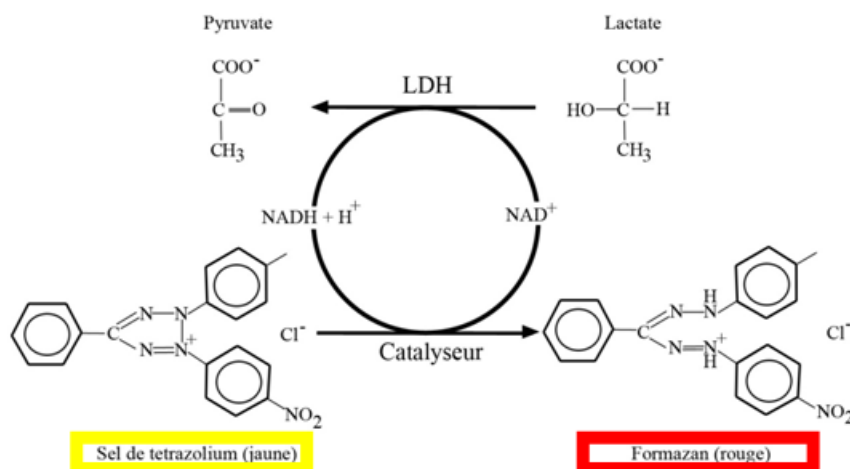


Figure 3.4 : Principe du dosage de la LDH¹⁰.

Brièvement, 50.000 cellules sont placées dans des puits de microplaque de culture cellulaire pendant 24 heures. Le milieu de culture est alors remplacé par les composés dont on cherche à évaluer la cytotoxicité, dilués dans du milieu de culture frais. Un groupe de cellules « *contrôle* », placées dans du milieu de culture frais, est défini pour évaluer le taux de LDH relarguée suite à la mort naturelle des cellules, le groupe « *blanc* » étant du milieu de culture sans cellules. Le tout est laissé pendant 5h à l'étuve humide (37°C, 5 % CO₂) et le surnageant est alors récolté. Les cellules au fond des puits sont lysées avec une solution de Triton X-100 (10 %) pour évaluer le taux de LDH relarguée par les cellules toujours vivantes et adhérentes et ainsi définir le pourcentage relargué dans le surnageant, c'est-à-dire la cytotoxicité, selon l'équation ci-dessous :

$$\text{Cytotoxicité (\%)} = \frac{\left(\frac{\text{Abs.}_{\text{surnageant}} - \text{Abs.}_{\text{blanc}}}{\text{Abs.}_{\text{surnageant}} - \text{Abs.}_{\text{blanc}}} \right)}{\left(\frac{\text{Abs.}_{\text{surnageant}} - \text{Abs.}_{\text{blanc}}}{\text{Abs.}_{\text{surnageant}} - \text{Abs.}_{\text{blanc}}} \right) + \left(\frac{\text{Abs.}_{\text{lysate}} - \text{Abs.}_{\text{lysate des blancs}}}{\text{Abs.}_{\text{lysate}} - \text{Abs.}_{\text{lysate des blancs}}} \right)} \times 100$$

Cette technique fut utilisée pour évaluer la toxicité des sous-produits relargués et des agents stabilisants utilisés durant la synthèse de matrices en TiO₂ selon le procédé sol-gel en fonction de leurs concentrations et ainsi prédire la compatibilité de ces matériaux avec une application comme l'encapsulation de cellules animales.

¹⁰ G. Wang, J. Zhang, A.H. Dewilde, A.K. Pal, D. Bello, J.M. Therrien, S.J. Braunhut, K.A. Marx, *Toxicology*, 2012, **299**, 99-111 (figure modifiée à partir d'une image originale).

3.3. Evaluation de la viabilité et de l'activité des cellules encapsulées

La survie des cellules encapsulées au sein des matrices fut également déterminée par différentes méthodes permettant de définir leur respiration, l'activité des estérases intracytoplasmiques et leur production de métabolites d'intérêt.

3.3.1. Mesure de la densité cellulaire

Avant chaque encapsulation (ou pour le dosage de la LDH), il est intéressant de connaître la quantité de cellules par millilitre de matériau afin de pouvoir comparer au mieux les différentes données obtenues. Deux techniques furent employées pour le comptage des cellules en suspension : un hémacytomètre de type « chambre de Neubauer » permettant un comptage « manuel » des cellules sous microscope optique et un compteur de cellules automatisé (Countess Automated Cell Counter de chez Invitrogen), plus simple d'utilisation et plus rapide.

La chambre de Neubauer est une pièce de verre subdivisée en carrés d'égale surface et recouverte d'une lamelle couvre-objet entre lesquelles les cellules en suspension sont déposées à l'aide d'une pipette Pasteur. Le milieu remplit l'espace entre le support de comptage et la lamelle par capillarité et l'excédent est directement évacué vers des canaux jouant le rôle de rigole. Le quadrillage du support permet un comptage facilité des cellules à l'aide d'un microscope. Les cellules comptées sont celles situées dans chacun des carrés rouges (*figure 3.5*), d'une surface de 1 mm² et d'une profondeur de 0,1 mm, ce qui correspond à 1.10⁻⁴ millilitre. En faisant la moyenne des cellules se trouvant dans chaque carré rouge et en multipliant ce nombre par 10.000, le nombre de cellules par millilitre de suspension est déterminé.

Le compteur de cellules automatisé a l'avantage de minimiser l'erreur humaine avec des résultats reproductibles obtenus en 30 secondes. 10 µL de suspension cellulaire sont mélangés avec 10 µL de bleu de trypan, un chromophore chargé négativement et qui n'interagit donc pas avec la membrane intacte des cellules vivantes. Le mélange est introduit à l'aide d'une micropipette dans une chambre de comptage qui est elle-même introduite dans le compteur automatisé. Les cellules mortes apparaîtront colorées en bleu au contraire des cellules vivantes, permettant d'obtenir le pourcentage de viabilité cellulaire.

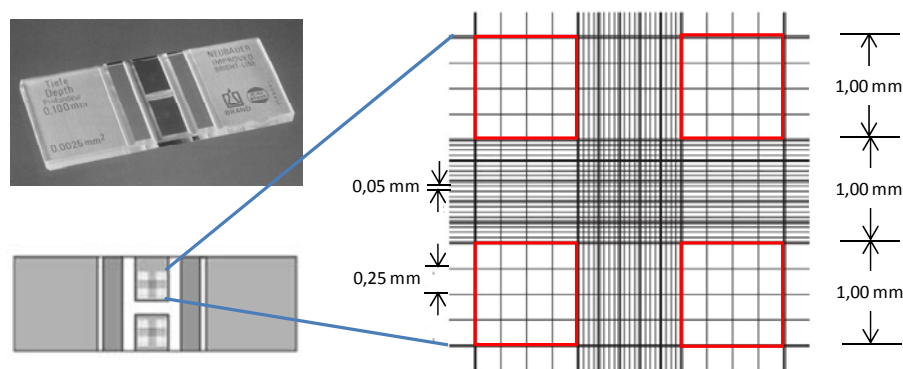


Figure 3.5 : Schéma d'un hémacytomètre (chambre de Neubauer)¹¹.

3.3.2. L'oxymétrie¹²

Cette technique emploie un *capteur à oxygène contenant une électrode de Clark* pour mesurer la concentration en oxygène d'une solution par voltampérométrie hydrodynamique. Un anneau de platine jouant le rôle de cathode est isolé et relié à une électrode de référence Ag-AgCl. Le contact électrique entre la cathode et l'anode, maintenues à une différence de potentiel constante de 700 mV, est réalisé par une membrane de téflon (polytétrafluoroéthylène) et une solution de KCl saturée (*figure 3.6*).

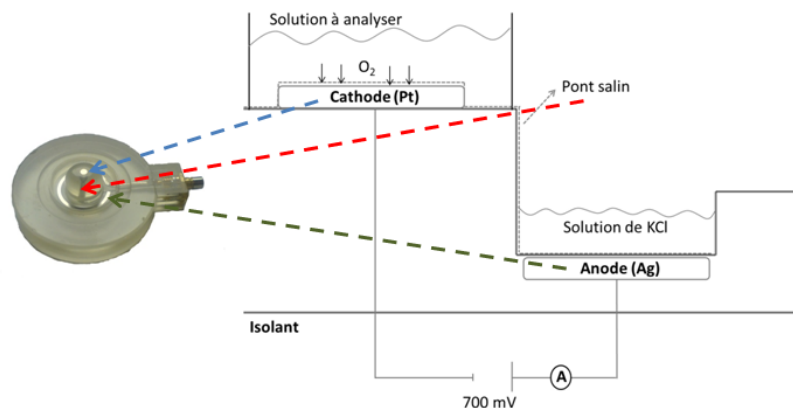


Figure 3.6 : Schéma d'un oxymètre (capteur à oxygène de Clark)¹².

Ce dispositif est placé sous une cuve étanche contenant le matériau avec cellules encapsulées en suspension dans une solution brassée par un agitateur. Cette

¹¹ <http://www.allcells.com/blog/how-to-count-fresh-primary-cells/>, consulté le 29 août 2013 (figure modifiée à partir d'une image originale).

¹² Hansatech Instruments, <http://hansatech-instruments.com/>, consulté le 2 septembre 2013 (figure modifiée à partir d'une image originale).

solution repose sur la cathode recouverte par la membrane de téflon. Celle-ci est perméable à l'oxygène mais imperméable à l'eau, aux ions et à toutes molécules polaires, permettant à l'oxygène dissous en solution de diffuser au travers et d'être réduit à la surface de la cathode pour générer un courant électrique mesuré par une sonde reliée à un ordinateur. Un logiciel traite alors les données enregistrées et les présente en graphique de consommation (pente négative) ou de production (pente positive) d'oxygène. Le courant électrique est influencé par la vitesse d'agitation de la solution et la température appliquées lors de la mesure.

Lors de cette thèse, l'oxymétrie a permis d'évaluer la survie des cellules encapsulées en mesurant leur consommation d'oxygène au cours du temps. Cependant, cette technique est peu adaptée aux cellules macroencapsulées dans des gels monolithiques (voir *chapitre 4*), ceux-ci se tassant au fond de la cuve, gênant le brassage de la solution et faussant dès lors les mesures par une vitesse d'agitation inconstante. L'oxymètre employé est un Oxy-Lab de chez HansaTech.

3.3.3. La microscopie à fluorescence

Cette méthode, complémentaire à l'observation à l'aide de la lumière visible des microscopes optiques traditionnels (brightfield mode), permet de détecter la fluorescence émise par un échantillon à l'aide de filtres sélectionnant certaines gammes de longueurs d'onde, tout d'abord celle d'excitation du fluorophore présent dans l'échantillon, ensuite celle réémise par phénomène de fluorescence.

La microscopie à fluorescence fut utilisée pour repérer le maintien de l'activité des estérases intracellulaires des cellules encapsulées soit via la FDA (Fluorescéine DiAcétate), soit via un kit de détection (LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit for mammalian cells de chez Invitrogen) composé de calcéine AM et d'éthidium homodimère.

La FDA et la calcéine AM sont deux molécules capables de traverser la membrane plasmiques des cellules vivantes. Celles-ci possèdent des estérases actives permettant d'hydrolyser ces deux molécules et de libérer la fluorescéine et la calcéine, présentant une fluorescence verte. Ces deux dernières molécules étant hydrophiles, elles s'accumulent dans les cellules. L'éthidium homodimère pénètre lui à l'intérieur des cellules mortes ayant une membrane plasmique endommagée et produit une fluorescence rouge une fois lié à des acides nucléiques intracellulaires.

3.3.4. Le dosage ELISA¹³

Le test ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) permet de doser une molécule au sein d'un échantillon de manière enzymatique.

Un anticorps primaire spécifique à la molécule que l'on veut doser est « pré-coaté » au fond de chaque puits d'une microplaque 96 puits. Les échantillons en solution contenant la molécule à détecter ainsi que les standards et éventuels contrôles qualité sont ajoutés dans les puits où la molécule cible va se lier à l'anticorps primaire. Après rinçage, un anticorps secondaire spécifique à la molécule et conjugué à une enzyme est ensuite ajouté avant d'ajouter le substrat de l'enzyme. Celle-ci catalyse la transformation du substrat en un produit coloré, ce qui permet de corrélérer de manière linéaire, dans une certaine gamme, la concentration en molécule à doser avec l'absorbance de la solution à la longueur d'onde du chromophore produit par l'enzyme, mesurée par un spectrophotomètre UV-visible. Les standards permettent d'établir une droite de calibration et, à partir de là, de déterminer la concentration en molécule cible dans chaque échantillon. Le principe du test ELISA est résumé à la *figure 3.7*.

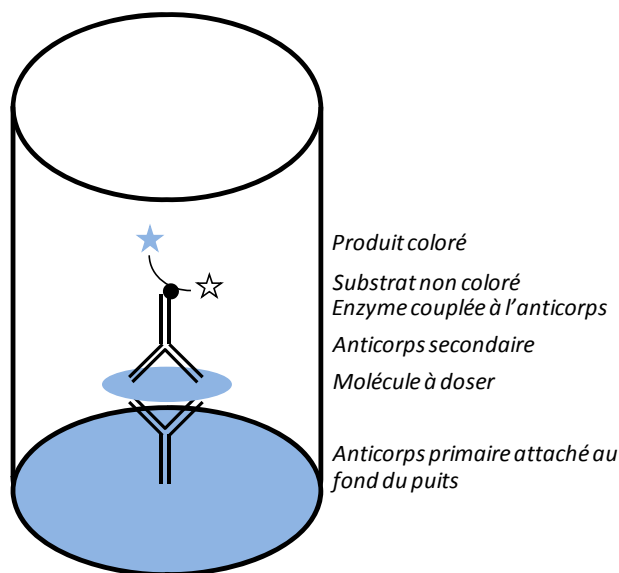


Figure 3.7 : Schéma de principe du dosage ELISA.

¹³ J.R. Crowther, « The ELISA Guidebook », 2001, Humana Press, 17-18.

Durant cette thèse, quatre dosages ELISA furent réalisés :

- Le dosage de l'**albumine** sécrétée par les cellules HepG2 encapsulées et ayant diffusé en dehors de la matrice (Human Albumin ELISA Kit, AssayPro) ;
- Le dosage de l'**interleukine-6 (IL-6)** dans le plasma sanguin de rats implantés afin d'évaluer la réponse inflammatoire *in vivo* provoquée par les matériaux (Rat IL-6 ELISA Kit, RayBiotech) ;
- Le dosage de **Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1)** dans le lysat de tissus musculaires prélevés chez les rats implantés dans le même but que pour le test précédent (Rat MCP-1 ELISA Kit, RayBiotech) ;
- Le dosage de l'**insuline** sécrétée par les cellules INS-1E encapsulées après stimulation par du glucose et diffusant hors des matrices (Rat/Mouse Insulin ELISA Kit, Merck Millipore).

Chapitre 4.

***Conception d'une matrice poreuse,
résistante et biocompatible pour
l'encapsulation de cellules animales***

Chapitre 4

Conception d’une matrice poreuse, résistante et biocompatible pour l’encapsulation de cellules animales

Le présent chapitre décrit les expériences réalisées visant à concevoir une matrice à base de dioxyde de titane adaptée à l’encapsulation de cellules animales pour la thérapie cellulaire. Les divers types de matrices investigués et leur caractérisation (morphologie, composition, porosité, biocompatibilité, ...) sont présentés ainsi que les essais d’encapsulation d’HepG2 et la détermination du maintien de la viabilité et de l’activité de ces cellules une fois encapsulées dans les matériaux.

4.1. Les matrices sol-gel

Les premiers matériaux en TiO_2 synthétisés pour notre application furent des matrices préparées à partir du procédé sol-gel (*figure 1.13*). La formation du sol (dispersion colloïdale) se fait au départ d’une source inorganique liquide ou alkoxyde de titane ($\text{Ti}(\text{OR})_n$). Afin que ce sol se condense à un pH semblable aux conditions physiologiques (7,4), il nous faut jouer sur les rapports titane/eau pour la formation du sol et ensuite sur le volume de tampon à ajouter pour la formation du gel. Cette première étape permet de nous assurer qu’un gel pourra être obtenu à partir de la source inorganique choisie.

Lors de l’encapsulation de cellules, c’est le milieu de culture qui joue le rôle de tampon. Ce milieu de culture contient un indicateur coloré bien connu, le rouge de phénol. Celui-ci donne une couleur rouge (voire rose) au gel à une valeur de pH de 7,4. Au-delà de cette valeur, nous observons un gel de couleur mauve et en-deçà, un gel jaune (*figure 4.1*). Cet indicateur s’avère donc d’une grande utilité dans la détermination des proportions en réactifs conduisant à la formation d’un gel apte à accueillir les cellules.

Une fois la synthèse de gels maintenant les cellules à pH physiologique mise au point, les cellules en suspension dans leur milieu seront mélangées au sol afin de former le matériau « vivant ».

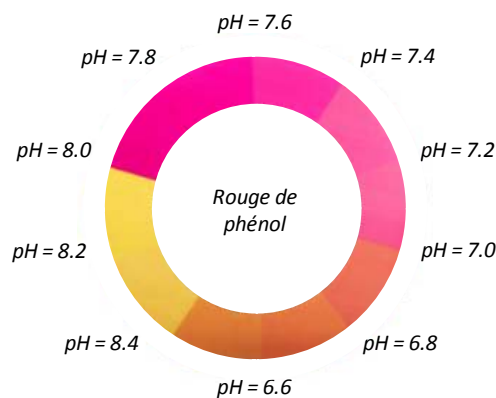


Figure 4.1 : Variations de couleur de l’indicateur rouge de phénol en fonction du pH.

Cependant, si la conception d’une matrice silicée par procédé sol-gel est assez simple à mettre en œuvre, il en va autrement des matériaux en dioxyde de titane. En effet, le titane est un métal de transition présentant un fort caractère électrophile de par son insaturation de coordinance ($N_{Ti} = 6$ tandis que $N_{Si} = 4$) et de par sa plus faible électronégativité par rapport au silicium. En conséquence, les alkoxydes de titane réagissent violemment et de manière très exothermique avec l’eau, aboutissant à la formation de précipités plutôt que de gels ou même d’un sol stable préalablement à l’encapsulation. Le contrôle de la cinétique d’hydrolyse pour la formation d’un tel sol peut-être réalisée de deux manières :

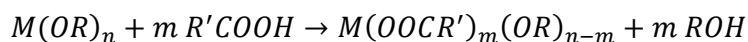
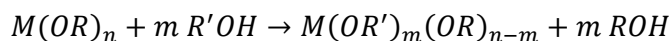
- Par une dilution du mélange de départ avec une grande quantité d’alcool, ce qui s’avère peu compatible avec l’encapsulation cellulaire. En effet, les alcools sont toxiques vis-à-vis des cellules (les alcools à courte chaîne aliphatique sont en effet capables d’intégrer la membrane cellulaire et de la perméabiliser¹) et entraînent des réactions de polycondensation supplémentaires après la gélification, provoquant une plus grande contraction matricielle^{2,3} ;

¹ B.W. Lee, R. Faller, A.K. Sum, I. Vattulainen, M. Patra, M. Karttunen, *Fluid Phase Equilib.*, 2004, **225**, 63-68.

² B.-L. Su, C. Sanchez, X.-Y. Yang, « Hierarchically Structured Porous Materials : From Nanoscience to Catalysis, Separation, Optics, Energy and Life Science », 2011, Wiley, 241-267.

³ Y. Yi, Y. Chen, M.A. Brook, J.D. Brennan, *Chem. Mater.*, 2006, **18**, 5336-5342.

- L’emploi d’agents chélatants ou stabilisants tels que des polyols⁴, l’acétylacétone^{5,6,7}, l’acide citrique⁸, l’acide stéarique⁹, l’acide acétique¹⁰, etc... qui, en substituant une partie des groupements alkoxy, diminuent la réactivité du précurseur de titane¹¹ :



Cette deuxième approche fut logiquement privilégiée pour la synthèse de nos matériaux, en prenant soin de sélectionner des précurseurs et des agents stabilisants adéquats.

4.1.1. Choix des précurseurs et agents stabilisants

Parmi les diverses sources commerciales de titane (*figure 4.2*), nous avons retenu dans un premier temps l’**isopropoxyde de titane** (Ti(OiPr)₄) et le **n-butoxyde de titane** (Ti(Obu)₄). Le méthoxyde de titane (Ti(OMe)₄) et l’éthoxyde de titane (Ti(OEt)₄) possèdent des alcools partants trop peu volumineux, rendant la réaction d’hydrolyse encore plus difficile à contrôler.

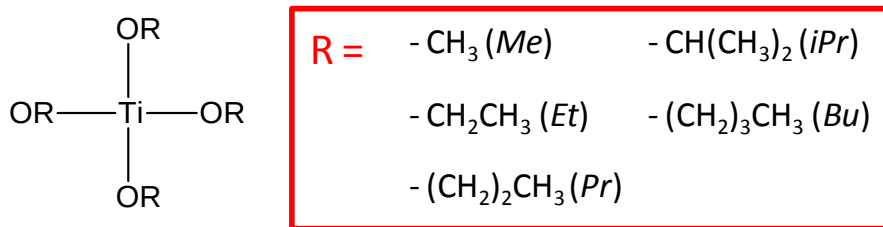


Figure 4.2 : Différents précurseurs alkoxy de titane utilisés dans le procédé sol-gel.

⁴ H. Honda, K. Suzuki, Y. Sugahara, *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 2001, **22**, 133-138.

⁵ C. Sanchez, J. Livage, M. Henry, J. Babonneau, *J. Non-Cryst. Solids*, 1988, **100**, 65-76.

⁶ A. Ponton, S. Barboux-Doeuff, C. Sanchez, *Colloids Surf., A*, 2000, **162**, 177-192.

⁷ Y. Takahashi, A. Ohsugi, T. Arafuka, T. Ohya, T. Ban, Y. Ohya, *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 2000, **17**, 227-238.

⁸ C.P. Scherer, C.G. Pantano, *J. Non-Cryst. Solids*, 1986, **82**, 246-255.

⁹ S. Sato, S. Oimatsu, R. Takahashi, *Chem. Commun.*, 1997, **22**, 2219-2220.

¹⁰ S. Doeuff, M. Henry, C. Sanchez, J. Livage, *J. Non-Cryst. Solids*, 1987, **89**, 206-216.

¹¹ U. Schubert, *J. Mater. Chem.*, 2005, **15**, 3701-3715.

En ce qui concerne les agents stabilisants, le glycérol est apparu comme tout à fait adapté à notre application dans le sens où ce polyol, liquide visqueux à température ambiante, est réputé comme biocompatible pour les cellules, comme le prouve son utilisation dans de nombreuses préparations pharmaceutiques (en tant qu’hydratant et lubrifiant notamment) ou comme cryoprotectant en biologie. Son utilisation a ainsi permis de préparer des gels monolithiques de dioxyde de titane à température ambiante et sans addition supplémentaire de solvants toxiques que constituent les alcools¹² pour l’encapsulation d’enzymes, dont la stabilité à long terme fut ainsi améliorée par rapport à leur maintien en solution³. En effet, en plus de former une espèce moins réactive vis-à-vis de l’eau, le glycérol, à l’instar d’autres polyols, peut également participer à des réactions intramoléculaires pour reformer des alkoxydes, permettant de déplacer l’équilibre vers les réactifs (*figure 4.3*). Enfin, le glycérol augmente la viscosité du milieu, diminuant les collisions entre les oligomères en développement et les particules¹².

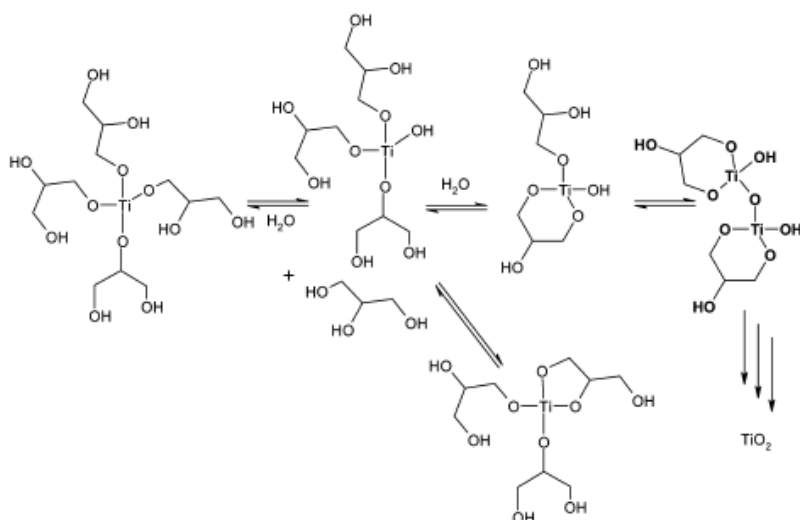


Figure 4.3 : Schéma illustrant le déplacement d’équilibre de la réaction d’hydrolyse d’un alkoxyde de titane modifié avec du glycérol vers les réactifs induits par des réactions intramoléculaires¹³.

L’éthylène glycol se présente également sous la forme d’un liquide visqueux et sa structure chimique ne varie que d’une fonction alcool et d’un carbone par rapport au glycérol (*figure 4.4*). Bien que ses métabolites, tel l’acide oxalique, présentent une

¹² Y. Chen, Y. Yi, J.D. Brennan, M.A. Brook, *Chem. Mater*, 2006, **18**, 5326-5335.

¹³ Reproduit avec la permission de l’éditeur à partir de : Y. Chen, Y. Yi, J.D. Brennan, M.A. Brook, *Chem. Mater*, 2006, **18**, 5326-5335, copyright © 2006, American Chemical Society.

toxicité certaine vis-à-vis de l’organisme, il fut utilisé en tant qu’agent stabilisant dans la préparation de nos matériaux car sa nature chimique et sa viscosité le rendent intéressant pour la synthèse de gels monolithiques de dioxyde de titane.

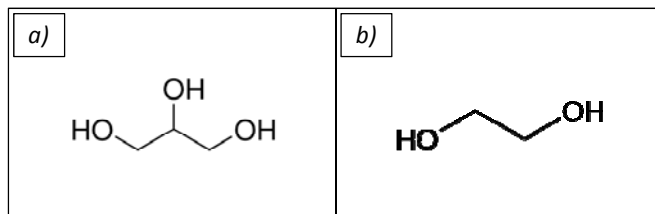


Figure 4.4 : Structure du glycérol (a) et de l'éthylène glycol (b).

4.1.2. Le glycérol comme agent stabilisant

4.1.2.1. *Synthèse des matrices*

L'obtention d'un sol stable à température ambiante nécessite de mettre au point les rapports Ti : agent stabilisant. Il convient ensuite de définir la quantité d'eau, tampon ou suspension cellulaire, dans le cas d'une encapsulation, qui devra être ajoutée à ce sol pour former en un laps de temps défini le gel immobilisant les cellules. Ce laps de temps est appelé *temps de gel*. Dans le cadre de l'encapsulation cellulaire, celui-ci se doit d'être assez court afin de minimiser la perturbation des cellules. En effet, le milieu de culture se retrouvant dilué lors du mélange avec le sol, il convient d'immerger les cellules encapsulées dans le gel dans du milieu de culture frais au plus vite. Toutefois, une gélification instantanée pourrait perturber les cellules par une modification trop brutale de leur environnement. La littérature rapporte des temps de gel allant de 2 à 10 minutes sans que l'influence de ce dernier sur la viabilité des cellules encapsulées ait été étudiée¹⁴. Les temps de gel des matrices sol-gel présentées dans cette thèse sont tous compris entre 5 et 10 minutes.

Le mélange d'un des précurseurs cités au *point 4.1.1* avec du glycérol selon un ratio molaire de 1 : 16 permet d'obtenir un sol stable, pendant plusieurs jours. L'ajout d'une solution tampon phosphate (pH = 7,4; $[\text{PO}_4^{3-}] = 50 \text{ mM}$; Ti : $\text{H}_2\text{O} = 1 : 16$) permet alors d'obtenir un hydrogel de TiO_2 . Le *tableau 4.1* indique les concentrations de chacun des réactifs.

¹⁴ C. Depagne, C. Roux, T. Coradin, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, **400**, 965-976.

Tableau 4.1 : Concentration des réactifs utilisés pour la préparation des gels de TiO_2 avec du glycérol comme agent stabilisant.

	$[\text{Ti}(\text{OiPr})_4]$ (M)	[G] (M)	$[\text{H}_2\text{O}]$ (M)
a	0,9	12,4	2,6
	$[\text{Ti}(\text{OBu})_4]$ (M)	[G] (M)	$[\text{H}_2\text{O}]$ (M)
b	0,9	9,3	9,3

4.1.2.2. Analyse de la morphologie et de la composition

L’analyse MEB (microscopie à balayage) des matrices synthétisées et séchées au CO_2 supercritique (voir *point 3.2.1*) révèlent la présence de particules hétérogènes agrégées les unes aux autres. L’analyse de la composition suggère bien la présence de TiO_2 , la présence du pic du sodium sur le spectre (B) provenant probablement du tampon utilisé pour la gélification (*figure 4.5*).

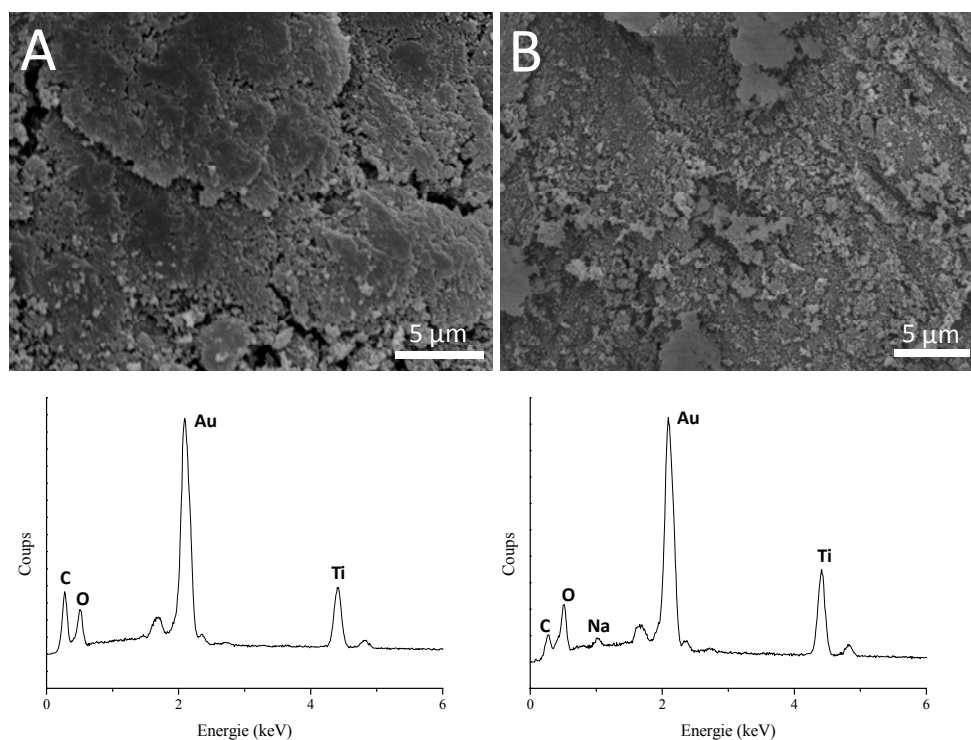


Figure 4.5 : Micrographies obtenues par microscopie à balayage et spectres EDX d’un gel de $\text{Ti}(\text{OiPr})_4$: glycérol (1 : 16) (A) et d’un gel de $\text{Ti}(\text{OBu})_4$: glycérol (1 : 16) (B).

4.1.2.3. Analyse de la porosité

Comme expliqué précédemment, la porosité est un critère clé pour la conception d’un bouclier protecteur de cellules devant jouer le rôle d’organe artificiel. La taille de pore de ce bouclier ne doit en effet pas dépasser une certaine valeur correspondant à la taille des défenseurs du système immunitaire. Mais la porosité de la matrice doit rester suffisamment importante que pour assurer une bonne diffusion des nutriments vers les cellules et des métabolites et substances sécrétées vers le milieu extérieur. Pour définir la valeur maximale du diamètre des pores d’une matrice destinée à la thérapie cellulaire, la littérature se base sur la taille de l’immunoglobuline G (IgG), la plus petite molécule du système immunitaire^{15,16}. Celle-ci possède une masse moléculaire de 150 kDa, cette valeur pouvant être convertie en unité de longueur grâce à l’équation de Stokes reliant la masse moléculaire au rayon des protéines¹⁷ :

$$\text{Rayon de Stokes (nm)} = 0,0305 * (\text{masse moléculaire (Da)})^{0,47}$$

Une masse de 150 kDa équivaut donc à un diamètre d’un peu moins de 17 nm, la littérature référant généralement une taille de pores allant jusqu’à 20 nm^{18,19,20}.

L’analyse par adsorption-désorption d’azote des matrices synthétisées séchées au CO₂ supercritique renseigne sur la taille de pore de l’hydrogel de départ, sur sa surface spécifique et sur son volume poreux. La *figure 4.6* illustre les isothermes obtenus.

¹⁵ P.J. Morris, *Trends Biotechnol.*, 1996, **14**, 163-167.

¹⁶ S.R. King, R. Dorian, R.W. Storrs, *Graft*, 2001, **4**, 491-499.

¹⁷ J.A. Nagy, K.T. Herzberg, E.M. Masse, G.P. Zientara, H.F. Dvorak, *Cancer Res.*, 1989, **49**, 5448-5458.

¹⁸ P. Dandoy, C.F. Meunier, C. Michiels, B.-L. Su, *PLoS One*, 2011, **6(6)**, e20983, DOI: 10.1371/journal.pone.0020983.

¹⁹ A. Bartkowiak, L. Canaple, I. Ceausolglu, N. Nurdin, A. Renken, L. Rindibacher, C. Wandrey, B. Desvergne, D. Hunkeler, *Annals of the NY Acad. Sci.*, 1999, **875**, 135-145.

²⁰ T.A. Desai, D. Hansford, M. Ferrari, *J. Membr. Sci.*, 1999, **159**, 221-231.

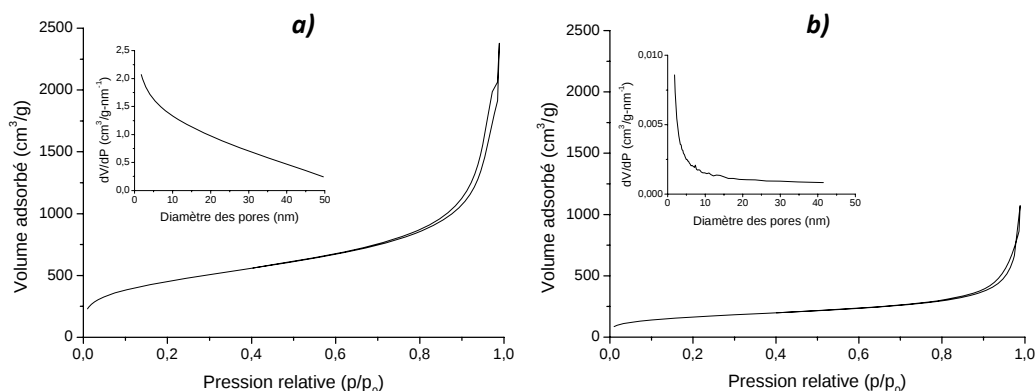


Figure 4.6 : Isotherme BET et distribution de taille des pores d’un gel de $\text{Ti}(\text{OiPr})_4$: glycérol (1 : 16) (a) et d’un gel de $\text{Ti}(\text{Obu})_4$: glycérol (1 : 16) (b).

Les isothermes obtenus sont de type II correspondant aux matériaux macroporeux possédant des pores d’un diamètre supérieur à 50 nm. Le *tableau 4.2* donne la surface spécifique et le volume poreux des aérogels. L’analyse de ces données indique que la matrice synthétisée au départ de n-butoxyde de titane possède une plus faible porosité que celle synthétisée à partir d’isopropoxyde de titane. De manière générale, ces matériaux ne possèdent pas un diamètre de pores adapté aux critères d’immuno-isolation.

Tableau 4.2 : Surface spécifique et volume poreux d’un gel de $\text{Ti}(\text{OiPr})_4$: glycérol (1 : 16) (a) et d’un gel de $\text{Ti}(\text{Obu})_4$: glycérol (1 : 16) (b).

	S_{BET} (m^2/g)	Volume poreux (cm^3/g)
a	1626	3,7
b	582	1,7

De plus, il est particulièrement difficile de contrôler le pH des gels. En effet, malgré l’ajout de tampon pour provoquer la condensation du sol, le pH final reste trop acide (obtention d’un gel jaune en remplaçant le tampon par du milieu (*figure 4.1*)). Malheureusement, si l’ajustement du pH du sol à 7,4 permet de garder ce dernier stable, l’ajout de tampon ne provoque aucune gélification, quelle que soit la quantité ajoutée. En définitive, l’utilisation du glycérol en tant qu’agent stabilisant dans le procédé sol-gel ne nous permet pas d’obtenir une matrice répondant aux critères prédéfinis.

4.1.3. L'éthylène glycol comme agent stabilisant

4.1.3.1. Synthèse des matrices

Le sol est obtenu en mélangeant de l'isopropoxyde de titane ou du n-butoxyde de titane avec de l'éthylène glycol selon des ratios molaires de 1 : 14 ($\text{Ti}(\text{OiPr})_4$) et 1 : 10 ($\text{Ti}(\text{OBu})_4$). Le pH de 7,4 est atteint par ajout de quelques microlitres d'une solution de NaOH 6 M. L'ajout de quantités variables de tampon ($\text{pH} = 7,4$; $[\text{PO}_4^{3-}] = 50 \text{ mM}$) mène à la formation d'hydrogels de TiO_2 . Le *tableau 4.3* indique les concentrations des réactifs.

Tableau 4.3 : Concentration des réactifs utilisés pour la préparation des gels de TiO_2 avec de l'éthylène glycol comme agent stabilisant.

	$[\text{Ti}(\text{OiPr})_4]$ (M)	$[\text{EG}]$ (M)	$[\text{H}_2\text{O}]$ (M)
a	0,9	12,4	2,6
b	0,8	10,8	7,7
c	0,7	9,7	13,9
	$[\text{Ti}(\text{OBu})_4]$ (M)	$[\text{EG}]$ (M)	$[\text{H}_2\text{O}]$ (M)
d	0,9	9,3	9,3
e	0,8	8,5	12,8
f	0,8	7,9	15,9

3.2.1.1. Analyse de la morphologie et de la composition

L’analyse MEB des matrices synthétisées et séchées au CO_2 supercritique révèle toujours la présence de particules hétérogènes agrégées les unes aux autres. L’analyse de la composition suggère bien la présence de TiO_2 . Le pic du sodium est présent sur les deux spectres et s’explique aisément par l’emploi de NaOH pour ajuster le pH du sol (*figure 4.7*).

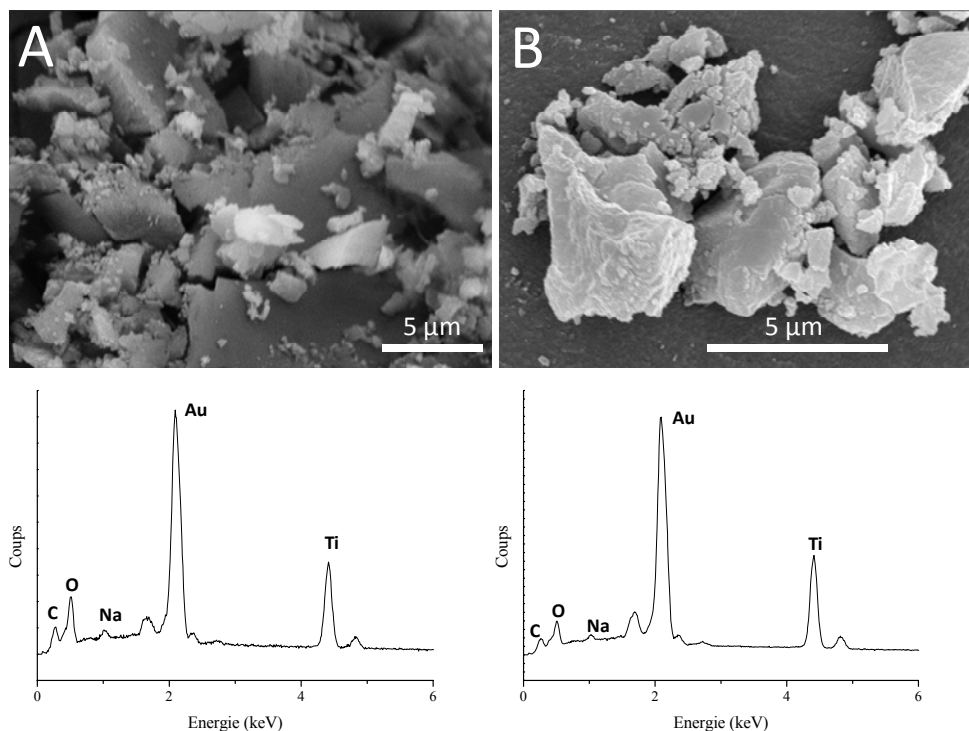


Figure 4.7 : Micrographies obtenues par microscopie à balayage et spectres EDX d’un gel de $\text{Ti}(\text{OiPr})_4$: éthylène glycol (1 : 14) (A) et d’un gel de $\text{Ti}(\text{OBu})_4$: éthylène glycol (1 : 10) (B).

4.1.3.2. Analyse de la porosité

La *figure 4.8* illustre les isothermes d’adsorption-désorption d’azote des matériaux synthétisés.

Les isothermes sont soit de type I (a, d, e, f) correspondant aux matériaux microporeux possédant des pores d’un diamètre inférieur à 2 nm, soit de type IV (b, c) correspondant à des matériaux mésoporeux possédant une taille de pores comprise entre 2 et 50 nm. Les matériaux synthétisés à partir d’éthylène glycol semblent donc

plus adaptés à l’immuno-isolation que ceux préparés à partir de glycérol, en plus de conserver les cellules encapsulées à pH physiologique. En effet, l’ajustement du pH du sol à 7,4 mène à la formation de gels de couleur rouge une fois que l’on ajoute le milieu de culture contenant le rouge de phénol et ce, pour toutes les conditions mentionnées au *tableau 4.3*.

Le *tableau 4.4* reprend les données texturales des matériaux, de plus faible porosité que ceux synthétisés à partir de glycérol.

Tableau 4.4 : Surfaces spécifiques et volumes poreux de gels de $\text{Ti}(\text{OiPr})_4$: éthylène glycol (1 : 14) (a, b, c) et de gels de $\text{Ti}(\text{OBu})_4$: éthylène glycol (1 : 10) (d, e, f).

	S_{BET} (m^2/g)	Volume poreux (cm^3/g)
<i>a</i>	436	0,4
<i>b</i>	487	0,6
<i>c</i>	391	0,5
<i>d</i>	362	0,2
<i>e</i>	409	0,3
<i>f</i>	404	0,2

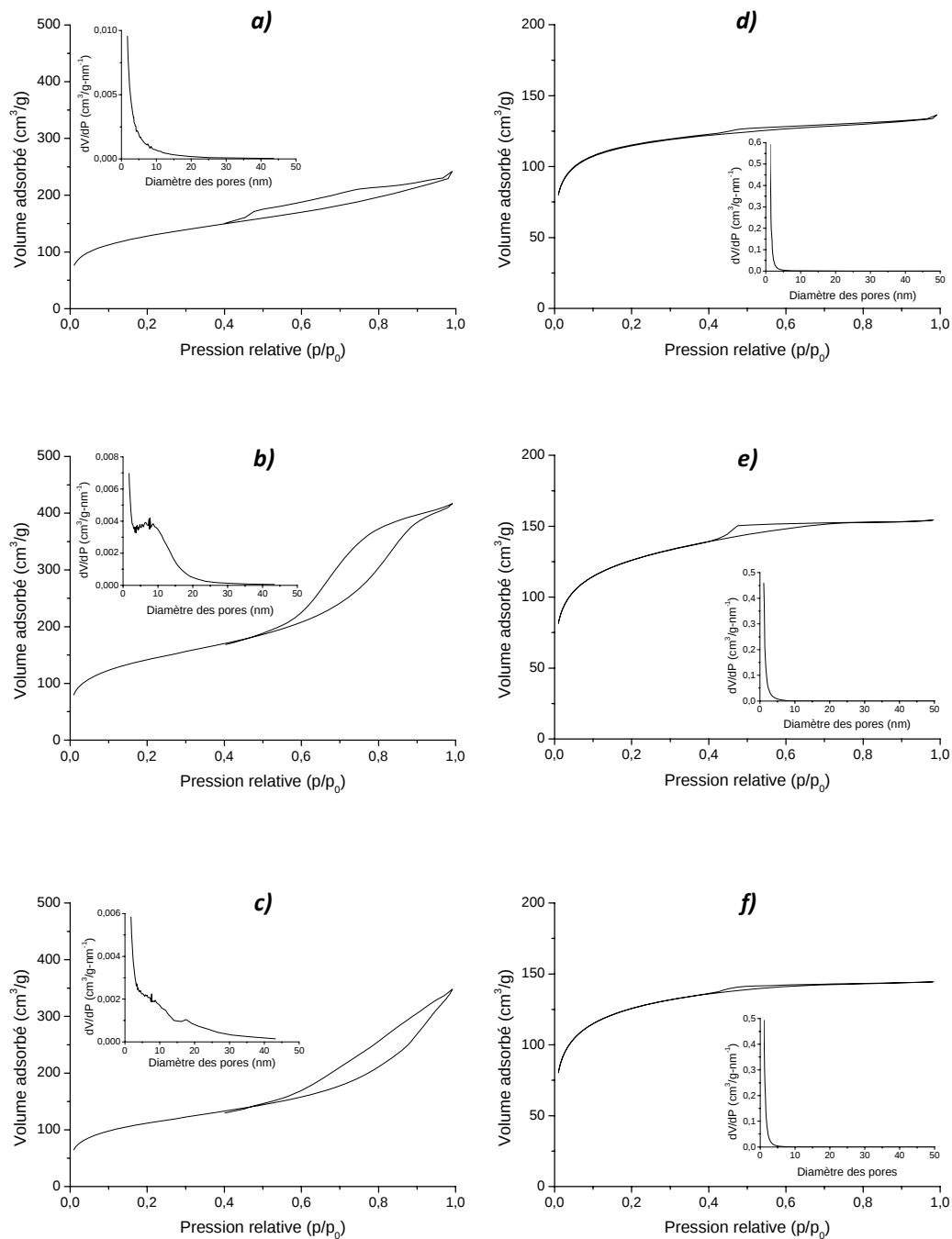


Figure 4.8 : Isothermes BET et distributions de taille de pores de gels de $\text{Ti}(\text{OiPr})_4$: éthylène glycol (1 : 14) (a, b ,c) et de gels de $\text{Ti}(\text{OBu})_4$: éthylène glycol (1 : 10) (d, e, f).

4.1.4. Evaluation de la survie cellulaire par l’étude de la cytotoxicité des agents stabilisants et des sous-produits

L’évaluation de la survie des cellules encapsulées au sein de gels monolithiques par les techniques décrites au chapitre précédent (*point 3.3*) est assez difficile à mettre en œuvre. En effet, les gels ont tendance à se tasser au fond de la cuve de l’oxymètre, gênant le brassage de la solution, rendant la vitesse d’agitation inconstante et faussant dès lors les mesures. Quant à la microscopie à fluorescence, elle requiert de pouvoir déposer de fines coupes du matériau sur une lame de microscope. Or, les gels se révèlent particulièrement friables une fois que l’on essaye de les couper en tranche, rendant très difficile voire impossible l’observation des cellules dispersées dans le matériau. Nous avons alors entrepris d’évaluer la toxicité des sous-produits du procédé sol-gel (isopropanol et butanol) et des agents stabilisants (glycérol et éthylène glycol) vis-à-vis des cellules HepG2, en fonction de leurs concentrations. Pour ce faire, nous avons mesuré la quantité de LDH dans le surnageant d’une culture cellulaire incubée en présence de concentrations croissantes de ces différents composés. En effet, la LDH (lactate déshydrogénase) est une enzyme intracytoplasmique ne pouvant se retrouver dans le milieu de culture que suite à la perméabilisation de la membrane de cellules mourantes (voir *point 3.2.7*). Connaissant les réactions impliquées dans le procédé sol-gel, la composition des matériaux synthétisés et sachant que les composés cités saturent les pores de l’hydrogel dans lequel se trouvent les cellules encapsulées, nous pourrions évaluer la biocompatibilité des matériaux sol-gel en TiO_2 .

Dans des conditions idéales, sans stress, baignant dans leur milieu, une partie des cellules meurent de façon naturelle. La quantité de LDH dans le milieu, libérée par les cellules en mourant, reste relativement constante et peut servir de référence à l’expérience (contrôle). Si cette quantité dépasse la valeur « contrôle » ($10,1(\pm 1,2) \%$) dans cette expérience, la concentration du produit testé atteint un seuil toxique vis-à-vis des cellules. Les pourcentages de LDH relarguée par les cellules incubées en présence de différentes concentrations en composés testés sont comparés au pourcentage libéré par les cellules « contrôles » et les résultats sont analysés par un test *t* de student, avec une valeur de $p < 0,05$ considérée comme significative (XLSTAT 2013 software, Addinsoft).

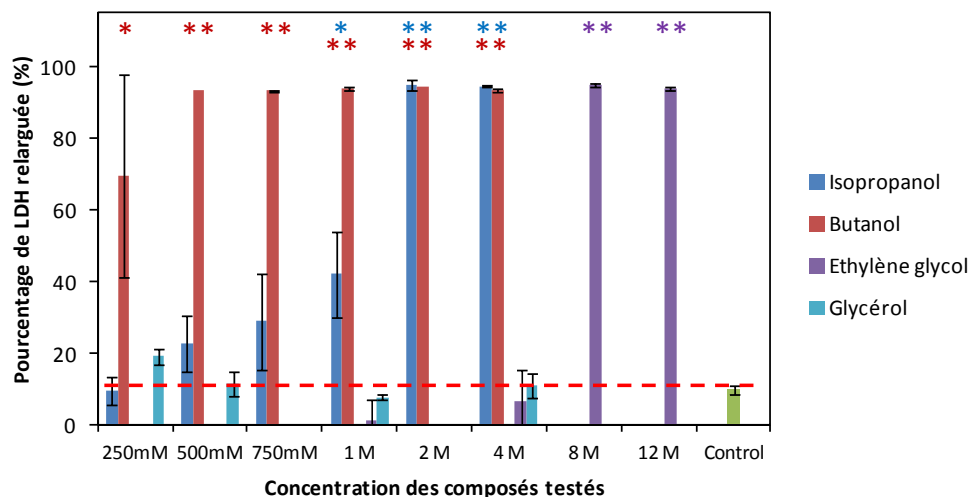


Figure 4.9 : Histogramme illustrant le pourcentage de LDH relarguée en fonction de la concentration de composé ajouté aux cellules. Les résultats sont présentés en moyennes ± écarts-types (n = 3). * p < 0,05, ** p < 0,0001.

La *figure 4.9* illustre le pourcentage de LDH relarguée par les cellules lorsqu'elles sont incubées en présence de différentes concentrations des produits testés. Cette étude permet de tirer les conclusions suivantes :

- (a) L'isopropanol (*bâtonnets bleu foncé*) ne perturbe pas les cellules à faible concentration. La toxicité augmente ensuite graduellement jusqu'à une concentration de 2 M ($p < 0,05$ à partir de 1 M). À partir de là, on atteint un pourcentage de LDH relarguée de 100%, c'est-à-dire que toutes les cellules sont mortes ($p < 0,0001$).
- (b) Le butanol (*bâtonnets rouges*) est hautement toxique puisqu'à chaque concentration, le pourcentage de LDH relarguée est supérieur à celui des cellules contrôles ($p < 0,05$).
- (c) Le glycérol (*bâtonnets bleu ciel*) semble bien toléré par les cellules bien que le pourcentage de LDH relarguée à une concentration de 250 mM soit proche des 20 %. Des études à haute concentration (> 4 M) sont difficiles à mettre en œuvre et n'ont pas été réalisées car le glycérol est particulièrement visqueux et rend donc les manipulations très délicates.
- (d) L'éthylène glycol (*bâtonnets mauves*) est bien toléré jusqu'à une concentration de 4 M. Au-delà, le pourcentage de LDH relarguée atteint les 90% ($p < 0,0001$ à partir de 8 M).

Nous pouvons donc conclure que le butanol n’est absolument pas adapté pour l’encapsulation de cellules. L’isopropanol est lui mieux toléré. Cependant, comme le montrent les *tableaux 4.1* et *4.3*, les différentes matrices ont une concentration en alcool minimale de 2,8 M. L’isopropanol se montre déjà toxique à partir d’une concentration de 1 M ($p < 0,05$). Une solution pourrait être la distillation des alcools du sol avant l’étape de condensation. Mais cette manipulation ne rendrait le contrôle de l’étape d’hydrolyse et la formation du sol qu’encore plus difficile. En ce qui concerne les agents stabilisants, l’éthylène glycol et le glycérol sont tolérés par les cellules jusqu’à une concentration de 4 M. Or, si nous nous référons toujours à ces mêmes *tableaux 4.1* et *4.3*, les matériaux possèdent une concentration minimale en agent stabilisant de 8 M.

Une manière de contourner le problème de toxicité des sous-produits et additifs, ainsi que de contraction matricielle, pourrait être de réaliser une encapsulation préalable des cellules dans des billes d’un biopolymère, l’alginate. Les cellules baigneraient en suspension, sans aucune contrainte mécanique, dans un matériau naturel et biocompatible. Ces billes seraient ensuite elles-mêmes entourées d’une matrice de dioxyde de titane afin de les renforcer et obtenir ainsi des matériaux de type *core/shell*, détaillés au point suivant.

4.2. Les matrices *core/shell*

4.2.1. L’alginate, une matrice naturelle

L’alginate est un copolymère naturel formé d’acide guluronique (G) et mannuronique (M), liés en $\beta(1-4)$ de manière linéaire (*figure 4.10*). Il est extrait d’algues brunes et est couramment utilisé en tant qu’agent gélifiant dans l’industrie alimentaire ou cosmétique ainsi qu’en médecine pour la réalisation d’empreintes dentaires. La proportion en acides guluronique et mannuronique détermine les propriétés physico-chimiques de l’alginate.

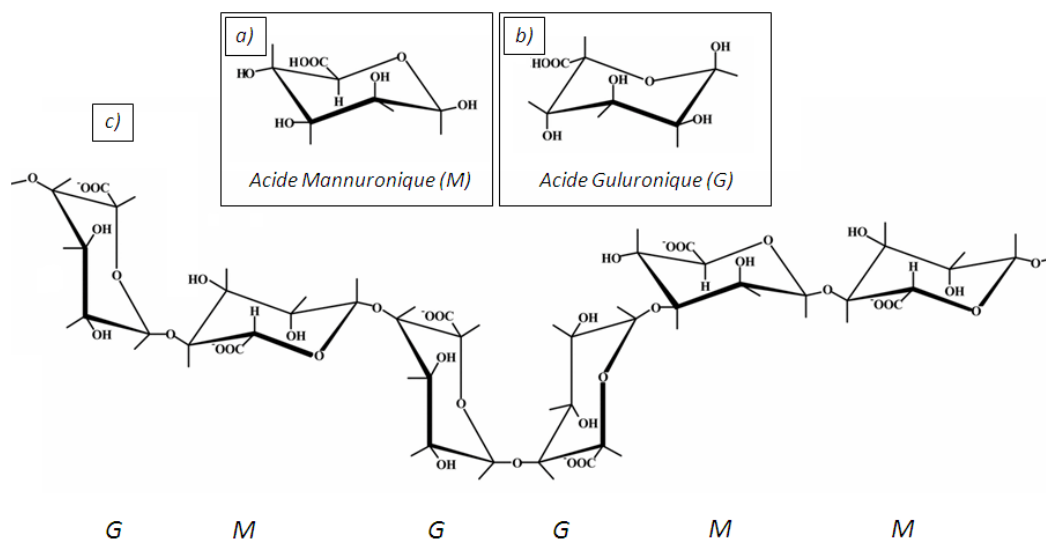


Figure 4.10 : Les acides Mannuronique (unité M) (a) et Guluronique (Unité G) (b) formant le polymère d’alginate (c).

En effet, le phénomène de solidification du biopolymère se déroule au niveau des unités guluroniques (unités G). La *figure 4.10* montre que la liaison d’unités M entre elles forme une structure linéaire tandis que les liaisons d’unités G forment des entonnoirs dans lesquels viennent se complexer des cations divalents. Le copolymère est alors formé d’une partie fixe, les unités G et les cations, et d’une partie mobile, les unités M. Les chaînes d’unités G s’alignent parallèlement pour former un assemblage régulier de type « egg box » (*figure 4.11 a*). La gélification de l’alginate étant provoquée par la présence d’unités G, il va de soi que l’abondance de ces dernières définit la résistance du matériau²¹.

Lorsqu’une solution d’alginate de sodium est ajoutée goutte à goutte dans une solution de cations calcium (CaCl_2), il en résulte la formation de billes avec une croûte externe solide entourant un milieu liquide dans lequel les cellules encapsulées baignent en suspension (*figure 4.11 b*). L’épaisseur de la croûte d’alginate de calcium peut-être modulée en variant le temps d’incubation des billes dans le chlorure de calcium ou en modifiant la concentration en alginate dans la solution de départ. Ce paramètre permet de définir la résistance du matériau ainsi que la cinétique de diffusion des nutriments et métabolites au travers de la matrice. La solubilité de l’alginate est assez faible et une concentration finale de 1,5% est considérée comme appropriée pour la formation rapide de capsules résistantes.

²¹ E.S. O’Sullivan, A. Vegas, D.G. Anderson, G.C. Weir, *Endocr. Rev.*, 2011, **32**, 827-844.

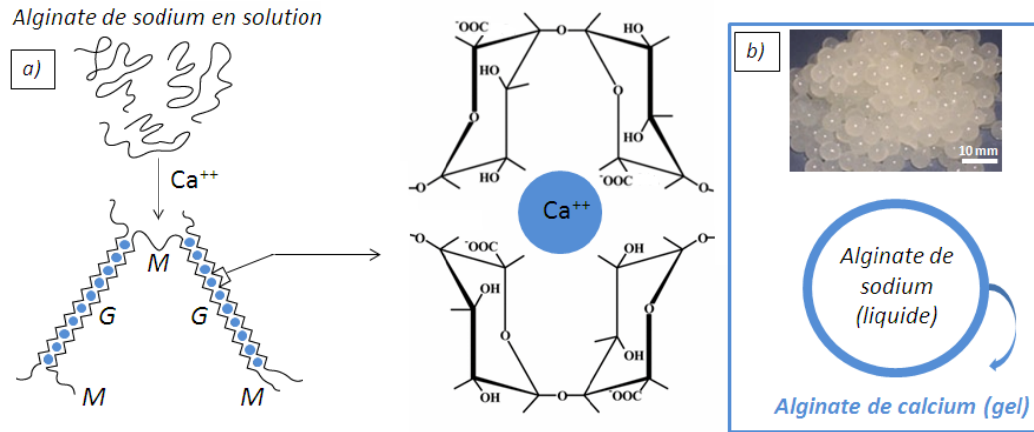


Figure 4.11 : Illustration de la complexation des ions calcium par les unités G de deux chaînes d’alginate modifiant les propriétés viscoélastiques du polymère (a) : l’ajout goutte à goutte d’une solution d’alginate de sodium dans une solution d’ions calcium mène à la formation de capsules avec une couche externe d’alginate de calcium gélifiée et un cœur liquide d’alginate de sodium (b).

L’avantage de cette méthode d’encapsulation, en plus de l’absence de sous-produits toxiques, est la suppression du phénomène de contraction matricielle, observé durant l’étape de vieillissement des matrices sol-gel, qui impose un stress aux cellules. De plus, la microencapsulation permet une meilleure diffusion des nutriments, de l’oxygène et des métabolites grâce à un ratio surface/volume maximisé par rapport à la macroencapsulation au sein d’un gel monolithique²² (figure 4.12).

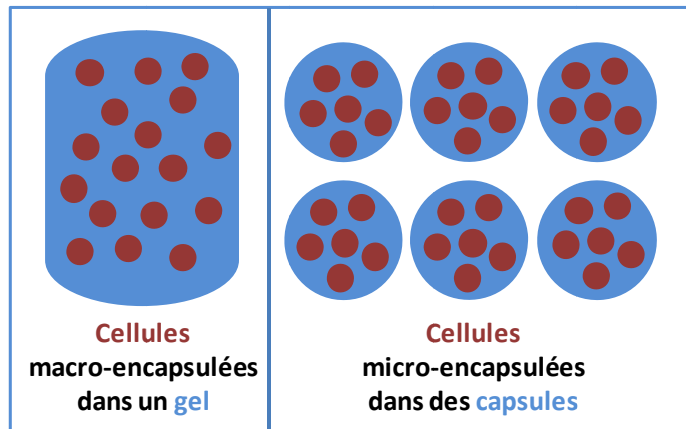


Figure 4.12 : Comparaison entre la macro-encapsulation de cellules dans un gel monolithique (à gauche) et la micro-encapsulation dans des capsules d’alginate (à droite).

²² A. Murua, A. Portero, G. Orive, R.M. Hernández, M. de Castro, J.L. Pedraz, *J. Control. Release*, 2008, **132**, 76-83.

4.2.1.1. *Purification de l’alginate*²³

L’alginate de sodium commercial se présente sous la forme d’une poudre brune. Celle-ci est issue directement de l’algue et contient dès lors un certain nombre de résidus inutiles à notre application tels la cellulose de la paroi cellulaire de la tige de l’algue, des protéines, des acides aminés, ... Un processus de purification est donc mis en œuvre avant l’encapsulation de cellules.

10 g de la poudre commerciale sont tout d’abord dissous dans 1L d’acide éthylène glycol tétra-acétique (EGTA) 1 mM afin d’éliminer certains ions complexant l’alginate comme le magnésium. Cette solution subit alors plusieurs filtrations successives (5 µm à 0,45 µm) et le filtrat est recueilli dans un bain de glace (4°C) avant d’être acidifié à un pH de 1,5 à l’aide d’HCl 2 M. L’alginate précipite alors et les sucres solubles peuvent être éliminés. Le gel ainsi obtenu est filtré et lavé par plusieurs fractions d’HCl 0,01 M afin d’éliminer le reste d’ions tandis que l’ajout de chloroforme et de butanol permet de dénaturer les protéines ayant également précipité. L’alginate est alors resolubilisé en remontant le pH à 7 avec du NaOH 0,5 M et les dernières traces de protéines sont éliminées par l’ajout de chloroforme et de butanol avant centrifugation. Le surnageant, débarrassé des résidus est précipité avec de l’éthanol absolu et le solide est lavé une dernière fois à l’éther. Le produit purifié (solide blanc) est obtenu après séchage plusieurs jours à la pompe à palettes.

4.2.1.2. *Synthèse de capsules d’alginate*

La synthèse de capsules d’alginate et l’encapsulation des cellules en leur sein est assez simple à mettre en œuvre. Les cellules dans leur milieu de culture (ou du milieu sans cellules pour la préparation de matériau contrôle) sont mélangées à une solution aqueuse d’alginate 3 % en masse (1 : 1, v : v). Ce mélange est ajouté goutte à goutte dans une solution de chlorure de calcium 100 mM avec une pipette Pasteur en plastique stérile. La partie externe de la goutte se durcit alors au contact des ions calcium. Les cellules se trouvent en suspension à l’intérieur de la bille, cet intérieur restant liquide. Avant encapsulation, les réactifs sont minutieusement stérilisés. La solution de CaCl₂ est passée au travers d’un filtre 0,2 µm tandis que la solution d’alginate, trop visqueuse que pour être stérilisée de cette façon, est traitée par autoclavage (120°C, 20 minutes). Cependant, ce traitement peut avoir pour effet

²³ P. de Vos, M. Spasojevic, B.J. de Haan, M.M. Faas, *Biomaterials*, 2012, **33**, 5552-5559.

d’hydrolyser les chaînes du polymère et de modifier ses propriétés mécaniques²⁴. Pour conserver ces propriétés après autoclavage, la solution d’alginate fut préalablement sur-concentrée (5 % au lieu de 3 %).

4.2.1.3. Analyse de la porosité et de la morphologie

Préalablement aux mesures d’adsorption-désorption d’azote et de microscopie électronique à balayage, les capsules d’alginate ont été séchées au CO₂ supercritique.

La *figure 4.13* reprend l’isotherme BET et la distribution de taille de pores des capsules et le *tableau 4.5* présente les propriétés texturales du matériau. L’isotherme est de type II et indique que l’alginate est un matériau macroporeux donc inadapté à l’immuno-isolation des cellules.

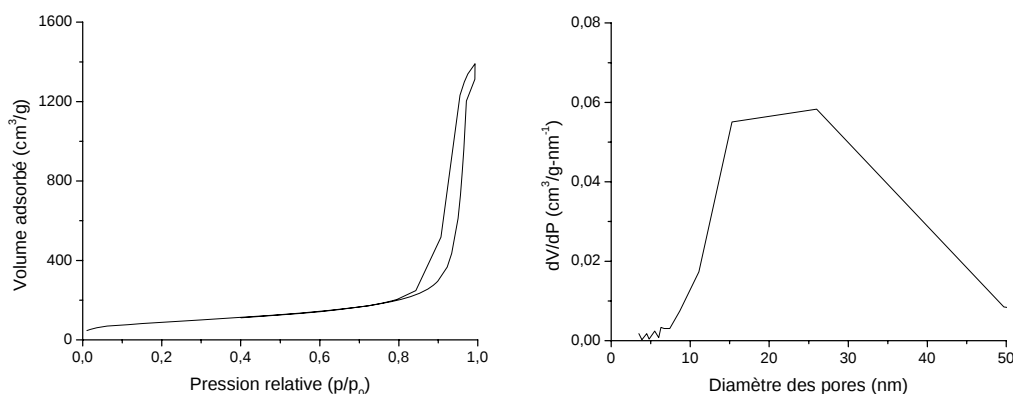


Figure 4.13 : Isotherme BET et distribution de taille de pores de capsules d’alginate purifié.

Tableau 4.5 : Surface spécifique et volume poreux de capsules d’alginate purifié.

	S_{BET} (m²/g)	Volume poreux (cm³/g)
a	319	2,2

La *figure 4.14* représente des micrographies obtenues par MEB de cellules HepG2 encapsulées dans une capsule d’alginate depuis 68 jours (A) et récupérées d’une culture après un repiquage (B). Les dimensions et la morphologie des cellules sont comparables sur les deux images, où l’on peut également observer la matrice

²⁴ K.I. Draget, G. Skjåk-Braek, O. Smidsrød, *Int. J. Biol. Macromol.*, 1997, **21**, 47-55.

extracellulaire à leur surface. Ces observations démontrent l’environnement propice à la survie cellulaire que constitue l’alginate.

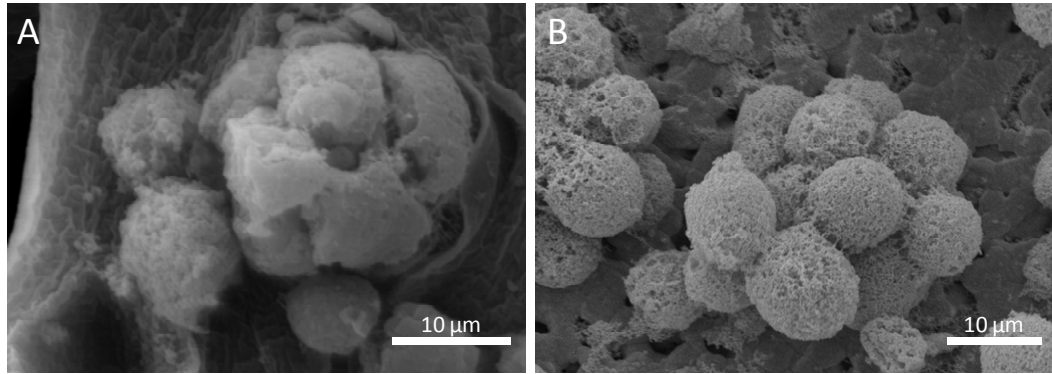


Figure 4.14 : Micrographies obtenues par MEB de cellules HepG2 encapsulées dans une capsule d’alginate depuis 68 jours (A) et non-encapsulées (B).

La *figure 4.15* représente des micrographies de capsules d’alginate obtenues par MEB, montrant la morphologie générale (A) du matériau, de quelques millimètres de diamètre, après 68 jours dans du milieu de culture, la morphologie en surface directement après préparation (B) et après 68 jours de conservation dans du milieu de culture (C). Cette dernière image montre la présence de failles de plusieurs microns à la surface de la matrice 10 semaines après encapsulation alors que l’on n’observe rien de tel sur un matériau « neuf ». Cette observation démontre la faible résistance mécanique de l’alginate, dont les propriétés se trouvent modifiées au cours du temps.

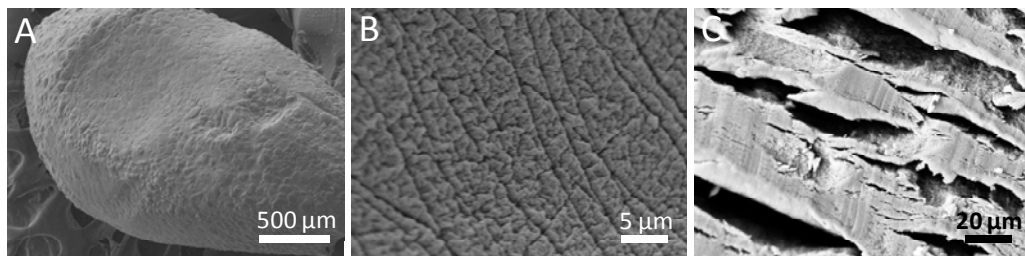


Figure 4.15 : Micrographies de capsules d’alginate obtenues par MEB après 68 jours *in vitro* (A, C) et directement après préparation (B), démontrant l’augmentation de la porosité au cours du temps.

4.2.1.4. *Evaluation de la viabilité des cellules encapsulées dans une matrice d’alginate*

La *figure 4.16* présente l’étude de la survie des cellules encapsulées dans des capsules d’alginate réalisée par oxymétrie. La viabilité des cellules a pu être maintenue pendant plus de six semaines et l’augmentation de la respiration relative jusqu’à 200 % après ce laps de temps suggèrent une prolifération modérée des cellules encapsulées.

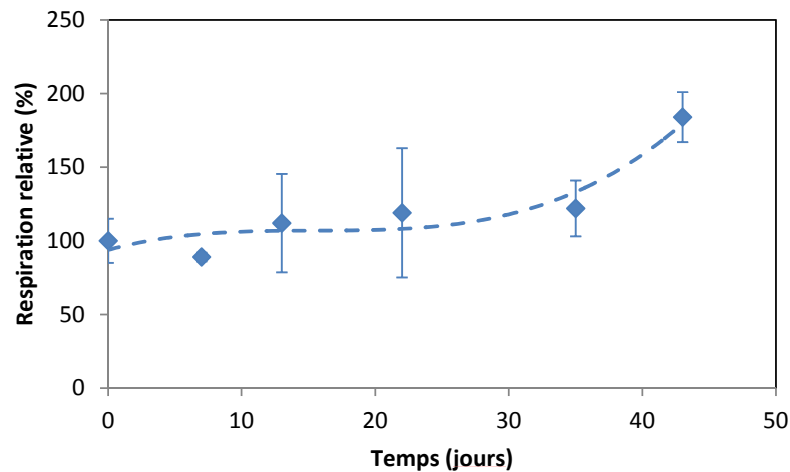


Figure 4.16 : Consommation d’oxygène des cellules HepG2 encapsulées dans une capsule d’alginate purifié au cours du temps, la valeur de 100 % de respiration relative correspondant à la consommation d’oxygène le jour de l’encapsulation. Les résultats sont présentés en moyennes $\pm$ écarts-types ($n = 3$).

4.2.2. Synthèse de matrices *core/shell*

L’alginate s’avère donc être un matériau biocompatible, maximisant la diffusion des nutriments et métabolites grâce à un ratio surface/volume nettement supérieur à celui d’un gel monolithique et préservant les cellules de tout stress mécanique, comme le montre le maintien de leur survie sur une durée de plus de six semaines. Mais la porosité, supérieure à 50 nm, est loin d’être adaptée à l’immuno-isolation des cellules encapsulées et ce d’autant plus que celle-ci tend à augmenter au cours du temps. De plus, la faible résistance mécanique du polymère rend utopique l’idée d’en faire un implant pouvant être conservé *in vivo* pendant plusieurs décennies. La porosité et la résistance mécanique étant justement les atouts des matrices en dioxyde de titane, nous avons envisagé de combiner les qualités de ces dernières avec

celles de l’alginate. Les cellules seraient encapsulées au sein de capsules d’alginate, qui seraient elles-mêmes renforcées en étant immobilisées au sein d’un gel de TiO_2 , pour former une matrice de type « core/shell » (*figure 4.17*). Ce type de matrice pourrait de la sorte résoudre le problème de toxicité des sous-produits et de contraction matricielle du procédé sol-gel.

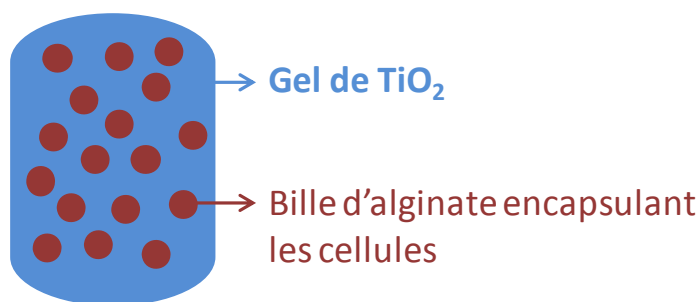


Figure 4.17 : Représentation schématique d’une matrice *core/shell* alginate- TiO_2 .

4.2.3. Etude de la survie des cellules encapsulées

L’encapsulation des cellules HepG2 dans les matrices core/shell nécessite de réaliser une pré-encapsulation préalable dans de simples capsules d’alginate purifié, comme décrit au *point 4.2.1.2*. La deuxième étape consiste à placer ces capsules dans le sol de titane, à l’aide d’une cuillère stérile. Une quantité de milieu de culture frais prédéfinie est ensuite ajoutée à ce mélange afin d’amorcer l’étape de gélification. Nous obtenons finalement un matériau core/shell tel que représenté à la *figure 4.17*.

Le gel de TiO_2 fut préparé à partir d’éthylène glycol et d’alkoxydes de titane ($\text{Ti}(\text{OiPr})_4$ et $\text{Ti}(\text{OBu})_4$). L’utilisation de glycérol comme agent stabilisant fut abandonnée en raison de l’impossibilité d’obtenir un gel à pH physiologique susceptible de maintenir en vie les cellules encapsulées. La survie des cellules au sein des matrices core/shell a été évaluée à l’aide de la microscopie à fluorescence et du kit de détection composé de calcéine AM et d’éthidium homodimère (LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit for mammalian cells, Invitrogen) dont le principe est décrit au *point 3.3.3*. Pour résumer, les cellules maintenant toujours une activité enzymatique des estérases intracellulaires présentent une fluorescence verte tandis que les cellules mortes ayant leur membrane plasmique endommagée présentent une fluorescence rouge.

La *figure 4.18* présente des images obtenues par microscopie à fluorescence un jour après encapsulation. Elles révèlent uniquement des cellules mortes. A aucun moment une fluorescence verte n’a pu être observée. Cette observation révèle que malgré la pré-encapsulation dans l’alginate, la survie des cellules ne peut être maintenue. Le problème ne provient sans doute pas de la contraction matricielle, les sphères de biopolymère maintenant une forme intacte dans les gels 24 heures après encapsulation mais plutôt de la toxicité des sous-produits et agents stabilisants du procédé sol-gel qui pénétreraient dès lors à l’intérieur des capsules et affecteraient les cellules.

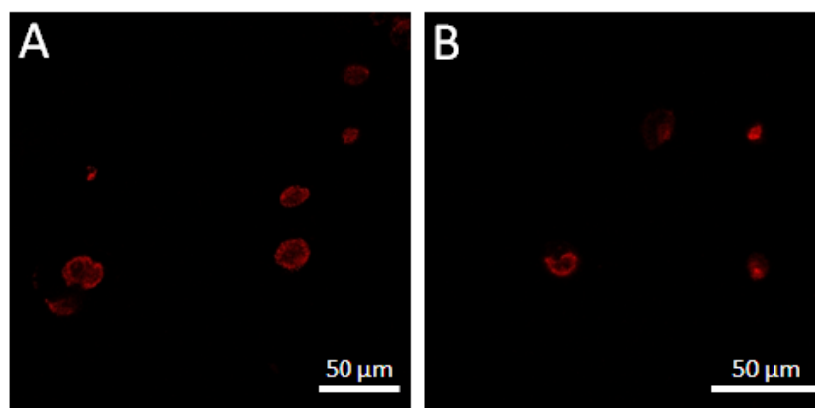


Figure 4.18 : Micrographies obtenues par microscopie optique de cellules HepG2 encapsulées dans une matrice *core-shell* alginate/Ti(OiPr)₄ : éthylène glycol (1 : 14) (A) et alginate/Ti(Obu)₄ : éthylène glycol (1 : 10) (B).

4.3. Conception de capsules hybrides alginate@TiO₂

Les matrices préparées à partir d’alkoxydes de titane ne sont donc pas adaptées à l’encapsulation cellulaire, même en réalisant une pré-encapsulation dans des capsules d’alginate. Quant à ces dernières, si elles permettent de prolonger la survie des cellules encapsulées pendant plus de 6 semaines, leur faible résistance mécanique et leur porosité semblant augmenter au cours du temps sont de sérieux freins à une utilisation *in vivo* prolongée.

Récemment, une nouvelle méthode de préparation du dioxyde de titane fut mise en évidence dans la littérature, directement influencée par la formation du squelette silicé des diatomées. En effet, il a été démontré que des polyamines à longue chaîne pouvaient catalyser la réaction de biosilicification de ces végétaux

unicellulaires^{25,26,27,28,29,30}. De la même manière, certains polyélectrolytes tels que la poly-L-lysine (PLL) ou le chlorure de poly(diallyl diméthyl ammonium) (PDDAC) sont capables de provoquer la formation de TiO_2 à partir d’un précurseur de titane non-alkoxydique et stable en solution aqueuse, le bis(ammonium lactato) dihydroxyde de titane(IV) (TiBALDH)^{31,32,33}. Le mécanisme de formation du TiO_2 selon cette méthode n’est toutefois pas clairement défini et diverses hypothèses sont émises, impliquant la présence d’interactions électrostatiques entre les charges positives du polymère et le précurseur ainsi qu’un phénomène de coacervation, sans pouvoir les confirmer jusqu’à maintenant. Tout au plus observe-t-on une influence du nombre de charges positives^{29,30,34} et du nombre de fonctions amine³⁵ du polymère sur la formation de TiO_2 à partir du TiBALDH.

L’article joint ci-après décrit la synthèse de microcapsules hybrides alginate@ TiO_2 préparées selon un procédé en une étape, à température ambiante en utilisant le précurseur décrit ci-dessus (TiBALDH) qui forme une couche de dioxyde de titane amorphe³⁶ autour de capsules d’alginate en interagissant avec une polyamine biocompatible (PDDAC)³⁷. Les structures moléculaires du précurseur et du polycation sont reprises à la *figure 4.19*.

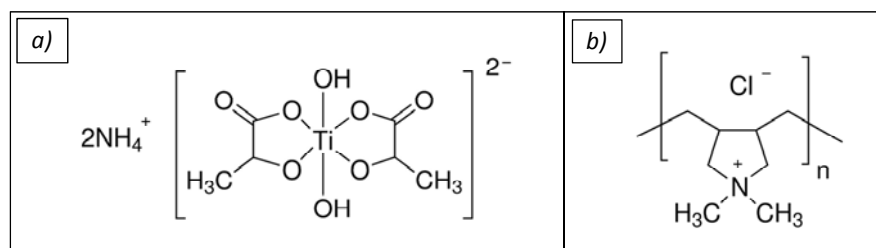


Figure 4.19 : Structure du bis(ammonium lactato) dihydroxyde de titane(IV) (a) et du chlorure de poly(diallyl diméthyl ammonium) (b).

²⁵ S.V. Patwardhan, S.J. Clarson, *J. Inorg. Organomet. Polym.*, 2003, **13**, 193-203.

²⁶ D.J. Kim, K.-B. Lee, Y.S. Chi, W.-J. Kim, H.-J. Paik, I.S. Choi, *Langmuir*, 2004, **20**, 7904-7906.

²⁷ Y. Yan, B. Hao, X. Wang, G. Chen, *Dalton Trans.*, 2013, **42**, 12179-12184.

²⁸ S.H. Yang, E.H. Ko, I.S. Choi, *Langmuir*, 2012, **28**, 2151-2155.

²⁹ N. Kröger, K.H. Sandhage, *MRS Bull.*, 2010, **35**, 122-126.

³⁰ M.B. Dickerson, K.H. Sandhage, R.R. Naik, *Chem. Rev.*, 2008, **108**, 4935-4978.

³¹ X. Shi, T. Cassagneau, F. Caruso, *Langmuir*, 2002, **18**, 904-910.

³² Y. Jiang, D. Yang, L. Zhang, Q. Sun, X. Sun, J. Li, Z. Jiang, *Adv. Funct. Mater.*, 2009, **19**, 150-156.

³³ S.L. Sewell, D.W. Wright, *Chem. Mater.*, 2006, **18**, 3108-3113.

³⁴ H.R. Luckarift, M.B. Dickerson, K.H. Sandhage, J.C. Spain, *Small*, 2006, **2**(5), 640-643.

³⁵ K.E. Cole, A.M. Valentine, *Biomacromolecules*, 2007, **8**, 1641-1647.

³⁶ K.E. Cole, A.N. Ortiz, M.A. Schoonen, A.M. Valentine, *Chem. Mater.*, 2006, **18**, 4592-4599.

³⁷ D. Fischer, Y. Li, B. Ahlemeyer, J. Krieglstein, T. Kissel, *Biomaterials*, 2003, **24**, 1121-1131.

Ces microcapsules hybrides présentent une forme différente que celle des matrices core/shell où des capsules d’alginate contenant des cellules sont elles-mêmes immobilisées dans un gel monolithique de dioxyde de titane (*figure 4.17*). En effet, cette méthode permet de former des capsules telles que décrites à la *figure 4.12* mais renforcées par une fine couche de TiO_2 à leur surface, permettant de conserver un ratio surface/volume optimal (*figure 4.20*).

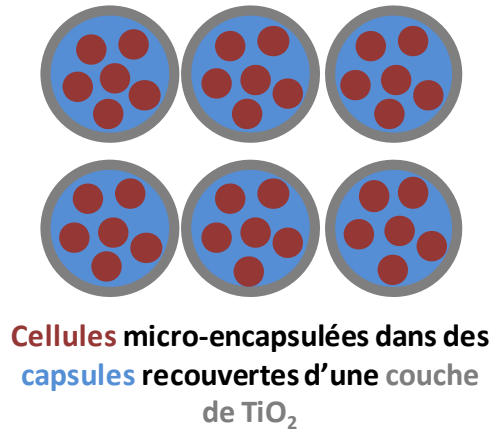


Figure 4.20 : Représentation schématique d’une microcapsule hybride alginate@TiO₂.

L'article qui suit met en évidence :

- La préservation de la survie des cellules encapsulées au sein des microcapsules hybrides pendant une période de 43 jours, à l'instar des simples capsules d'alginate ;
- La porosité adaptée à l'immuno-isolation des cellules encapsulées et à la diffusion des nutriments et métabolites ;
- La résistance mécanique améliorée par rapport aux simples capsules d'alginate et à des billes minéralisées de type alginate-silice.

Design of Hybrid Alginate@TiO₂ Microcapsules as a Reservoir of Animal Cells and Drug Delivery System for Cell Therapy

Grégory Leroux^{1,a}, Christophe F. Meunier^{1,b}, Carine Michiels², Bao-Lian Su^{1,*}

¹Laboratory of Inorganic Materials Chemistry (CMI),

²Laboratory of Biochemistry and Cellular Biology (URBC) - NARILIS
University of Namur, 61 rue de Bruxelles, B-5000 Namur, Belgium

ABSTRACT

Background: The number of patients suffering from diseases linked with hormone deficiency (e.g. type 1 diabetes mellitus) has significantly increased in recent years. As organ transplantation presents its limits, the design of novel robust devices for cell microencapsulation is of great interest.

^a Assistant at University of Namur, Belgium

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

* Corresponding author. tel: +32 81 724531, fax +32 81 725414, e-mail Address:

bao-lian.su@unamur.be

Methodology/Principal findings: The current study reports the design of a novel hybrid alginate microcapsule reinforced by titania. Titanium dioxide was obtained via a bio-inspired synthesis from an aqueous stable titanium precursor (TiBALDH) and a cationic polyamine (PDDAC) under mild conditions at room temperature. The relevance of this technique compared to traditional sol-gel process involving alkoxytitanium was supported by the evaluation of the cytotoxicity of precursors measured by LDH release. The hybrid material was characterized by various techniques in order to assess key parameters for immune-isolation and drug delivery such as porosity and mechanical strength. Material displayed a porosity of about 4 to 12 nm, a key parameter allowing the diffusion of essential nutrients and metabolites while avoiding the entry of immune defenders. The hybrid alginate@TiO₂ microcapsule also showed an enhanced mechanical resistance compared to alginate capsule or alginate/silica mineralized beads making it an ideal candidate as “artificial organ”. HepG2 model cells encapsulated inside the novel microcapsules remain intact over 43 days as highlighted by the measurement of their oxygen consumption, their staining by a viability probe and the monitoring of their albumin secretion outside the microcapsule.

Conclusions/Significance: The present work assessed the relevance of using hybrid alginate@TiO₂ microcapsules for the entrapment of animal cells as their viability and functionality can be preserved over 6 weeks. Their improved properties of biocompatibility, porosity and mechanical strength make them very interesting as a drug delivery system to substitute organ transplantation.

1. INTRODUCTION

Transplantation of xenogeneic cells or tissues that produce desired proteins can potentially treat multiple human disorders such as protein or hormone deficiencies, overcoming the usual obstacles of limited supply of donor tissue and drawbacks of common treatments. Among these disorders, we can quote type 1 diabetes mellitus, Parkinson's disease, Alzheimer's disease, dwarfism, anaemia or factor VII or IX deficiency in haemophilia [1-10]. Particularly, type 1 diabetes mellitus is a disease characterized by the attack of the insulin secreting β -cells by the immune system of the patient, which leads to their death. A promising concept to treat this disease is immune-isolation of encapsulated cells.

Typically, this idea can be realised by an inert porous system or semi-permeable membrane that preserves the biological activity of the entrapped cells and protects them against mechanical stress. The defined porosity of the membrane would allow the entrance of essential nutrients and oxygen and the output of the metabolites and molecules of interest (e.g. insulin for treatment of diabetes), while avoiding the attack from the immune defenders [11, 12]. The specific value of the ideal porosity is somehow difficult to define. The molecular weight of the smallest known immune defender (IgG, immunoglobulin G) is evaluated around 150 kDa [13, 14]. According to the relationship between molecular weight and Stokes radius, it matches with a size of about 17 nm although literature generally mentioned a pore size of up to 20 nm [15-19].

Since the first works involving immune-isolation published 80 years ago by Bisceglie [20], many studies have been initiated. Various types of materials suitable for encapsulation of whole cells, allowing a very wide range of medical and other applications, have been developed. These biocompatible structures can be classified in

two major categories: biopolymer microcapsules (*microencapsulation*) and inorganic oxide-based monolithic gels (*macroencapsulation*) [21].

Microencapsulation consists in entrapping the cells within a biopolymeric matrix that presents in the form of a microsphere characterized by the presence of the enclosed biological material in suspension in a liquid core surrounded by a semi-permeable solid crust [22]. Among this type of material, along with chitosan, poly(hydroxyethyl methacrylate-co-methyl methacrylate) (Poly(HEMA-MMA)), agarose or collagen, alginate is certainly the most widespread [23-27]. It is a natural copolymer formed of mannuronic acid (M units) and galuronic acid (G units) which is extracted from brown algae and is commonly used as gelling agent in food or medicine, for example to make dental prints. As the crude commercial powder contains generally contaminants such as proteins, a purification protocol is applied before bioencapsulation [28]. It is also possible to modulate the proportion of M units and G units in order to define the desired viscosity [29, 30]. But the main problem of this material is the poor mechanical stability over time. It is also a macroporous material with a pore size of more than 50 nm that tends to increase over time. The coating of the anionic alginate by polycationic molecules, such as the most employed poly-L-lysine (PLL), poly-D-lysine, poly-L-ornithine (PLO) or chitosan slightly improves the mechanical resistance of the microcapsules [31-33].

Macroencapsulation allows the encapsulation of cells in amorphous monolithic silica or titania matrices under physiological conditions, in aqueous environment and with a consequently improved mechanical resistance, thermal and chemical stability over time. It presents also the advantage of a modular pore size with a high specific surface area [34-36]. However, besides the mechanical stress induces on the encapsulated material due to the matrix contraction, these types of materials are

prepared from alkoxide precursors that liberate toxic by-products such as short chain alcohols during hydrolysis reaction of the sol-gel process [37]. Macroencapsulation shows also a worse diffusion of nutrients, oxygen and metabolites as the surface/volume ratio is reduced compared to spherical microcapsules [38, 39].

It appears to be of great interest to combine the advantages of both approaches to enhance the mechanical stability of biocompatible alginate with resistant silica or titania of adapted porosity in order to obtain a device for microencapsulation of cells not undergoing any mechanical stress. Some methods have been reported to design alginate/silica hybrid microcapsules with an external layer of silica deposited around the alginate sphere [40-42].

Recently, the design of alginate/silica whole mineralized beads recovered with an external layer of alginate with an improved mechanical strength and excellent biocompatibility has been reported [43]. These beads are prepared using sodium silicate as precursor and exhibit a pore size adapted to immune-isolation of encapsulated cells. However, a slow dissolution of silica occurring *in vivo* remains a problem to be solved [34].

Improved pH stability, thermal resistance and mechanical strength of titania-based materials are often referenced. Moreover, Lopez *et al.* demonstrated the biocompatibility of titania towards a living body by implanting a drug delivery system into the temporal lobe of the brain of rats [44]. These promising results indicate the possibility of using titania for animal cell encapsulation although literature does not reference such studies. However, the sol-gel process cannot be directly used for cell encapsulation due to the release of toxic alcohol molecules by hydrolysis and condensation reactions if metal alkoxide precursors are used [37]. Although pure silica as matrix obtained by a modified sol-gel process for cell encapsulation showed its

excellent suitability and can maintain the viability of cells for several weeks [45, 46], the shrinking effect leading to a strong silica network contraction with the loss of water content with time will induce progressively the death of cells. The combination of a biopolymer such as alginate used in microencapsulation and a TiO₂ crust, more resistant mechanically than SiO₂, could be the solution for a successful cell encapsulation and for a long term viability.

We report here the design and synthesis of original biocompatible hybrid alginate/titania core/shell microcapsules under mild conditions and in a one-step and very simple and rapid process. The choice of the precursor has been made on the basis of our cytotoxicity test: titanium(IV) bis(ammonium lactato)dihydroxide (TiBALDH). This aqueous precursor is stable at ambient temperature but can be destabilized by polycations like poly(diallyldimethylammonium) chloride (PDDAC) that will allow the polymerization of TiBALDH to form TiO₂ at the surface of the alginate capsules, reinforcing them and decreasing the pore size at the surface to avoid the entry of immune defenders while solving the problem of silica dissolution [47]. This hybrid material would be of great promise for the encapsulation for example of insulin-secreting xenogeneic β -cells or pancreatic islets for the treatment of type 1 diabetes mellitus to maintain glucose homeostasis. Human hepatocellular carcinoma cells (HepG2) have been used in this work as model cells for encapsulation test because of their similarity in size and in shape with β -cells, their high availability and their continuous secretion of albumin allowing the diffusion study of hormone outside of the hybrid microcapsules.

2. RESULTS AND DISCUSSION

2.1. Design of the material

Titanium dioxide (TiO₂) can be prepared by various methods such as chemical vapor deposition [48], electrodeposition [49, 50], ion beam-assisted process [51], sol-gel [44, 52] or hydrothermal methods [53]. However, the methods other than sol-gel process mentioned above are not applicable for animal cells encapsulation because of the harsh conditions of synthesis, involving high temperature and pressure or toxic chemicals. It is well known that the sol-gel process, a green and “chimie douce” technology, could allow the *in-situ* cell encapsulation by mixing them with a sol before the condensation reaction leading to the formation of a monolithic gel containing the cells, under mild conditions [34, 46]. These amorphous hydrogels can be obtained via hydrolysis and condensation of alkoxy precursors (e.g. Ti(OiPr)₄, Ti(Obu)₄). Unlike silica sol-gel synthesis, the hydrolysis and condensation rates of titania precursors are very fast and difficult to control. This is due to the nature of titanium which, as a transition metal, possesses an insaturation of coordination that makes it very electrophilic and very reactive towards water, especially for short chain alcohols such as methanol or ethanol. As a consequence, instead of monolithic gels, precipitates are obtained. The hydrolysis and condensation rates can be regulated by the use of biocompatible chelating ligands or stabilizing agents such as glycerol or ethylene glycol that decrease the reactivity of precursors [54-56]. Moreover, despite the mild conditions of synthesis, this preparation method presents also other drawbacks regarding biocompatibility such as the release of potentially toxic by-products (e.g. isopropanol, butanol). Indeed, Lee *et al.* referenced the negative effects of short-chain alcohols like methanol and ethanol towards the phospholipid bilayers of which cell membranes are composed [57].

It is crucial to firstly study the cytotoxicity of isopropanol and butanol, the by-products of potentially less reactive alkoxytitanium, as well as that of chelating ligands such as glycerol and ethylene glycol. The cytotoxicity test can help us to evaluate the concentration upper limit of these compounds which can be tolerated by HepG2 cells after 5 hours of incubation. The results are presented in Figure 1, where “control” represents the reference, namely the basal death of the cells (10.1(±1.2) % of dead cells). Isopropanol did not affect cells at low concentration but its toxicity increased gradually to reach 100 % of dead cells at the concentration of 2 M ($p < 0.0001$). Butanol seems more toxic even at low concentrations. Different results were obtained for the polyols as ethylene glycol is quite well tolerated up to a concentration of 4 M. Beyond this concentration, the quantity of dead cells reached 90 % ($p < 0.0001$). Finally, glycerol seemed also to be well tolerated by HepG2 cells since the percentage of cytotoxicity did not reach more than 19 % (for the 250 mM concentration).

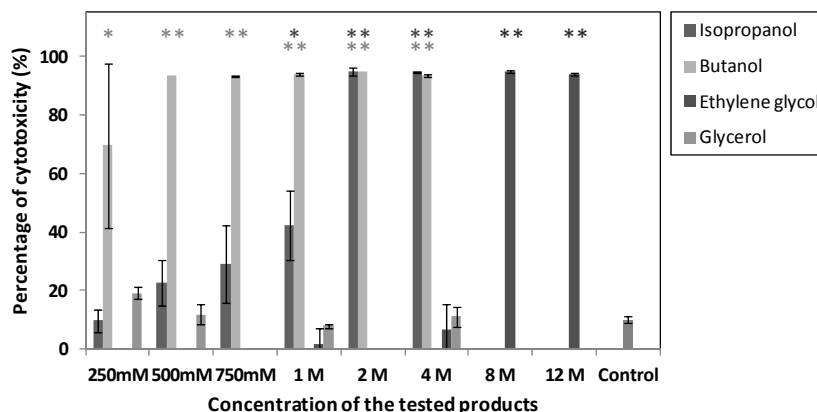


Figure 1. Concentration-dependent effects of different sol-gel by-products or stabilizing agents on HepG2 cells after 5 hours of incubation.

The damaging effect of chemicals on the cell membrane was quantified by measuring the release of the intracytoplasmic enzyme LDH. Results are presented in percentage of cytotoxicity as means $\pm$ 1 S.D. ($n = 3$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.0001$ compared to the basal death of the cells (control).

It can be concluded that classic sol-gel process using alkoxytitanium is not adapted for cell encapsulation. It has been reported that long chain polyamines, such as PLL, PDDAC or amine-terminated dendrimers, interacting with silicic acid derivatives can allow the biosilicification in diatoms. These molecules are also able to form titania from aqueous solution of water stable TiBALDH under mild conditions [58-65].

The study on the cytotoxicity of the aqueous precursor TiBALDH towards HepG2 cells was also carried out. The results are presented in Figure 2. Basal control of cell death was 14.9(±2.9) %. The results present the same trend as for glycerol, namely a non-toxic substance at the highest concentrations even if the toxicity reached 23 % for the 10 mM concentration, which remained acceptable.

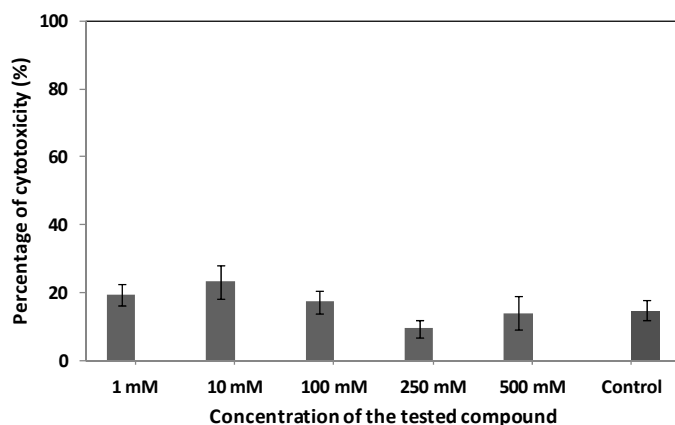


Figure 2. Concentration-dependent effects of titanium aqueous precursor on HepG2 cells after 5 hours of incubation.

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

These observations confirm the potentiality of TiBALDH as TiO₂ precursor to be employed for animal cell encapsulation and its incoity when mixed directly with HepG2 cells for a long period of time. The formation of an ideal robust, biocompatible and semi-permeable material requires the use of alginate to act firstly as a host for the biological material and secondly as a template for the polymerization of TiBALDH to

obtain a hybrid mechanically resistant external layer composed of calcium alginate and TiO₂. The destabilization of the titanium precursor is induced by a water-soluble cationic molecule (PDDAC), being biocompatible [66]. We also hypothesize the presence of a distal layer of PDDAC by direct electrostatic interactions with the negatively charged capsule, reinforcing even more the material (Figure 3). The final product is present in the form of a robust white-colored bead (revealing the formation of TiO₂) of about 5 mm of diameter. It is worth noting that the toxicity of lactate as a by-product cannot be assessed by measuring the release of LDH as it would present obvious interferences with the kit. PDDAC also exhibited interferences.

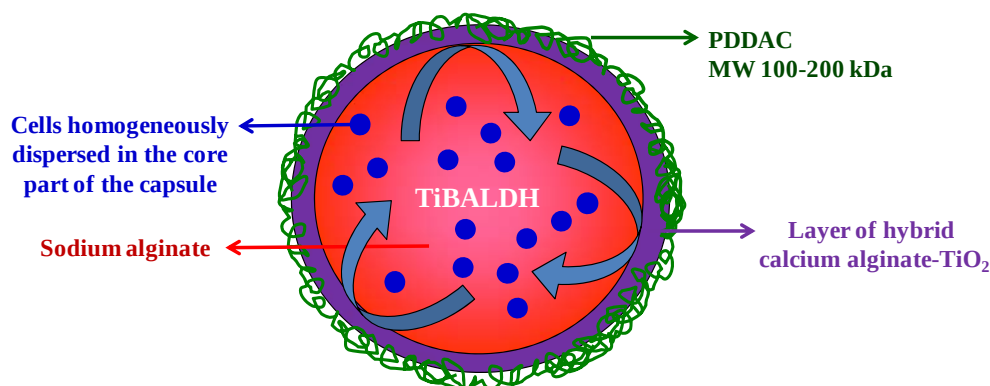


Figure 3. Mechanism of formation of the hybrid alginate@TiO₂ microcapsule.

Alginate acts as a template where TiBALDH polymerizes under the action of the catalyst PDDAC to form a liquid sodium alginate cell container surrounded by a robust bilayer of hybrid calcium alginate-TiO₂ and PDDAC.

2.2. Material characterization

The characterization of the alginate@TiO₂ microcapsules and the evaluation of their potential to maintain the viability of the encapsulated cells and to act as a drug delivery system are then carried out. The mechanical strength improvement compared to alginate or alginate/silica composite is also investigated.

The polymerization of the titanium precursor around alginate spheres in the presence of the polycationic macromolecule PDDAC was demonstrated by the decrease

in optical transparency over time. The core/shell capsule was incubated in the PDDAC-CaCl₂ solution. The brightfield mode micrographs were collected every 10 minutes during 30 minutes (Figure 4A). These micrographs were compared with those of microcapsules synthesized by dropping a mix of alginate/TiBALDH in a CaCl₂ solution without PDDAC (Figure 4B) and those of material prepared by extruding alginate without TiBALDH in a solution of PDDAC and CaCl₂ (Figure 4C). We observed that the optical transparency of pure alginate was conserved when only the titanium precursor or the polycation was involved in the capsule synthesis but that it became opaque when the two substances were brought into contact.

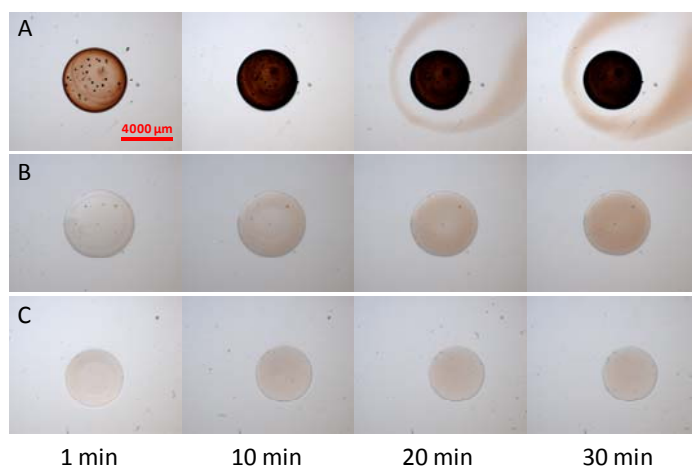


Figure 4. Microscopy pictures illustrating the reaction between PDDAC and TiBALDH to form an external layer of TiO₂ around alginate capsules.

Brightfield pictures taken over time of (A) alginate/TiBALDH 250 mM/PDDAC+CaCl₂, (B) alginate/TiBALDH 250 mM/CaCl₂ and (C) alginate/PDDAC+CaCl₂ capsules.

The diameter of these capsules was also determined by optical microscopy and the evolution of this diameter with time of reaction is presented in Figure 5. The interaction of the polycationic macromolecule PDDAC with negatively charged alginate decreased the diameter of the capsule while it was not the case when titanium precursor was used alone. In fact, alginate is a swelling component that is stabilized by the deposition of a layer of polycation. The difference of about 500 μm between the

diameter of a capsule prepared with sole PDDAC and that of a microcapsule prepared with PDDAC and TiBALDH came from the polymerization of the precursor to obtain a layer of TiO₂. It is worth noting that the time of incubation in the solution of PDDAC and CaCl₂ or CaCl₂ alone also stabilized the capsules.

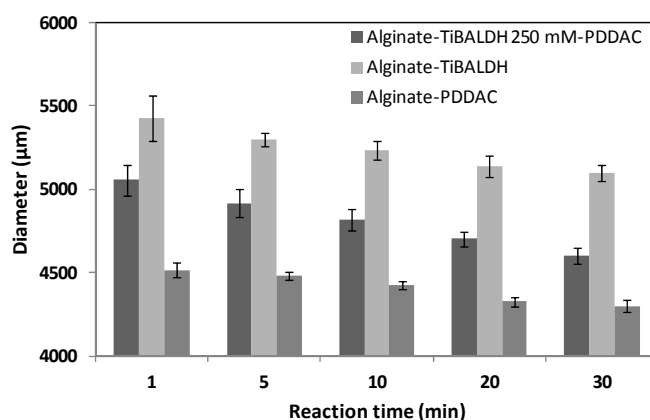


Figure 5. Evolution of the diameter of the capsules with time of reaction.

Comparison between different types of capsules. Results are presented as means $\pm$ 1 S.D. (n = 3).

In order to assess their porosity and their morphology, capsules of various compositions were supercritically dried with liquid carbon dioxide to avoid capillary actions that would drive the collapse of the structure. Aerogels with preserved porous networks can be obtained. Their textural properties were characterized by nitrogen adsorption and desorption measurements. The isotherms are presented in Figure 6. They are all type II isotherms according to the IUPAC which means that the microcapsules, whatever their composition, are of macroporous materials classification. Results indicate a slight increase in the specific surface area (Table 1) when PDDAC and TiBALDH were added together in the synthesis. This result suggests an enhancement of the porosity, which is an important parameter for our application as it would improve the diffusion of nutrients and metabolites.

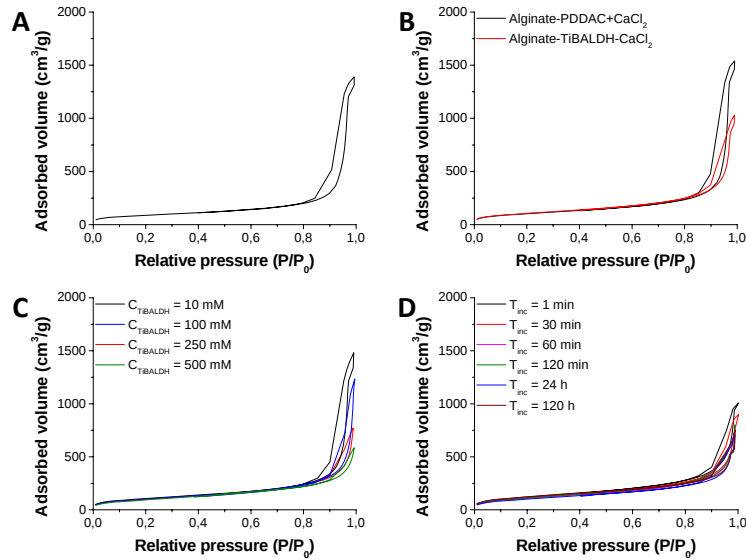


Figure 6. Nitrogen adsorption-desorption isotherms.

Isotherms obtained by analysis of purified alginate capsules (A), capsules formed by dropping purified alginate in a polycation and calcium chloride solution and capsules formed by dropping a mix of purified alginate and titania precursor in a calcium chloride solution (B) alginate@TiO₂ mineralized capsules with different concentrations of titanium precursor (C) and alginate@TiO₂ mineralized capsules ([TiBALDH] = 250 mM) with different times of incubation in the polycation and calcium chloride solution (D).

Composition of the capsules	S_{BET} (m ² /g)	Pore volume (cm ³ /g)
Pure alginate	319	2,2
Alginate/PDDAC+CaCl ₂ 100 mM	378	2,4
Alginate/TiBALDH 250 mM/CaCl ₂ 100 mM	392	1,6
Alginate/TiBALDH 10 mM/PDDAC+CaCl ₂ 100 mM	392	2,3
Alginate/TiBALDH 100 mM/PDDAC+CaCl ₂ 100 mM	379	1,9
Alginate/TiBALDH 250 mM/PDDAC+CaCl ₂ 100 mM	378	1,2
Alginate/TiBALDH 500 mM/PDDAC+CaCl ₂ 100 mM	354	0,9
Alginate@TiO ₂ – T _{inc} = 1 min	392	2,3
Alginate@TiO ₂ – T _{inc} = 30 min	423	1,4
Alginate@TiO ₂ – T _{inc} = 60 min	403	1,1
Alginate@TiO ₂ – T _{inc} = 120 min	411	1,2
Alginate@TiO ₂ – T _{inc} = 24 h	378	1,1
Alginate@TiO ₂ – T _{inc} = 120 h	449	1,2

Table 1. Determination of the specific surface area (S_{BET}) and pore volume of microcapsules.

Comparison between different compositions. Alginate@TiO₂ refers to mineralized microcapsules prepared with a 250 mM TiBALDH solution.

The aerogels were also characterized by scanning electron microscopy (SEM). Figure 7 shows very few differences in shape morphology between purified alginate capsules and alginate@TiO₂ microcapsules except that the external surface seems denser in the case of the mineralized capsule after 68 days passed in the culture medium. Indeed, the surface of alginate capsule exhibited important cracks of about 10 μm (Figure 7B(i)) while the external surface of mineralized capsules is well preserved (Figure 7D), suggesting an improved mechanical strength in the case of the mineralized microcapsule. Micrograph of alginate surface obtained directly after preparation (Figure 7B(ii)) shows that the porosity of this type of capsule increased over time.

A cross section of an alginate@TiO₂ capsule is shown in Figure 8, allowing the observation of the layer of TiO₂ around the capsule and the difference of morphology between this layer and the core of the capsule, showing a core/shell structure. HepG2 cells immobilized in the core part of the material with a well-preserved morphology were also visible.

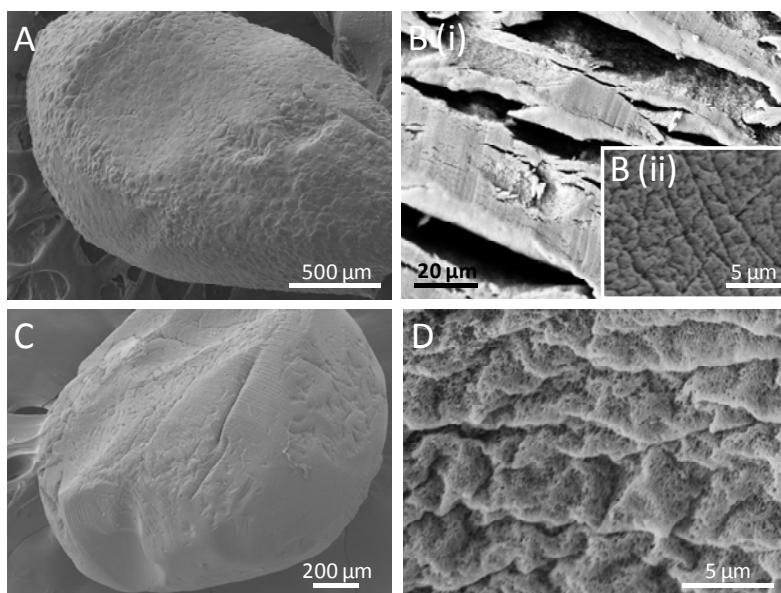


Figure 7. Scanning electron microscopy micrographs of purified alginate capsules (A, B) and alginate@TiO₂ mineralized microcapsules (C, D).

The capsules were supercritically dried with CO₂ prior to analyses.

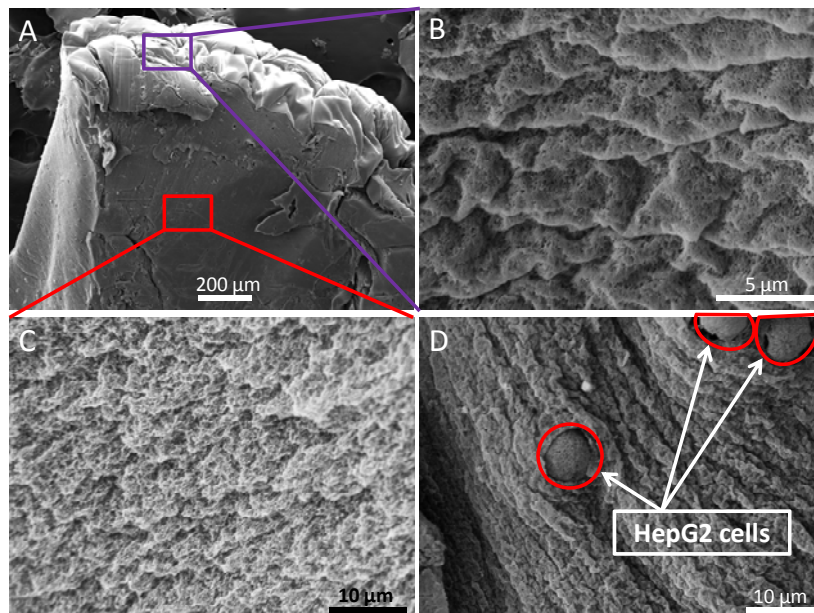


Figure 8. SEM images of a cross section of a alginate@TiO₂ mineralized microcapsule (A), of the external porous TiO₂ crust (B), of the porous alginate core (C) and of encapsulated HepG2 cells (D).

The material was kept 68 days in culture medium and was supercritically dried with CO₂ prior analyses.

EDX analyses on capsules of different compositions were then performed to highlight the formation of TiO₂ around alginate capsules. Figure 9 shows EDX spectrum and surface morphology of alginate@TiO₂ material (A), a capsule prepared with TiBALDH but without PDDAC (B) and another capsule prepared by extruding alginate on a PDDAC-CaCl₂ solution but without the presence of titanium precursor (C). The presence of calcium, carbon and oxygen was detected in all cases, indicating the presence of a layer of calcium alginate at the surface. For the capsules prepared with TiBALDH but without polycation, the peak of titanium appeared suggesting that some quantity of precursor is still present in the capsule. Finally, for alginate@TiO₂ material, we observed a clear increase in intensity of the titanium peak as well as that of the oxygen one, indicating the polymerization of the precursor to form titanium dioxide around the alginate sphere.

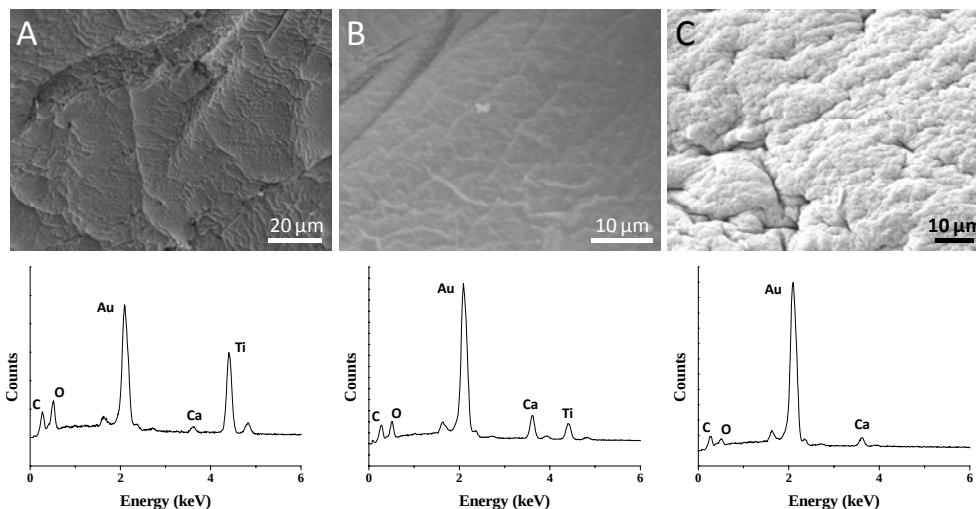


Figure 9. SEM images and EDX spectrum of the surface of (A) alginate/TiBALDH 250 mM/PDDAC+CaCl₂, (B) alginate/TiBALDH 250 mM/CaCl₂ and (C) alginate/PDDAC+CaCl₂ capsules.

The capsules were supercritically dried with CO₂ directly after synthesis.

The amount of titanium dioxide formed around the alginate@TiO₂ microcapsule was also determined by the 5-chlorosalicylic acid assay allowing the titanium (IV) quantitation [67]. The incubation time in PDDAC-CaCl₂ was maintained constant while the initial concentration of the precursor varied. The quantity of TiO₂ produced increased linearly until it reached a limit of about 6000 nmols of titanium dioxide. It is possible that there is a limit distance from which PDDAC does not interact anymore with the anionic alginate surface so that there is no more titanium dioxide deposited. Another possible explanation would be that the PDDAC has been entirely consumed for the reaction with titanium precursor so that polycations are no more available for the production of additional TiO₂.

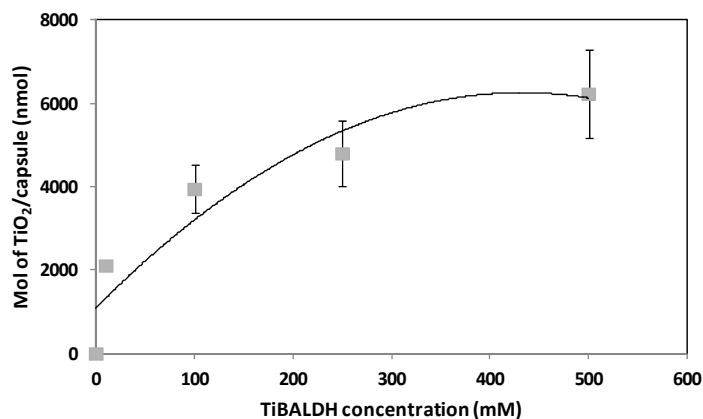


Figure 10. Titration of the titanium dioxide in alginate@TiO₂ capsules by the 5-chlorosalicylic acid assay.

The capsules were prepared as described in the experimental section (with [TiBALDH] = 250 mM) and washed (3X5 minutes in PBS) prior the analysis. Results are presented as means $\pm$ 1 S.D. (n = 3).

The accessible porosity of alginate@TiO₂ microcapsules was determined by the measurement of the quantity of fluorescent probes of different hydrodynamic diameter that are able to enter inside the material. These molecules simulate the immune defenders that may enter the capsule to attack the entrapped cells. Two types of probes were utilized: fluorescein isothiocyanate-dextran (Dextran-FITC) of various diameters (10, 70 and 250 kDa) and latex beads of 30 nm. According to the Stoke equation, the different Dextran-FITC probes have a diameter of 4, 12 and 22 nm respectively. Figure 11 shows the evolution of the fluorescence intensity of the supernatant of solutions in which the capsules are added. The volume of the capsules : volume of the supernatant ratio (1 : 2) in the different solutions suggests that no more than 33 % of the molecules could diffuse into the microcapsules. The experiment was performed over a period of 7 days.

A rapid diffusion (48h) of more than 15 % of the smallest molecules before reaching equilibrium was observed. The other molecules seemed to diffuse less easily as respectively 91, 93 and 95 % of them stayed outside of the capsules. Although this material presents type II isotherm, the combination of alginate and titanium dioxide can

induce a different type of porosity between the outer part and the core part of the capsule. The material is mainly macroporous but presents smallest pores near the hybrid calcium alginate-titanium dioxide crust that acts as a bottleneck. In conclusion, a pore size of the TiO₂ crust comprised between 4 and 12 nm was hypothesized, which is sufficiently small for immune-isolation but large enough to allow the diffusion of the nutrients and metabolites outside of the capsules.

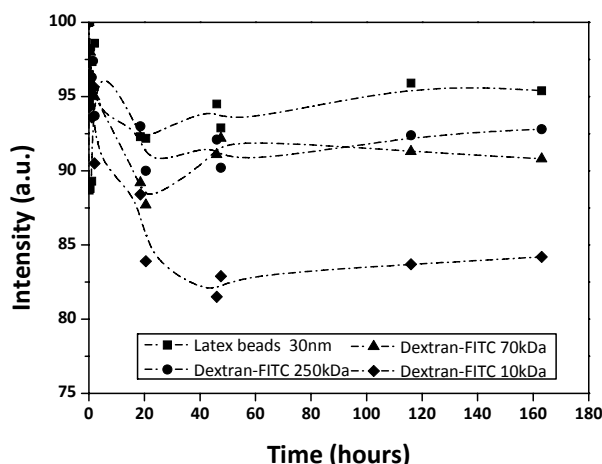


Figure 11. Study of the diffusion of fluorescent probes into 5 days old capsules prepared from 250 mM precursor.

100 % corresponds to the fluorescence intensity of the solution without capsules. The hydrodynamic radius of molecules allows the estimation of the MWCO: 4, 12 and 22 nm for the dextran-FITC, and 30 nm for the latex carboxylated-modified beads.

The last crucial property of our material is the mechanical strength that will allow the maintenance of the entrapped cells within the capsules for a long period of time.

This property was firstly evaluated by mixing the capsules of various compositions into a modified PBS buffer supplemented with EDTA. This solution is supposed to reproduce *in vivo* conditions where alginate-based materials are progressively degraded because of the exchange of calcium ions by sodium ions. The alginate@TiO₂ materials (with various titanium precursor concentrations) were

compared to alginate-silica mineralized beads (ASA) prepared as reported by Dandoy *et al* [16] used as a positive control. The intact capsules or beads were counted at several intervals of time. The results are depicted in Figure 12. A rapid dissolution of ASA material was observed. Indeed, after 48h, no more ASA beads could be observed in the medium while about 60 % of the alginate/titania capsules still remained intact. Furthermore, 44($\pm$ 2.6) capsules (prepared from 250 mM precursor) were still present with a totally preserved morphology after 4 months (data not shown).

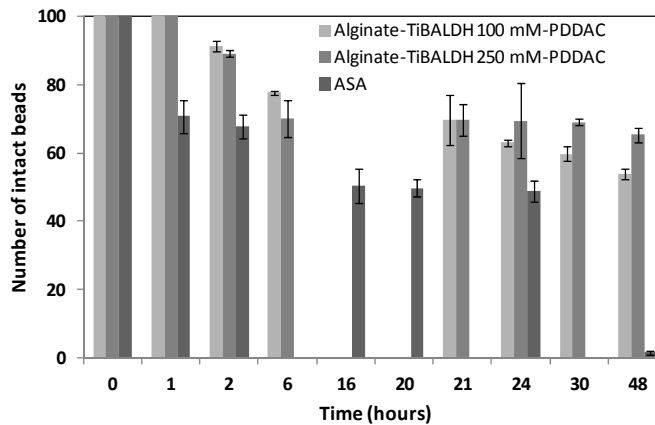


Figure 12. Evaluation of the mechanical resistance of hybrid materials.

Comparison between alginate@TiO₂ capsules and alginate/silica mineralized beads (ASA). The capsules or beads were put into a 50 mM EDTA PBS solution and the number of intact capsule or bead was counted over time. Results are presented as means $\pm$ 1 S.D. (n = 3).

Secondly, mechanical strength of capsules of different compositions was monitored by the measurement of Young's modulus that gives information about the stiffness of an elastic material. Table 2 summarizes the results obtained. It is shown that the deposition of a layer of PDDAC around purified alginate capsule slightly improved the tightness of the material (+19%) while it was not the case by simply mixing TiBALDH with alginate before extrusion in a CaCl₂ solution. However, the rigidity of the microcapsules was clearly enhanced when TiO₂ was formed around alginate

spheres via the reaction between TiBALDH and PDDAC as an increase of 51% in the Young's modulus was revealed.

Composition of the capsules	E (kPa)
Pure alginate	78
Alginate/TiBALDH 250 mM/CaCl ₂ 100 mM	70
Alginate/PDDAC+CaCl ₂ 100 mM	93
Alginate/TiBALDH 100 mM/PDDAC+CaCl ₂ 100 mM	118
Alginate/TiBALDH 250 mM/PDDAC+CaCl ₂ 100 mM	118

Table 2. Determination of mechanical strength of hybrid materials.
Comparison between different compositions.

2.3. Cell viability

The survival of the cells immobilized in alginate or alginate@TiO₂ capsules was then investigated by different methods.

Firstly, the consumption of oxygen by entrapped HepG2 cells, reflecting directly their viability, was measured by a Clark's electrode. Figure 13 shows that the survival of cells can be maintained for 43 days as the relative respiration remained above 100% in all cases. A rapid increase in this value was observed in the case of alginate@TiO₂ microcapsules probably due to cell proliferation. This rapid increase was not observed in the case of purified alginate capsules probably due to the leaking of part of the biological materials (~10 µm) outside of the shell as its surface presented some cracks of a few micrometers (see Figure 7B(i)). The adequate porosity of our alginate/titania material shown in Figure 11 probably prevented this phenomenon. These results are also a indication of the incoity of titanium precursor and polycationic macromolecule for HepG2 cells.

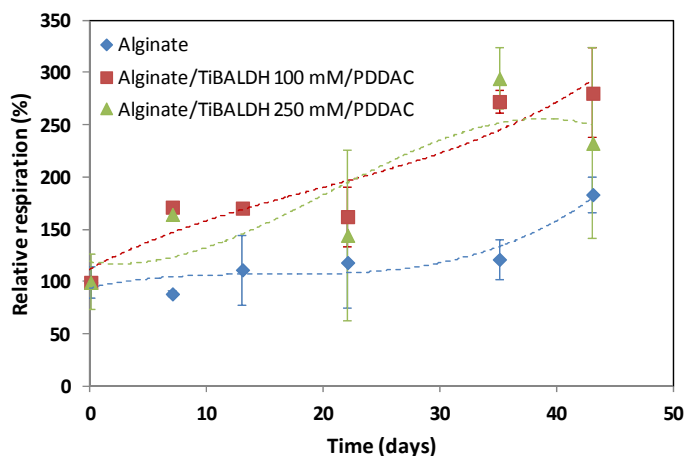


Figure 13. Study of oxygen consumption by HepG2 cells encapsulated within pure alginate capsules and alginate@TiO₂ microcapsules prepared from 100 and 250 mM precursor.

100 % corresponds to the oxygen consumption of cells entrapped within one capsule ($2.3 \cdot 10^2 \mu\text{mol of O}_2 \text{ hour}^{-1} \text{ capsule}^{-1}$). Results are presented as means $\pm$ 1 S.D. (n = 3).

Secondly, a fluorescent probe named fluorescein diacetate (FDA) was used to stain the living entrapped cells. Alive cells are able to release fluorescein from FDA thanks to intracellular esterases. Fluorescein remains inside the cells. Figure 14 shows micrographs of entrapped HepG2 cells taken in brightfield and fluorescent mode. The alginate@TiO₂ microcapsules were cut in very fine slices and deposited on a microscope slide prior incubation. It is observed that nearly all the entrapped cells were still alive 2 hours post-encapsulation (A, B) as well as 15 days later (C, D). These results are in accordance with the ones obtained in the oxygen consumption study (Figure 13).

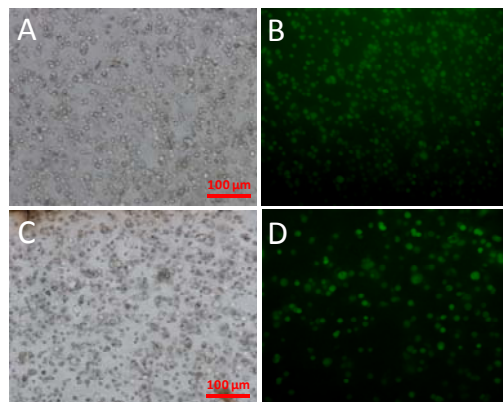


Figure 14. Microscopy pictures highlighting the survival of cells.

Brightfield (A, C) and fluorescent microscopy pictures (B, D) of HepG2 cells three-dimensionally entrapped within alginate@TiO₂ microcapsules synthesized from 250 mM precursor and labeled with fluorescein diacetate (viability probe). The micrographs were taken 2 hours (A, B) and 15 days (C, D) post-encapsulation.

Finally, the diffusion of metabolites outside of the matrix has been studied by measuring the albumin secreted in the culture medium by HepG2 cells. Every 3 or 4 days, this medium was collected and replaced by fresh medium so that it is possible to express the results as a daily concentration release, as presented in Figure 15. These results demonstrated that the production of albumin can be directly correlated with the oxygen consumption of HepG2 cells since the two graphs displayed the same trend. These results also showed that large molecules can easily diffuse outside of the hybrid material.

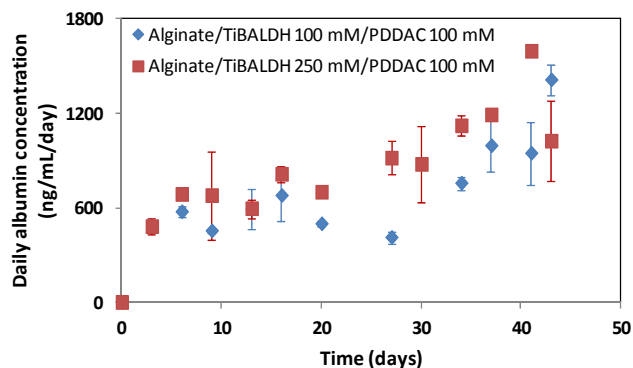


Figure 15. Amount of human albumin secreted by HepG2 cells in the medium of the alginate@TiO₂ capsules.

Concentrations showed the daily albumin released outside of the capsules as means $\pm$ 1 S.D. (n = 3).

3. CONCLUSIONS

The present study assessed the design of a novel device for microencapsulation with improved properties. It consists in the combination of biocompatible purified alginate microcapsules with an outer layer of robust titanium dioxide synthesized according to a biomimetic process involving a long chain quaternary ammonium polymer (PDDAC) inducing the mineralization of titania from an aqueous stable precursor (TiBALDH). This synthesis is performed by a simple and rapid one-step process under mild and biocompatible conditions at room temperature.

The encapsulation of human model HepG2 cells inside new alginate@TiO₂ microcapsules revealed a high survival rate and preserved functionality such as diffusion of molecules of interest like albumin outside of the hybrid shell. Further *in vitro* characterizations demonstrated a high porosity allowing the diffusion of nutrients and metabolites with a pore size of about 10 nm, as required for immune-isolation. This new porous material also revealed good mechanical properties significantly improved compared with alginate capsule and alginate/silica mineralized beads. This could make it an ideal device to treat several human disorders such as type 1 diabetes mellitus and to substitute the radical and delicate organ transplantation. Indeed, it would allow preserving the survival of β -cells for long periods of time thanks to its robustness while supplying the host organism with insulin to maintain glucose homeostasis.

4. MATERIALS AND METHODS

4.1. Chemical materials

Isopropanol (99.5 %, anhydrous), butanol (99 %, for molecular biology), ethylene glycol (99.8 %, anhydrous), titanium(IV) bis(ammonium lactato)dihydroxide solution (TiBALDH, 50 wt. % in H₂O), poly(diallyldimethylammonium) chloride solution (PDDAC, average Mw 100,000-200,000, 20 wt. % in H₂O), 5-chlorosalicylic acid (98 %), sodium perchlorate (hydrate, 99.99 %), sulfuric acid (ACS reagent, 95.0-98.0 %), ammonium hydroxide solution (ACS reagent, 28.0-30.0 % NH₃ basis), alginic acid sodium salt from brown algae (for immobilization of microorganisms), calcium chloride (dihydrate, 99 %), ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA, tetrasodium salt, 97 %), hydrochloric acid (Molecular Biology Grade, 36.5-38.0 %), sodium hydroxide (reagent grade, 98 %, anhydrous), chloroform (anhydrous, 99 %), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, disodium salt, dihydrate, 99 %), fluorescein isothiocyanate Dextran (Dextran-FITC) and carboxylate-modified latex beads (L5155) were purchased from Sigma-Aldrich; glycerol (anhydrous) from Fluka; and ethanol (absolute) from Fisher. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, 31885) and foetal bovine serum were provided from Invitrogen (Casbald, USA).

Sodium alginate powder was purified as described by de Vos *et al* [28]. Briefly, the commercial powder was dissolved in an aqueous solution of EGTA 1 mM to remove Mg⁺² and Ca⁺² cations. This solution was then successively passed through 5 to 0.45 μm filters. The alginate fraction was then acidified by HCl 2 M at 4°C until gelification. This gel was filtered and washed with HCl 0.01 M, chloroform and butanol to eliminate remaining ions and proteins. The raising of the pH to 7.0 with

NaOH 0.5 M allowed the recovering of a clear solution. Finally, absolute ethanol was added to precipitate the purified alginate and vane pump used to dry the compound.

4.2. *Biological materials*

HepG2 cells (Hepatocellular Liver Carcinoma Cell line) were cultivated in Dulbelcco's Modified Eagle Medium (DMEM, 31885) supplemented with 10 % of foetal bovine serum in 75-cm² flasks (Costar, Lowell, USA). The cells were incubated at 37°C (95 % air/5 % CO₂). After three days of culture, PBS (Phosphate Buffer Saline) was used to wash the cells before to be treated with a trypsin/EDTA mix. Trypsinised cells were centrifuged and collected in fresh culture medium with serum for culture or for encapsulation.

4.3. *Synthesis of hybrid materials*

This section describes how the cells are encapsulated within Ca-alginate capsules (first method) or mineralized alginate/titania capsules (second method). All the solutions used were previously adjusted at pH 7.4.

First method. Firstly, cells were collected in fresh buffered culture medium as described in the previous section (4.2) and mixed with Na-alginate (3 % wt.). The final cell density was $1.1 \cdot 10^6$ cells mL⁻¹. The polymeric capsules were prepared by extruding this suspension into a calcium chloride solution (100 mM). A cross-linking reaction occurred for five minutes between carboxylate functions of polysaccharide chains due to the presence of Ca⁺² cations. It resulted in a hybrid capsule with a liquid core containing the cells in suspension and a solid crust. The capsules were then recovered and 3 of them were put in test tubes filled with 5.0 mL of fresh culture medium with serum and maintained in the same condition than for culture (37°C, 5 % CO₂).

Second method. Mineralized capsules were obtained as described by the procedure presented in Figure 16.

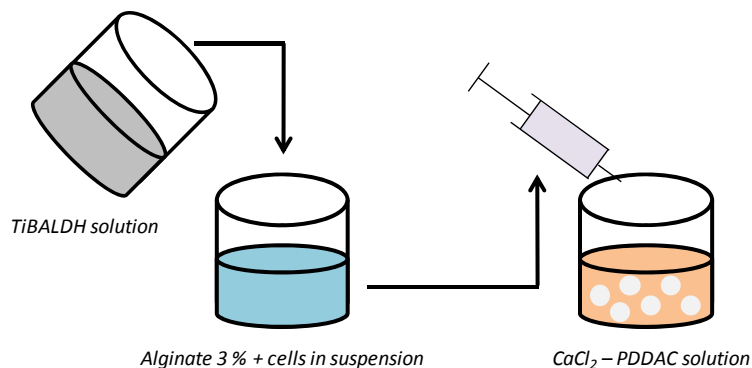


Figure 16. Procedure for microencapsulation of HepG2 cells into hybrid alginate@TiO₂ microcapsules.

Cells in suspension are mixed with alginate and titanium precursor and this mix is dropped into a solution of calcium chloride and PDDAC.

A buffered titanium precursor solution (100 mM or 250 mM), diluted in culture medium without serum was added to a suspension of cells containing 3.0 % wt. of purified sodium alginate (1:1 vol.). The final cell density was $2.2 \cdot 10^6$ cells mL⁻¹. This suspension was then extruded into a buffered aqueous solution containing calcium chloride and PDDAC (100 mM either). The drops were left for incubation in the solution for about five minutes, as for the first method. The drops transformed into polymeric capsules but with a stronger white solid crust indicating that a reaction well occurred between precursor and PDDAC. The hybrid mineralized capsules were then recovered as for the first method.

4.4. Characterization techniques

4.4.1. Cytotoxicity test

The toxicity of the by-products of sol-gel process, of the stabilizing agents used to control the hydrolysis kinetic and of the titanium precursor used to synthesized the mineralized capsules was evaluated by the measurement of the LDH (Lactate DeHydrogenase) released by the cells incubated with tested compounds. LDH is an enzyme located in the cytoplasm that can be detected outside if the plasma membrane becomes permeable, hence if cells are dying. LDH was quantified in the samples using a Kit from Roche Applied Science Laboratory (Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS}). 50000 HepG2 cells were seeded in a 24-well plate for 24 hours. The culture medium was then replaced by solutions of potentially toxic chemicals of different concentrations diluted into culture medium. After 5 hours of incubation, the supernatant of each well was collected. The remaining cells, attached and alive in the wells, were lysed by Triton X-100 (10 %) for the monitoring of intracellular LDH of living cells. The measurement of absorbance at 490 nm allows the determination of extracellular and intracellular LDH activity and the evaluation of the toxicity of compounds.

4.4.2. Material properties

The polymerization of TiBALDH in the presence of PDDAC has been highlighted by micrographs collected in brightfield mode using a Multizoom AZ-100 microscope (Nikon). Micrographs of capsules obtained by the second method described in section 4.3 were taken over time during incubation (0, 10, 20, 30 minutes). The same experiment was performed with capsules synthesized without TiBALDH firstly, and without PDDAC, secondly.

Capsules of different compositions were dehydrated with ethanol and dried through a process of critical point drying with liquid carbon dioxide in order to obtain aerogels. Textural properties of the samples were determined via adsorption and desorption of nitrogen at -196°C using a volumetric adsorption analyzer (Micromeritics Tristar 3000). Prior to the measurement, the samples were degassed at 70 milliTorrs overnight at room temperature. Specific surface area was calculated using the B.E.T. (Brunauer-Emett-Teller) equation [68].

Morphological properties were highlighted by field emission scanning electron microscopy (FE-SEM) on a JEOL JSM-7500F electron microscope. The samples were previously sputter-coated with gold. The chemical composition of the different capsules was evaluated using an energy-dispersive X-ray analysis system (EDX) with an acceleration voltage of 15.00 kV and a working distance of 8 mm.

The mechanical strength of capsules of different compositions was evaluated using two different methods and a comparison was made with alginate/silica hybrid mineralized beads. Firstly, 100 capsules or beads were placed in a buffered 50 mM EDTA solution (pH 7.4) under stirring (60 rpm) and the number of intact beads was counted as a function of time. This analysis protocol was chosen to reproduce the *in vivo* degradation mechanism of alginate-based microcapsules due to the progressive exchange of Ca⁺² ions by Na⁺ cations.

The 5-chlorosalicylic acid assay was performed to quantify the TiO₂ in the mineralized microcapsules (synthesized from 250 mM titanium precursor). Briefly, a capsule was dissolved in 1.0 mL of concentrated sulfuric acid. 2.5 mL of 5-chlorosalicylic acid (2.5 % in absolute ethanol), 2.5 mL of sodium perchlorate (1 M), 7.5 mL of absolute ethanol and 10.0 mL of deionized water were added to the dissolved capsule. The pH of this solution was adjusted to 4 using concentrated NH₄OH and

completed to 50 mL with deionized water. The absorbance of the solution was monitored at 355 nm using a Lambda 35 UV/visible spectrophotometer (Perkin Elmer) and the quantity of TiO₂ in the capsule determined using a standard curve elaborated from TiBALDH of different concentrations.

The accessible porosity of the alginate/titania microcapsules (using 250 mM TiBALDH) was evaluated using different fluorescent probes with various hydrodynamic diameters. Briefly, 60 capsules (corresponding to 3.0 mL) were synthesized and aged 5 days. They were then mixed with PBS (6.0 mL, pH 7.4) containing 0.4 mg L⁻¹ of Dextran-FITC with various molecular weight cut-off (MWCO: 10, 70 and 250 kDa) or 200 µL of green fluorescent carboxylate-modified latex beads (2.5 % solids). The changes in the concentration of each substance were determined at room temperature during several days. The fluorescence intensity of the different molecules was recorded with a LS45 Luminescence Spectrometer (Perkin Elmer). The excitation/emission wavelengths were respectively 494/518 nm for Dextran-FITC and 470/515 nm for latex beads. The fluorescence intensity of the probes without capsules was taken as the reference and this reference was analyzed every day of the experiment.

4.4.3. Cell viability and metabolic activity

The viability of entrapped cells was assessed by measuring the oxygen consumption using a Clark's electrode (HansaTech Instruments). For each type of capsules, 3 of them were added in the vessel of the device, containing 1.0 mL of culture medium. The respiration activity of entrapped HepG2 cells was determined just after the encapsulation and kept as the reference value (100 %) over the whole experiment.

The cell viability was corroborated by the use of a vital dye probe (fluorescein diacetate, FDA). Entrapped cells were incubated within FDA diluted in culture medium (5 μ M) for 5 minutes at room temperature. Micrographs were collected using a fluorescent Multizoom AZ100 microscope (Nikon). Pictures were taken either in brightfield mode or in fluorescent mode at 536/40 nm with a colour camera (DSRi1, Nikon) by illuminating the samples with a 482/35 nm excitation light.

The secretion of albumin by the entrapped cells outside of the capsules was monitored over time. The supernatant of the entrapped cells was collected and replaced by fresh culture medium twice a week. The concentration of human albumin in these samples was measured using a ELISA kit commercialized by AssayPro (Human Albumin ELISA Kit).

4.4.4. Statistical analysis

The percentage of LDH released by HepG2 cells incubated with different concentrations of tested compounds was compared to the basal death of the cells (control). Results were analyzed by unpaired Student's *t*-test, using XLSTAT 2013 software (Addinsoft) and with $p < 0.05$ being considered as significant.

ACKNOWLEDGMENTS

Grégory Leroux thanks the University of Namur for his research grant. The authors are grateful to Dr. Marie-Ève Duprez of the University of Mons for the measurements of the Young's modulus of the microcapsules.

REFERENCES

- [1] B. Ludwig, A. Rotem, J. Schmid, G.C. Weir, C.K. Colton, M.D. Brendel, T. Neufeld, N.L. Block, K. Yavriyants, A. Steffen, S. Ludwig, T. Chavakis, A. Reichel, D. Azarov, B. Zimmermann, S. Maimon, M. Balyura, T. Rozenshtein, N. Shabtay, P. Vardi, K. Bloch, P. de Vos, A.V. Schally, S.R. Bornstein and U. Barkai, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012, **109**, 5022-5027.
- [2] M. Löhr, A. Hoffmeyer, J-C. Kröger, M. Freund, J. Hain, A. Holle, P. Karle, W.T. Knöfel, S. Liebe, P. Müller, H. Nizze, M. Renner, R.M. Saller, T. Wagner, K. Hauenstein, W.H. Günzburg and B. Salmons, *Lancet*, 2001, **357**, 1591-1592.
- [3] W. Xu, L. Liu and I.G. Charles, *The FASEB Journal*, 2002, **16**, 213-215.
- [4] C.F. Meunier, P. Dandoy and B.-L. Su, *J. Colloid Interface Sci.*, 2010, **342**, 211-224.
- [5] T. Kobayashi, Y. Aomatsu, H. Kanehiro, M. Hisanaga and Y. Nakajima, *Transplant. Proc.*, 2003, **35**, 484-485.
- [6] M. Ming, X. Li, X. Fan, D. Yang, L. Li, S. Chen, Q. Gu and W. Le, *J. Transl. Med.*, 2009, **7**:53, DOI : 10.1186/1479-5876-7-53.
- [7] A. Léonard, P. Dandoy, E. Danloy, G. Leroux, C.F. Meunier, J.C. Rooke and B.-L. Su, *Chem. Soc. Rev.*, 2011, **40**, 860-885.
- [8] P.L. Chang, J.M. Van Raamsdonk, G. Hortelano, S.C. Barsoum, N.C. MacDonald and T.L. Stockley, *Trends Biotechnol.*, 1999, **17**, 78-83.
- [9] C. Rinsch, P. Dupraz, B.L. Schneider, N. Déglon, P.H. Maxwell, P.J. Ratcliffe and P. Aebischer, *Kidney Int.*, 2002, **62**, 1395-1401.
- [10] S. Sakai, T. Ono, H. Ijima, K. Kawakami, *Biomaterials*, 2002, **23**, 4177, 4183.
- [11] G. Orive, A. R. Gascón, R. M. Hernández, M. Igartua and J. L. Pedraz, *Trends Pharmacol. Sci.*, 2003, **24**, 207-210.
- [12] G. Orive, R-M. Hernández, A.R. Gascón, R. Calafiore, T.M.S. Chang, P. de Vos, G. Hortelano, D. Hunkeler, I. Lacík and J.L. Pedraz, *Trends Biotechnol.*, 2004, **22**, 87-92.
- [13] P.J. Morris, *Trends Biotechnol.*, 1996, **14**, 163-167.
- [14] S.R. King, R. Dorian and R.W. Storrs, *Graft*, 2001, **4**, 491-499.
- [15] J.A. Nagy, K.T. Herzberg, E.M. Masse, G.P. Zientara and H.F. Dvorak, *Cancer Res.*, 1989, **49**, 5448-5458.
- [16] P. Dandoy, C.F. Meunier, C. Michiels and B.-L. Su, *PLoS One*, 2011, **6**(6), e20983, DOI: 10.1371/journal.pone.0020983.
- [17] G. Carturan, R. Dal Toso, S. Boninsegna and R. Dal Monte, *J. Mater. Chem.*, 2004, **14**, 2087-2098.
- [18] A. Bartkowiak, L. Canaple, I. Ceausolglu, N. Nurdin, A. Renken, L. Rindibacher, C. Wandrey, B. Desvergne and D. Hunkeler, *Annals of the NY Acad. Sci.*, 1999, **875**, 135-145.
- [19] T.A. Desai, D. Hansford and M. Ferrari, *J. Membr. Sci.*, 1999, **159**, 221-231.
- [20] V. Bisceglie, *Ztschr. Krebsforsch.*, 1933, **40**, 122-140.
- [21] H. Uludag, P. de Vos and P.A. Tresco, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2000, **42**, 29-64.

- [22] R.M. Hernandez, G. Orive, A. Murua and J.L. Pedraz, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2010, **62**(7-8), 711-730.
- [23] A.C. Jen, M. Conley Wake and A.G. Mikos, *Biotechnol. Bioeng.*, 1996, **50**, 357-354.
- [24] S. Lahooti and M.V. Sefton, *Biomaterials*, 2000, **21**, 987-995.
- [25] P. de Vos, A.F. Hamel and K. Tatarkiewicz, *Diabetologia*, 2002, **45**, 159-173.
- [26] G. Orive, R.M. Hernández, A.R. Gascón, R. Calafiore, T.M.S. Chang, P. de Vos, G. Hortelano, D. Hunkeler, I. Lacík, A.M.J. Shapiro and J.L. Pedraz, *Nat. Med.*, 2003, **9**, 104-107.
- [27] W. Wang, X. Liu, Y. Xie, H. Zhang, W. Yu, Y. Xiong, W. Xie and X. Ma, *J. Mater. Chem.*, 2006, **16**, 3252-3267.
- [28] P. de Vos, M. Spasojevic, B.J. de Haan, M.M. Faas, *Biomaterials*, 2012, **33**, 5552-5559.
- [29] E.S. O'Sullivan, A. Vegas, D.G. Anderson and G.C. Weir, *Endocr. Rev.*, 2011, **32**, 827-844.
- [30] P. de Vos, C.G. van Hoogmoed, J. van Zanten, S. Netter, J.H. Srubbe, H.J. Busscher, *Biomaterials*, 2003, **24**, 305-312.
- [31] S. Ponce, G. Orive, R. Hernández, A. R. Gascón, J.L. Pedraz, B.J. de Haan, M.M. Faas, H.J. Mathieu and P. de Vos, *Biomaterials*, 2006, **27**, 4831-4839.
- [32] C.G. Thanos, B.E. Bintz, W.J. Bell, H. Qian, P.A. Schneider, D.H. MacArthur and D.F. Emerich, *Biomaterials*, 2006, **27**, 3570-2579.
- [33] D.W. Green, I. Leveque, D. Walsh, D. Howard, X. Yang, K. Partridge, S. Mann and R.O.C. Oreffo, *Adv. Funct. Mater.*, 2005, **15**, 917-923.
- [34] A. Nieto, S. Areva, T. Wilson, R. Viitala, M. Vallet-Regi, *Acta Biomater.*, 2009, **5**, 3478-3487.
- [35] J. Livage, T. Coradin and C. Roux, *J. Phys.: Condens. Matter*, 2001, **13**, 673-691.
- [36] M.F. Desimone, G.S. Alvarez, M.L. Foglia and L.E. Diaz, *Recent Pat. Biotechnol.*, 2009, **3**, 55-60.
- [37] R.B. Bhatia, C.J. Brinker, A.K. Gupta and A.K. Singh, *Chem. Mater.*, 2000, **12**, 2434-2441.
- [38] P. de Vos, A. Andersson, S.K. Tam, M.M. Faas and J.P. Halle, *Immunol. Endocr. Metabol. Agents Med. Chem.*, 2006, **6**, 139-153.
- [39] A. Murua, A. Portero, G. Orive, R.M. Hernández, M. de Castro and J.L. Pedraz, *J. Control. Release*, 2008, **132**, 76-83.
- [40] S. Boninsegna, R. Dal Toso, R. Dal Monte and G. Carturan, *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 2003, **26**, 1151-1157.
- [41] T. Coradin, N. Nassif and J. Livage, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2003, **61**, 429-434.
- [42] S. Sakai, T. Ono, H. Ijima and K. Kawakami, *J. Membr. Sci.*, 2002, **205**, 183-189.

- [43] P. Dandoy, C.F. Meunier, G. Leroux, V. Voisin, L. Giordano, N. Caron, C. Michiels and B.-L. Su, *PLoS One*, 2013, **8(1)**, e54683, DOI : 10.1371/journal.pone.0054683.
- [44] T. López, E. Ortiz, P. Quintana and R.D. González, *Colloids Surf., A*, 2007, **300**, 3-10.
- [45] J.C. Rooke, A. Léonard, H. Sarmiento, C.F. Meunier, J.-P. Descy and B.-L. Su, *J. Mater. Chem.*, 2011, **21**, 951-959.
- [46] C.F. Meunier, J.C. Rooke, A. Léonard, P. Van Cutsem and B.-L. Su, *J. Mater. Chem.*, 2010, **20**, 929-936.
- [47] S.H. Yang, E.H. Ko and I.S. Choi, *Langmuir*, 2012, **28**, 2151-2155.
- [48] N. Rausch and E.P. Burte, *J. Electrochem. Soc.*, 1993, **140(1)**, 145-149.
- [49] K. Wessels, A. Feldhoff, M. Wark, J. Rathousky and T. Oekermann, *Electrochem. Solid-State Lett.*, 2006, **9(6)**, C93-C96.
- [50] P. Hoyer and H. Masuda, *J. Mater. Sci. Lett.*, 1996, **15**, 1228-1230.
- [51] H. Niederwald, S. Laux, M. Kennedy, U. Schallenberg, A. Duparré, M. Martin, N. Kaiser and D. Ristau, *Appl. Optics*, 1999, **38(16)**, 3610-3613.
- [52] M.J. Alam and D.C. Cameron, *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 2002, **25**, 137-145.
- [53] H. Yin, Y. Wada, T. Kitamura, S. Kambe, S. Murasawa, H. Mori, T. Sakata and S. Yanagida, *J. Mater. Chem.*, 2001, **11**, 1694-1703.
- [54] Y. Chen, Y. Yi, J.D. Brennan and M.A. Brook, *Chem. Mater.*, 2006, **18**, 5326-5335.
- [55] C. Sanchez, J. Livage, M. Henry and F. Babonneau, *J. Non-Cryst. Solids*, 1988, **100**, 65-76.
- [56] H. Honda, K. Suzuki and Y. Sugahara, *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 2001, **22**, 133-138.
- [57] B.W. Lee, R. Faller, A.K. Sum, I. Vattulainen, M. Patra and M. Karttunen, *Fluid Phase Equilib.*, 2004, **225**, 63-68.
- [58] S.V. Patwardhan and S.J. Clarson, *J. Inorg. Organomet. Polym.*, 2003, **13**, 193-203.
- [59] D.J. Kim, K.-B. Lee, Y.S. Chi, W.-J. Kim, H.-J. Paik and I.S. Choi, *Langmuir*, 2004, **20**, 7904-7906.
- [60] Y. Yan, B. Hao, X. Wang and G. Chen, *Dalton Trans.*, 2013, **42**, 12179-12184.
- [61] N. Kröger and K.H. Sandhage, *MRS Bull.*, 2010, **35**, 122-126.
- [62] M.B. Dickerson, K.H. Sandhage and R.R. Naik, *Chem. Rev.*, 2008, **108**, 4935-4978.
- [63] X. Shi, T. Cassagneau and F. Caruso, *Langmuir*, 2002, **18**, 904-910.
- [64] Y. Jiang, D. Yang, L. Zhang, Q. Sun, X. Sun, J. Li and Z. Jiang, *Adv. Funct. Mater.*, 2009, **19**, 150-156.
- [65] S.L. Sewell and D.W. Wright, *Chem. Mater.*, 2006, **18**, 3108-3113.
- [66] D. Fischer, Y. Li, B. Ahlemeyer, J. Krieglstein and T. Kissel, *Biomaterials*, 2003, **24**, 1121-1131.
- [67] H. Sedaira, K.A. Idriss and M.S. Abdel-Aziz, *Analyst*, 1996, **121**, 1079-1084.
- [68] S. Brunauer, P. Emmett, E. Teller, *J. Am. Chem. Soc.*, 1938, **60**, 309-319.

Chapitre 5.

***Etudes in vivo de la biocompatibilité des
matrices hybrides et de l'immuno-isolation
des cellules encapsulées***

Chapitre 5

Etudes *in vivo* de la biocompatibilité des matrices hybrides et de l'immuno-isolation des cellules encapsulées

Les expériences *in vitro* sur l'encapsulation de cellules HepG2 au sein de microcapsules hybrides alginate@TiO₂ ayant démontré toutes les potentialités de celles-ci en tant qu'organe artificiel, il était utile de se pencher sur les réactions que pouvaient engendrer ces matrices *in vivo* afin de pouvoir évaluer leur biocompatibilité vis-à-vis d'un organisme vivant implanté mais également pour étayer les études de porosité réalisées *in vitro* en évaluant l'immuno-isolation des cellules encapsulées. Ces expériences ont été menées sur des rats femelles Wistar qui ont été implantées par les matériaux en sous-cutané entre les omoplates, tel que l'illustre la *figure 5.1*.



Figure 5.1 : Illustration de la zone d'implantation des matériaux hybrides chez le rat.

La biocompatibilité des matériaux et l'immuno-isolation des cellules encapsulées ont été évaluées par le dosage ELISA de marqueurs inflammatoires, par l'analyse des coupes histologiques des matériaux et des tissus entourant ceux-ci et par l'évaluation de l'activité estérase des cellules encapsulées. Les propriétés des capsules alginate@TiO₂ ont été comparées à celles de billes minéralisées alginate-silice/alginate (ASA) également développées dans notre laboratoire et ayant

également démontré leur potentialité pour la thérapie cellulaire¹. L'article joint dans ce chapitre détaille toutes les expériences *in vivo* réalisées et les résultats obtenus.

5.1. Etudes précédentes¹

En parallèle de la conception des microcapsules alginate@TiO₂, notre laboratoire a développé des billes entièrement minéralisées alginate-silice préparées à partir de silicate de sodium et recouvertes d'une couche d'alginate de calcium (ASA) afin de limiter les réactions *in vivo* engendrées par la silice. Les mêmes études *in vivo* que celles décrites au point précédent ont été réalisées afin de comparer les billes ASA (avec ou sans cellules HepG2 encapsulées) avec des billes AS non-recouvertes d'une couche externe d'alginate (avec ou sans cellules HepG2). Il fut notamment procédé à un marquage immunohistochimique des macrophages, cellules participant à l'immunité, exprimant l'antigène ED-1 (ou CD-68) sur les coupes histologiques des tissus entourant les implants.

Brièvement, les coupes déparaffinées subissent une étape de démasquage dans un tampon citrate sous l'effet de la chaleur. L'inhibition des peroxydases endogènes est réalisée par un traitement des coupes dans un bain d'H₂O₂. Celles-ci sont ensuite incubées successivement avec de l'avidine, de la biotine et de la caséine pour bloquer les sites de liaison non-spécifiques de l'anticorps. S'ensuivent des incubations successives avec l'anticorps primaire anti-ED-1 et l'anticorps secondaire (immunoglobuline (Ig)) anti-souris biotinylé. Le traitement par un complexe avidine-biotine et la diaminobenzidine permet de révéler la réaction en brun et d'analyser les coupes par microscopie optique².

Nous avons analysé quatre coupes de chaque groupe et sélectionné 6 champs représentatifs de 0,648 mm² sur chacune d'entre elles. Le nombre de macrophages fut compté et normalisé pour une surface de 1 mm². Les résultats sont repris à la *figure 5.2* et ont été analysés par un test de Mann-Whitney afin de comparer le nombre de macrophage/mm² pour chaque groupe, une valeur de $p < 0,05$ étant considérée comme significative (XLSTAT 2013 software, Addinsoft).

¹ P. Dandoy, C.F. Meunier, G. Leroux, V. Voisin, L. Giordano, N. Caron, C. Michiels, B.-L. Su, *PLoS One*, 2013, **8(1)**, e54683, DOI : 10.1371/journal.pone.0054683.

² S.-M. Hsu, L. Raine, H. Fanger, *J. Histochem. Cytochem.*, 1981, **29(4)**, 577-580.

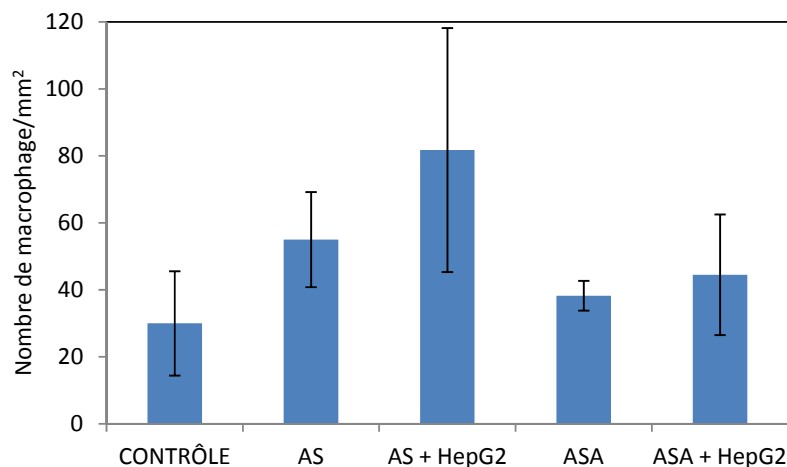


Figure 5.2 : Quantité de macrophages comptabilisés sur les coupes histologiques des tissus entourant les implants chez les différents groupes étudiés par Dandoy *et al*¹. Les résultats sont présentés en moyennes $\pm$ écarts-types ($n = 4$).

Nous n'observons aucune différences significatives entre le groupe contrôle et les groupes implantés avec des billes AS ou ASA (avec ou sans cellules HepG2) bien que le nombre de macrophages soit moindre dans les tissus en contact avec les billes ASA par rapport à ceux en contact avec les billes AS. Des analyses complémentaires démontrent en effet la biocompatibilité supérieure des billes ASA et suggèrent une immuno-isolation plus efficace des cellules encapsulées¹.

5.2. Avant-propos

L'article qui suit met en évidence la biocompatibilité des microcapsules alginate@TiO₂ et confirme celle des billes ASA. En effet, les deux types d'implant, qu'ils contiennent des cellules ou non ne semblent pas provoquer de réponses inflammatoires dans l'organisme-hôte. Cependant, l'immuno-isolation des cellules encapsulées au sein des capsules alginate@TiO₂ a pu être démontrée alors que ce ne fut pas le cas pour les cellules encapsulées dans les billes ASA. Si l'on ajoute à cela la meilleure résistance mécanique des microcapsules alginate@TiO₂ comparée à celle des billes ASA, mise en évidence dans l'article précédent (*chapitre 4*), les capsules alginate@TiO₂ semblent être le choix le plus indiqué pour la poursuite des travaux impliquant les cellules sécrétrices d'insuline INS-1E (voir *point 2.2.1.2*).

Alginate-Based Hybrid Materials as an “Artificial Organ” Model: *In Vivo* Biocompatibility Study and Evaluation of Entrapped Human Cell Immune-Isolation

Grégory Leroux^{1,a}, Christophe F. Meunier^{1,b}, Virginie Voisin², Isabelle Habsch², Nathalie Caron², Carine Michiels³, Bao-Lian Su^{1,*}

¹Laboratory of Inorganic Materials Chemistry (CMI),

²Laboratory of Molecular Physiology (URPhyM) - NARILIS

³Laboratory of Biochemistry and Cellular Biology (URBC) - NARILIS
University of Namur, 61 rue de Bruxelles, B-5000 Namur, Belgium

ABSTRACT

Background: The design of new materials to treat disease linked with protein or hormone deficiency is a great challenge since the devices in their final shape as well as the reagents they are composed of have to be inert toward entrapped cells but also fully biocompatible with the host organism. Furthermore, the porosity of these materials has to be large enough to allow the diffusion of nutrients and metabolites while ensuring a perfect immune-isolation.

^a Assistant at University of Namur, Belgium

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

* Corresponding author. tel: +32 81 724531, fax +32 81 725414, e-mail Address:

bao-lian.su@unamur.be

Methodology/Principal findings: The current work investigates the *in vivo* biocompatibility of a new robust alginate-titania hybrid microcapsule (alginate@TiO₂) and the immune-isolation of entrapped living HepG2 model cells in order to assess the potentiality of this material as an artificial organ and device for cell therapy. A comparison was made with alginate-silica hybrid beads covered with an external layer of alginate (ASA). The two types of material, with or without entrapped HepG2 cells, have been implanted subcutaneously in female Wistar rats for respectively 2 days and 2 months in order to evaluate short and long-term inflammatory responses by histological examination of the implants as well as of the muscles and subcutaneous tissues surrounding them. The presence of inflammation was also monitored by assaying the concentration of IL-6 in plasma and of MCP-1 in tissues in contact with beads or capsules. Immune-isolation of entrapped HepG2 cells was checked by assessment of their morphology, membrane integrity and intracellular enzymatic activity. The results suggest few differences in biocompatibility between ASA beads and alginate@TiO₂ microcapsules as very little differences were observed with control animals. However, immune-isolation seemed to be better in the case of alginate-titania material as there were more encapsulated cells that remained alive 2 days post-implantation.

Conclusions/Significance: The present study demonstrates that hybrid alginate@TiO₂ microcapsules could be an adapted robust and fully biocompatible implantation material for the treatment of human disorders such as hormone deficiencies.

1. INTRODUCTION

In recent years, the concept of living hybrid materials, associating inanimate porous devices with whole cells, has become evolving field of current interest as all its usefulness has been demonstrated in many applications [1]. For example, yeast, bacteria, (micro-)algae or plant cell encapsulation has been used in various fields such as biosensor for decontamination exploitation [2, 3], bioreactor and biocatalyst for the conversion of CO₂ into biofuels or drugs [4-6], biosynthesis of various important compounds like alkaloids [7-9] or hydrogen production [10-12]. This concept has also been adapted in medical field to treat diseases due to hormone deficiencies such as the increasingly widespread type 1 diabetes mellitus since the systems as “artificial organ” prepared by the encapsulation of animal cells producing the required protein can replace defective organs and could be an important solution to the problem of limited supply of donors [13-15]. This is one of cell therapy methods.

The first type of material we can reference for whole cell encapsulation is inorganic oxide-based materials such as amorphous silica monolithic aerogels. These robust materials are generally prepared from alkoxide species, undergoing sol-gel process, in aqueous environment, under physiological conditions. They also display a high thermal and chemical stability over time and a tuned pore size [16-18]. This notion is particularly important in the field of cell therapy because the ideal material has to maintain the viability and to protect the entrapped cells from immune rejection, thus avoiding harsh immunosuppressive medication. Indeed, the porosity has to be small enough to avoid the entry of immune defenders of the host organism but large enough to ensure a good diffusion of nutrients, oxygen, metabolites and of the hormone of interest (e.g. insulin) [19, 20]. A pore size of 17 nm has been proposed to ensure a good immune-isolation since this value matches, according to the equation of Stokes,

the molecular weight cut-off (MWCO) of immunoglobulin G (IgG) which is estimated to be 150 kDa [21, 22]. However, a size of up to 20 nm is generally referenced [23, 24]. This technology also insures the protection of the cells towards mechanical stress via an adapted in-situ encapsulation process and a total biocompatibility of the reagents involved in the matrix synthesis as well as the material in its final shape itself towards both entrapped cells and host organism [25]. Relative to these concerns, matrix contraction of inorganic aerogels over time induces mechanical stress on the entrapped cells and damages their membrane. Furthermore, the release of toxic alcohol during sol-gel process also affects the viability of the encapsulated material. Although this problem can be solved by the aqueous sol-gel process using sodium silicate as precursor [26], silica is reported to attract macrophages and to induce oxidative stress and pro-inflammatory responses [27-30].

In this context, microencapsulation devices using biopolymers have been investigated. This type of material maximizes the surface/volume ratio, improving the diffusion properties, as it is composed of spherical capsules [31]. For instance, sodium alginate extruded in a calcium chloride solution allows the formation of such capsules by cross-linking reactions between carboxylate functions of the polysaccharide chains. A calcium-alginate crust acting as a semi-permeable membrane is obtained. Among these devices, we can also quote agarose, chitosan or collagen [32-37]. Despite their advantages, these biopolymers present a poor mechanical strength and tend to swell over time so that immune-isolation is not efficient over a long period of time. In this context, it is wise to reinforce the microcapsules by the deposition of mono- or multilayer of cationic polymer interacting electrostatically with the carboxylic moieties on the G units of alginate. Poly-L-Lysine (PLL) is certainly the most reported polycation but it should be used sparingly since it is suspected to attract inflammatory

cells so that an outer layer of purified alginate is generally applied to neutralize PLL [38, 39].

Recently, many studies reported the association of biocompatible alginate with robust silica. For instance, this association results in the formation of a silica shell around alginate microcapsule, coated with an external layer of purified alginate [40-42]. Dandoy *et al.* reported the use of alginate-silica/alginate whole mineralized beads (ASA). The biocompatibility and mechanical stability of this material were compared to those of alginate-silica beads without outer alginate layer and it clearly exhibited improved properties and met all the requirement of an ideal artificial organ [43].

However, the biodegradation of silica has been highlighted, probably due to the dissolution in the body fluids [44]. Titania is sometimes described as an ideal alternative as it presents improved thermal and mechanical resistance as well as pH stability [45, 46]. Furthermore, it exhibits great biocompatibility properties as claimed by Lopez *et al.*, who have implanted a TiO₂ drug delivery device in the temporal lobe of the brain of rats [47].

Recently, we have reported the design, synthesis and characterization of a hybrid alginate/titania microcapsule (alginate@TiO₂) synthesized under mild conditions and in a one-step, very simple and rapid process [48]. This material was prepared according to a biomimetic synthesis of TiO₂ using an aqueous stable precursor (TiBALDH, titanium(IV) bis(ammonium lactato)dihydroxide) destabilized by a biocompatible polycationic macromolecule (PDDAC, poly(diallyldimethylammonium) chloride) [49-51]. Alginate acts as a template around which a layer of titanium dioxide is deposited. These microcapsules exhibit improved mechanical strength compared to ASA beads with a porosity suitable for immune-isolation. Human hepatocellular carcinoma cells (HepG2) was used as model cells as they produce albumin, allowing

the study of hormone or protein diffusion properties. This material maintained the viability of entrapped cells for 43 days post-encapsulation and its porosity was sufficient to allow albumin to pass through. The present work investigates the *in vivo* biocompatibility of alginate@TiO₂ microcapsules, compared to ASA beads, and the immune-isolation of entrapped HepG2 cells. For this purpose, muscle and subcutaneous tissues of Wistar rats surrounding the implants as the implants themselves were collected for microscopy and histology analyses. This work can shed important light on the choice of materials in the design of artificial organs for cell therapy.

2. RESULTS AND DISCUSSION

2.1. Synthesis and characterization of the materials

As explained above, materials used in the field of medical applications have to present some properties such as an adequate porosity meeting diffusion and immune-isolation requirements, mechanical strength and biocompatibility with encapsulated biological species and host organism. Alginate is a natural biopolymer used as a gelling agent in food or medicine and is commonly employed for microencapsulation. However, although it meets biocompatibility requirement, this polysaccharide swells with time, altering prolonged immune-isolation and allowing leakage of entrapped cells. On the other hand, silica or titania aerogels offer robustness and controllable pore size but the process of their synthesis involves the release of toxic by-products while low surface/volume ratio is not completely suitable for biological applications. We present here two types of material meeting the advantages while countering the drawbacks of alginate and silica or titania which are prepared under mild conditions at room temperature.

A novel alginate microcapsule reinforced by an external layer of titania synthesized from an aqueous titanium precursor (TiBALDH) destabilized by a biocompatible cationic polymer (PDDAC) has been reported. This hybrid capsule also presented all the required properties of porosity, *in vitro* biocompatibility with entrapped cells and, especially, enhanced mechanical stability compared with alginate or even alginate-silica beads [48].

In vivo experiments were thus performed in order to evaluate the biocompatibility of this new material with host as well as the immune-isolation of entrapped cells. A comparison was made with ASA beads as they have already demonstrated their biocompatibility

Materials were compared before being implanted in rats. Figure 1 shows the similarity in shape of the two materials but the differences in their surface compositions. Indeed, a higher intensity for the $CK\alpha$, $OK\alpha$ and $CaK\alpha$ peaks of the EDX spectrum of the ASA beads was observed. On the other hand, the $SiK\alpha$ peak of this spectrum exhibited a much lower intensity than the $TiK\alpha$ peak of the spectrum of alginate@TiO₂ capsules indicating that the alginate-silica composite is well covered with an alginate layer while the surface of alginate-titania capsules is essentially composed of TiO₂.

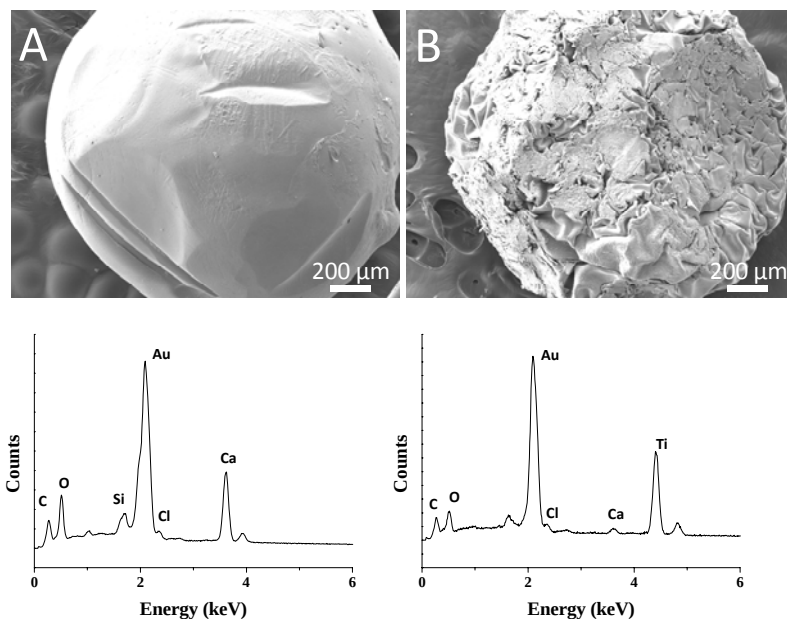


Figure 1. SEM images and EDX spectrum of (A) ASA bead and (B) alginate@TiO₂ capsule. The materials were previously supercritically dried with carbon dioxide.

2.2. *In vivo* experiments

Biocompatibility of alginate@TiO₂ microcapsules and ASA beads was assessed by detection of inflammation in blood plasma and in tissues surrounding the implants 2 days and 2 months after subcutaneous implantation between the shoulder blades of female Wistar rats. Throughout the first experiment, spread over 2 months, the body weight gain was similar in different groups, as highlighted by the growth curves (Figure 2) and the weight gain ratios (Table 1). This body weight gain indicates that the animals fed properly and were in good overall health. Indeed, this parameter is the most significant among those considered in daily observations to demonstrate that animals are healthy.

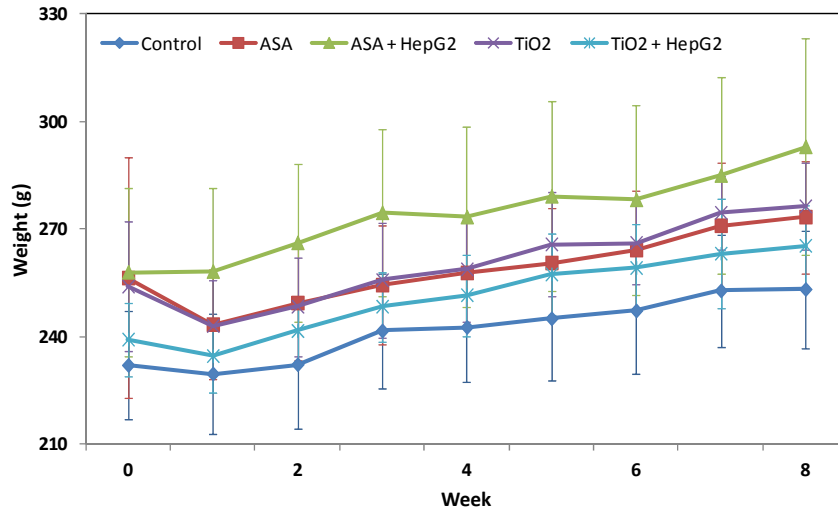


Figure 2. Body weight gain of 4-month-old Wistar rats during the 2 month following implantation of hybrid beads or microcapsules.

Comparison between the different subgroups.

The possible discomfort induced by implants may be displayed by sign of scratching of the incision site. If such observations were made during daily controls, astrexine was used in order to facilitate healing of the wound. Table 1 presents the number and percentage of animals of each group with surgical site irritation.

For each group, about one third of animals presented inflamed wound requiring the use of antiseptic. The ratio of the two group studied (~35%) is slightly higher than the ratio of the control group (23%) but it is difficult to assert that the inflammation was induced by implants rather than by surgery itself. On the other hand, a difference between two types of implant with or without HepG2 cells was observed. Indeed, the presence of cells seemed to induce more inflammation, especially for ASA beads.

	<i>Weight gain ratio</i>	<i>Use of astrexine</i>
Control	9%	3/13 animals (23%)
ASA	7%	2/10 animals (20%)
ASA-Cells	14%	6/11 animals (55%)
TiO₂	9%	4/10 animals (40%)
TiO₂-Cells	11%	3/10 animals (30%)

Table 1. Weight gain ratio of rats after 2 months and use of astrexine during experiments.
Comparison between the different subgroups.

At the end of the experiments, the implants are recovered in order to perform histological examination and determination of the surface composition by EDX. After 2 days, more than 63% of the beads or capsules were retrieved, mostly intact. They were present in the subcutaneous tissue where they were initially placed. Two cell-entrapping ASA beads were enclosed in adipose tissue and one of these beads was broken into two fragments. It was also the case for two alginate@TiO₂ capsules. It is possible that these implants have been damaged by the incision of the back midline. In most of the animals of the TiO₂ subgroup, we observed some small white residues, probably fragments of the TiO₂ layer of capsules as some of them present optical transparency in few spots of their surface. 2 months post-implantation, the percentage of recovered materials decreased to 50% or less. In the case of ASA beads with entrapped HepG2 cells, only 2 of the 30 implants were recovered. It is important to note that this percentage did not include beads or capsules enclosed in adipose tissue so that non-recovered implant does not mean destructed or dissolved material. Furthermore, some implants could be located much further away of the incision site so that we were not able to retrieve them.

Number of implants recovered		
	2 days	2 months
ASA	23/30 (77%)	13/30 (43%)
ASA-Cells	29/36 (81%), 1 broken and 2 enclosed in adipose tissue	2/30 (7%)
TiO₂	19/30 (63%), 2 broken and fragments of TiO ₂ free in the implantation site in 4/5 animals	17/30 (57%)
TiO₂-Cells	21/30 (70%)	10/30 (33%)

Table 2. Number of implants recovered at the end of the experiments.

Comparison between the different subgroups studied. After 2 months, most of the implants collected were adherent to the subcutaneous tissues.

The surface of implants recovered 2 days post-implantation has been analyzed by SEM and EDX in order to assess possible changes in their composition. No difference of surface morphology has been observed for the two types of material but ASA beads locally presented some signs of erosion as shown by holes of several tens of microns (Figure 3A). These large holes were also observed inside the beads (Figure 3B). SEM micrographs show HepG2 cells homogeneously dispersed in the different materials (Figure 3B and 3E). EDX spectra of ASA beads (Figure 3C) and of alginate@TiO₂ microcapsules (Figure 3F) post-implantation exhibited little differences with the ones performed before implantation (Figure 1) except for a slight decreased intensity for the CaK α peak of ASA beads and for the TiK α peak of alginate-titania capsules indicating a possible alteration of the outer layer of the materials.

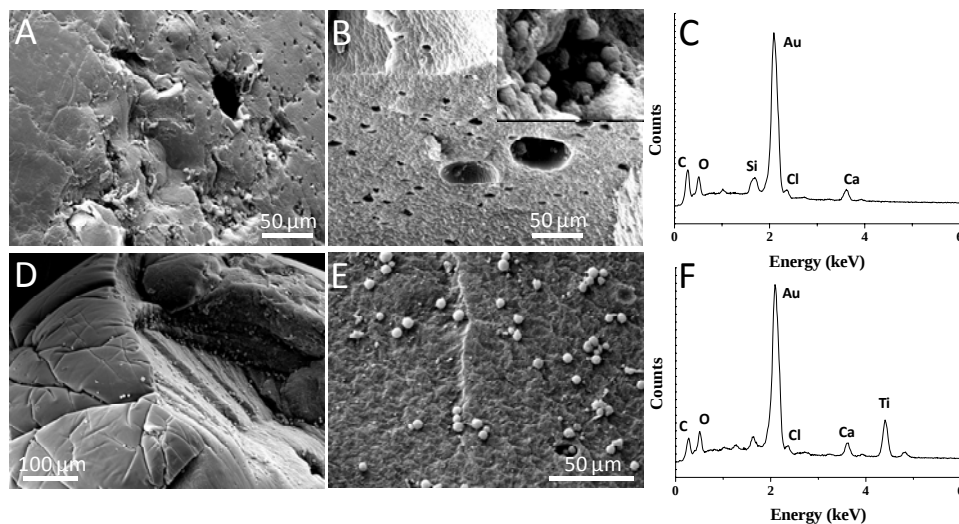


Figure 3. SEM images and EDX spectrum of ASA beads (A, B, C) and alginate@TiO₂ capsules (D, E, F) 2 days post-implantation.

The materials were previously supercritically dried with carbon dioxide.

Interleukin-6 (IL-6) is a pro-inflammatory cytokine secreted mostly by macrophages in order to stimulate immune response following an infection or a trauma like tissue damage. It is a mediator of fever; is involved in the development of many auto-immune diseases (e.g. type 1 diabetes mellitus) and its level increases in blood circulation following bacterial infection such as pneumonia [52, 53].

Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1/CCL2) is a cytokine of the CC chemokine family recruiting specific types of leukocytes like monocytes, memory T cells and dendritic cells to sites of inflammation induced by tissue injury or infection. It is especially involved in neuroinflammation characterizing diseases of the central nervous system or in the tumorigenesis and metastasis of several cancers [54, 55].

These two markers of inflammation have been monitored in Wistar rats. IL-6 concentration in blood plasma have been assayed 2 days post-implantation in different groups studied as while MCP-1 concentration was assayed in tissue lysate 2 days and 2 months after surgery.

No significant difference was observed for IL-6 between control group and tested groups. A slight but statistically significant increase was observed between ASA and ASA-Cells subgroups ($p < 0.02$) (Figure 4A).

A statically significant difference in MCP-1 concentration was observed 2 days after surgery between control group and ASA subgroup ($p < 0.01$) suggesting a slight inflammation induced by ASA beads. 2 months post-implantation, the MCP-1 concentrations were returned to basal level in all groups and no significant difference between the control group and beads or capsules implanted groups was observed (Figure 4B).

In conclusion, the monitoring of these two markers show that if an inflammation reaction is triggered, it is low and probably due to the surgery itself.

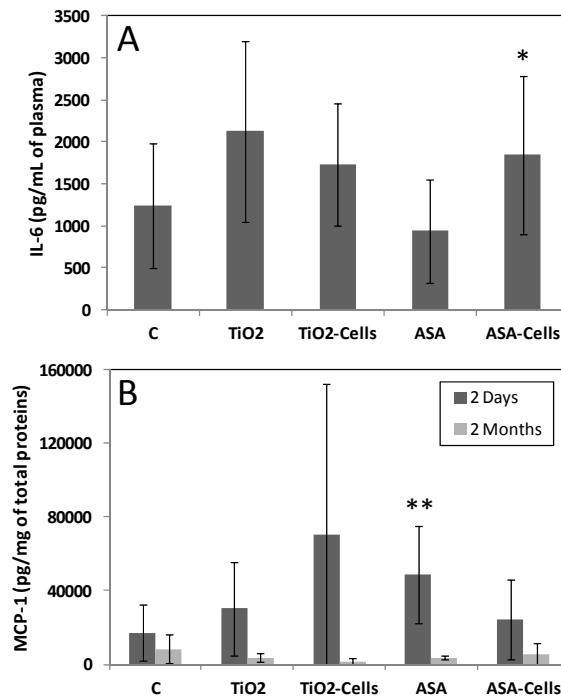


Figure 4. Interleukin-6 concentration in samples of rat blood plasma after 2 days (A) and Monocyte Chemoattractant Protein-1 concentration in samples of rat tissue lysate after 2 days and 2 months (B).

Comparison between the different subgroups studied. * IL-6 concentration in ASA-Cells subgroup was greater than in ASA subgroup ($p < 0.02$); ** MCP-1 concentration in ASA subgroup was greater than in control group 2 days after surgery ($p < 0.01$).

Histological sections of subcutaneous tissues and muscles in contact with the implants and of implants themselves allow to assess inflammation induced by ASA beads or alginate@TiO₂ microcapsules. In all the histological sections of tissues and muscles, a very low inflammatory response was observed even if more inflammatory cells seemed to be present in deep dermis of tissues in contact with implants (Figure 6E). As for the muscles, no inflammation can be observed neither in control group (Figure 5B, C, D) nor treated groups (Figure 7E). For example, mast cells are sentinel cells mostly found near blood vessels in normal tissue. They can be identified as signal of rejection if observed in large quantities further away from blood vessels, in muscles for example. These cells are recognizable by their purple nucleus surrounded by red staining. The histological observations did not show any difference between control group (Figure 5C, D) and treated groups (Figure 7E, 7F, 9F). On histological sections of the implanted materials collected, we noticed that surrounding cells seemed to colonize the eroded portions of the implants surface of both ASA beads and alginate-titania capsules, with no difference between the two types of material, with or without entrapped HepG2 cells (Figure 6B, 6C, 7C, 8C, 8D).

The survival of entrapped cells as well as their morphology were then assessed. Large differences were noted between encapsulated in ASA beads compared to in alginate@TiO₂ capsules. Indeed, most of the HepG2 cells entrapped in ASA beads (ASA-Cells subgroup) displayed a condensed nucleus and a volume-reduced cytoplasm in comparison to the size of the pore initially occupied, suggesting the death of most of the cells (Figure 7D). On the other hand, most of the cells encapsulated in alginate@TiO₂ capsules (TiO₂-Cells subgroup) exhibited a morphology with a well-defined nucleus and a well-defined cytoplasm suggesting that they were alive (Figure 9C, D).

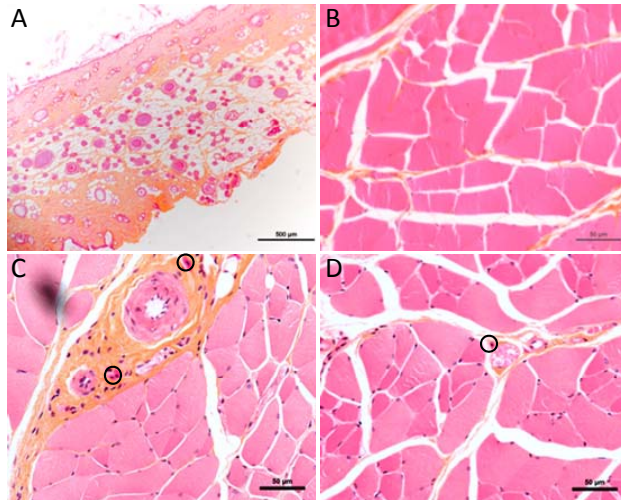


Figure 5. Histological sections of blood vessel (A, C) and muscle (B, C, D) of tissues recovered from control group collected 2 days (A, B) and 2 months (C, D) post surgery.
Circles identified mast cells.

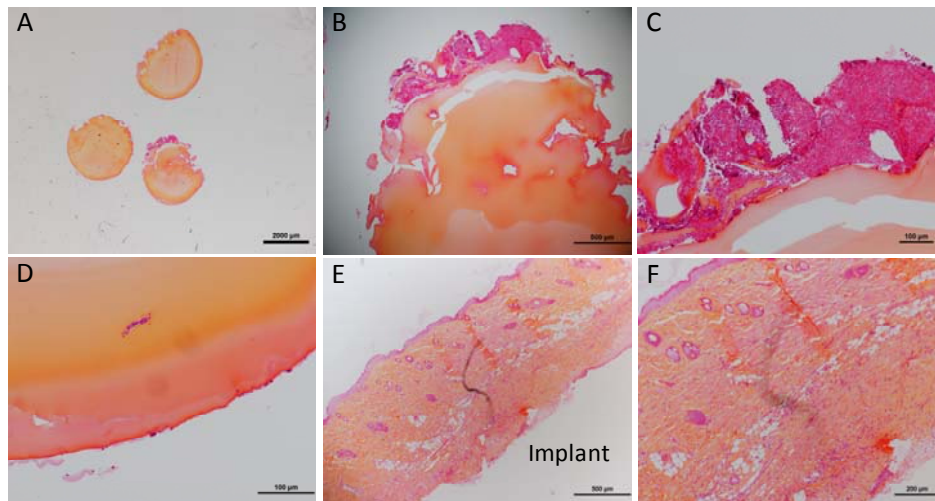


Figure 6. Histological sections of ASA beads (A-D) and subcutaneous tissue (E, F) of tissues recovered from ASA subgroup collected 2 days post-surgery.
Overgrowth can be observed around bead surface and inflammatory cells are found in deep dermis of tissue in contact with implants.

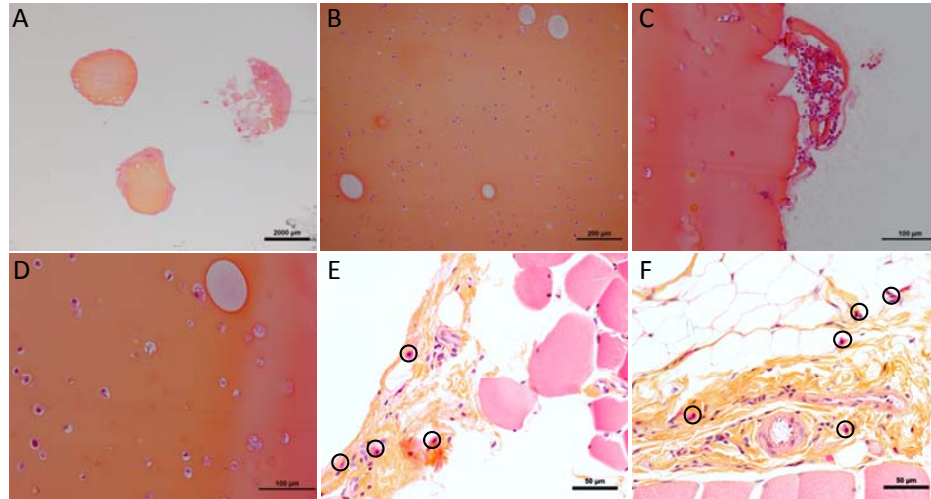


Figure 7. Histological sections of ASA beads with HepG2 (A-D) and subcutaneous tissue (E, F) of tissues recovered from ASA-Cells subgroup collected 2 days (A-D) and 2 months (E, F) post surgery.

Morphology of entrapped HepG2 cells suggests cell death. Overgrowth can also be observed near bead surface. Circles identified mast cells.

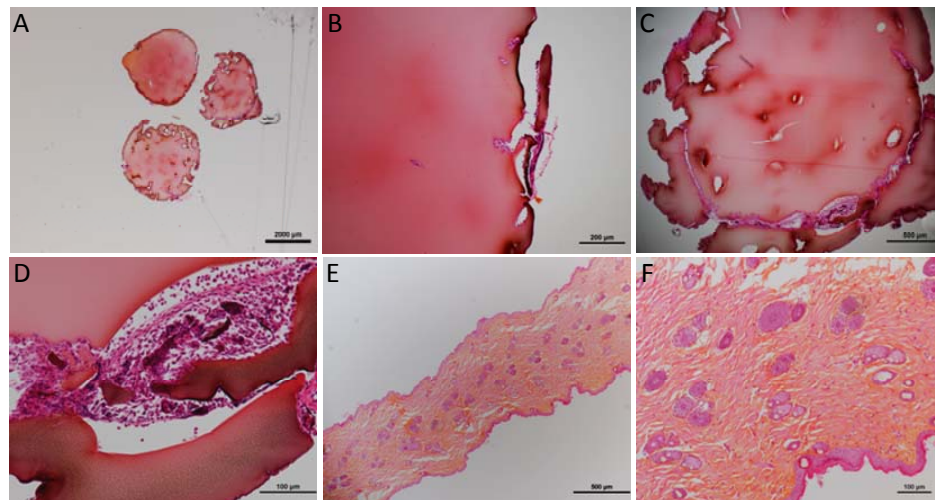


Figure 8. Histological sections of alginate@TiO₂ capsules (A-D) and subcutaneous tissue (E, F) of tissues recovered from TiO₂ subgroup collected 2 days post-surgery.

Overgrowth can be observed around capsule external layer. There is no trace of inflammation in subcutaneous tissue.

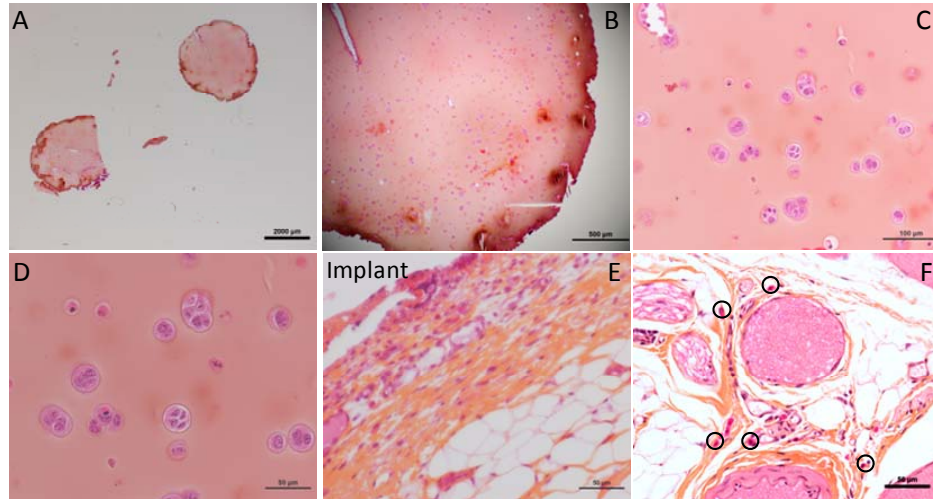


Figure 9. Histological sections of alginate@TiO₂ capsules with HepG2 (A-D) and subcutaneous tissue (E, F) of tissues recovered from TiO₂-Cells subgroup collected 2 days (A-E) and 2 months (F) post surgery.

Morphology of entrapped material suggests that cells were still alive. Overgrowth is observed to a lesser extent than for ASA beads near capsule surface. Circles identified mast cells.

Fluorescein diacetate (FDA) is a fluorescent dye enabling to observe living cells with active intracellular esterases as these enzymes allow the release of fluorescein from FDA. Living cells with intact membranes thus exhibit a green fluorescence. Beads or capsules recovered from rat implants were cut in fine slices and deposited on a microscope slide prior incubation with the viability probe. Figure 10 shows selected micrographs of ASA implants with or without HepG2 cells taken in brightfield and fluorescent mode. We observed the colonization of the beads surface by surrounding cells, as already shown by histological sections (Figure 6C, 7C). The histological observations of the morphology of entrapped HepG2 cells corroborate the previous observations since none of them exhibited green fluorescence. As *in vitro* experiments demonstrated the survival of enclosed HepG2 cells in such beads for more than 6 weeks, these results suggest an inefficient *in vivo* immune-isolation within ASA hybrid shell.

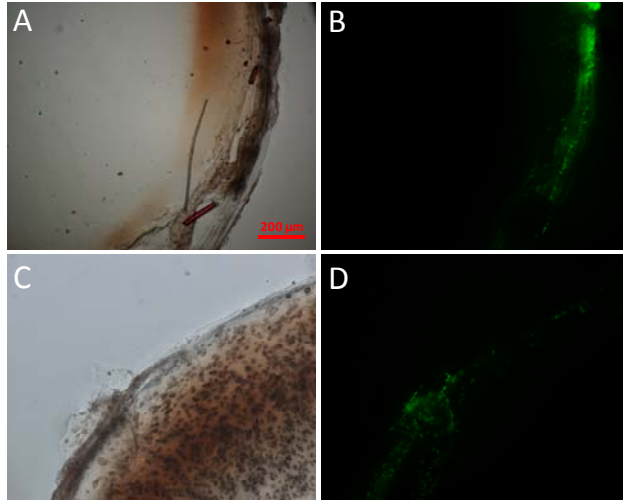


Figure 10. Microscopy images of ASA implants recovered 2 days post-surgery and incubated within FDA (viability stain).

Brightfield (A, C) and fluorescent microscopy images (B, D) of ASA implants without (A, B) or with (C, D) encapsulated HepG2 cells. Surrounding cells colonizing implants can be observed at the surface but entrapped HepG2 cells were not longer alive.

Figure 11 shows that most of the HepG2 cells entrapped in alginate@TiO₂ microcapsules seemed to be alive 2 days after implantation in rats, suggesting a best suited porosity of alginate-titania composite. The presence of overgrowth can also be highlighted at the implant surface of alginate@TiO₂ microcapsules but to a lesser extent than for ASA material. This overgrowth seems to colonize only the eroded parts of the capsules where the TiO₂ crust has disappeared while it is present all around ASA beads. A possible explanation could be the diffusion of small molecules such as chemokines/cytokines (< 30 kDa) produced by the encapsulated cells, that would diffuse through the permeable calcium-alginate membrane. These small molecules could attract macrophages and induce fibrosis around the implants [56]. This fibrotic overgrowth may have the effect to limit the bidirectional diffusion through the beads or capsules and to deprive the encapsulated cells of essential nutrients and oxygen, leading to hypoxia and necrosis.

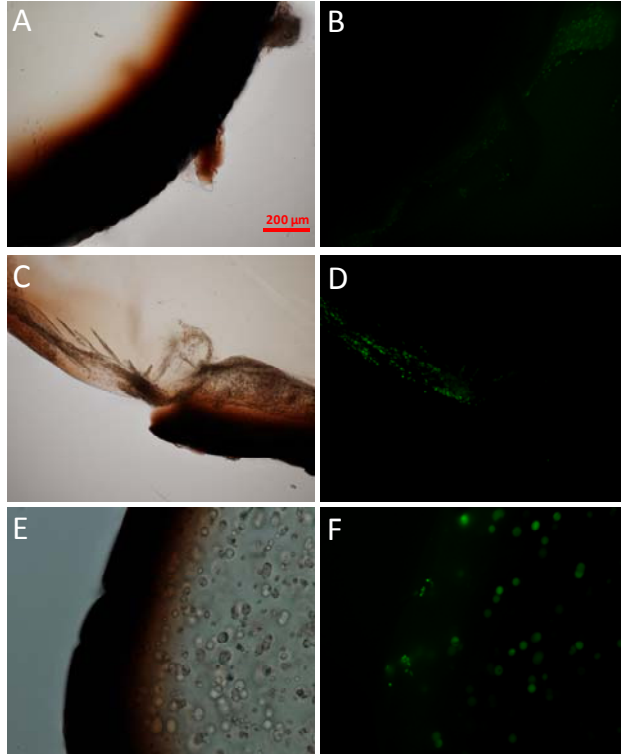


Figure 11. Microscopy images of alginate@TiO₂ implants recovered 2 days post-surgery and incubated within FDA (viability stain).

Brightfield (A, C) and fluorescent microscopy images (B, D) of ASA implants without (A, B) or with (C, D) encapsulated HepG2 cells. Surrounding cells colonizing implants can be observed at the surface and entrapped HepG2 cells were still alive.

3. CONCLUSIONS

The present study evaluated the *in vivo* biocompatibility and immune-isolation of entrapped cells in hybrid devices designed for cell therapy. These HepG2 cells-enclosing systems merged the advantages while avoiding the drawbacks of most common materials used in the field of bioencapsulation by combining the biocompatible polysaccharide alginate with robust silica or titania to obtain full alginate-silica beads covered by an external layer of purified alginate (ASA) and alginate microcapsules reinforced by a layer of titanium dioxide (alginate@TiO₂)

IL-6 and MCP-1 concentration respectively measured in rat blood plasma and animal tissue lysates; examination of histological sections of muscles and subcutaneous tissues surrounding implants as well as implants themselves showed no difference of biocompatibility between the different types of implants. Furthermore, beads or capsules-implanted rats did not present more inflammation than the control group. However, histological observations of entrapped HepG2 cells and intracellular enzyme activity of these cells demonstrated using FDA fluorescent probe showed that immune-isolation of enclosed human cells was more efficient in alginate-titania material as more encapsulated cells seemed to stay alive. All together, these results show that alginate@TiO₂ microcapsules possess all the required properties to be used in the field of medicinal applications such as cell therapy.

4. MATERIALS AND METHODS

4.1. Chemical materials

Alginic acid sodium salt, from brown algae (for immobilization of microorganisms), calcium chloride (dihydrate, 99 %), ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA, tetrasodium salt, 97 %), hydrochloric acid (Molecular Biology Grade, 36.5-38.0 %), sodium hydroxide (reagent grade, 98 %, anhydrous), chloroform (anhydrous, 99 %), titanium(IV) bis(ammonium lactato)dihydroxide solution (TiBALDH, 50 wt. % in H₂O) and poly(diallyldimethylammonium) chloride solution (PDDAC, average Mw 100,000-200,000, 20 wt. % in H₂O), glutaraldehyde (50 wt. % in H₂O) and fluorescein diacetate (FDA, used as a cell viability dye) were purchased from Sigma-Aldrich; sodium silicate (extra pure, assay (acidimetric, SiO₂) 25.5-28.5 %) from Merck; and ethanol (absolute) from Fisher. PBS (Phosphate Buffered Saline, 0.0067 M (PO₄), For Cell Culture) was supplied by Lonza. Dulbelcco's Modified Eagle Medium (DMEM, 31885) and foetal bovine serum were provided by Invitrogen (Casbald, USA).

Sodium alginate powder was purified as described by de Vos *et al.* [37] before its utilization in order to remove Mg⁺² and Ca⁺² cations as well as proteins from the crude commercial product.

4.2. Biological materials

The biological material encapsulated was HepG2 cells (Hepatocellular Carcinoma Cell line), purchased from the American Type Culture Collection (ATCC HB-8065). Prior encapsulation, cells were collected in fresh culture medium (DMEM supplemented with 10 % of foetal bovine serum) after being washed with PBS, treated with a trypsin/EDTA cocktail and centrifuged. 2 mL of the cell suspension was used for

culture and future encapsulation and were added to 75-cm² flasks (Costar, Lowell, USA) filled with 18 mL of culture medium with serum.

4.3. Encapsulation in mineralized beads or microcapsules

The procedure to encapsulate HepG2 cells in alginate-silica/alginate mineralized beads (ASA) and in alginate/titania microcapsules (alginate@TiO₂) was performed from the same batch of cells and with the same purified alginate solution. The final cell density in ASA beads and alginate@TiO₂ microcapsules was 2.2 10⁶ cells mL⁻¹.

ASA. The encapsulation and synthesis of the material was performed as previously reported by Dandoy *et al.* [44] with some modifications. HepG2 cells collected in fresh culture medium were first mixed with a 3 wt. % buffered sodium alginate solution (pH 7.4). This mixture was extruded on a CaCl₂ solution (110 mM) using sterile 3.0 mL plastic Pasteur pipettes (provided from VWR) and let incubate for 5 minutes to get Ca-alginate capsules. These microcapsules were then transferred in a diluted sodium silicate solution (1.5 M) for 1 minute to allow the formation of alginate/silica mineralized beads. Finally, an external crust of Ca-alginate was produced around the beads by immersed them successively in a fresh buffered sodium alginate solution (1.5 wt. %) and in a calcium chloride solution (110 mM) for 5 minutes. The ASA beads were collected and stored in test tubes filled with 5.0 mL of fresh culture medium and maintained at 37°C in a humid atmosphere of 5 % CO₂ for 4 days before implantation.

Alginate@TiO₂. The cell suspension was mixed with the 3.0 wt. % sodium alginate solution and this cocktail was mixed with an equal volume of 250 mM titanium precursor solution, prepared in culture medium without serum. Then, the

mixture was dropped in a solution of 100 mM calcium chloride and PDDAC using a sterile 3.0 mL plastic Pasteur pipette. After five minutes of incubation, the polymerization of TiBALDH induced by the polycation generated a white solid crust of titanium dioxide surrounding the polymeric capsules. The hybrid alginate@TiO₂ capsules were then recovered similarly as for ASA beads. All the solutions used for the synthesis of this material were previously adjusted at pH 7.4.

4.4. Animal experiments

4.4.1. Ethics statement

The present work fulfills the statements of the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the project was validated by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the University of Namur (Record Number: FUNDP AR 10/136).

4.4.2. Animals

The first experiment was performed on 16 weeks old female Wistar rats bred in our animal facility under controlled environmental conditions. The second experiment was performed on 11 weeks old female Wistar rats purchased from Harlan. The animals were fed with a standard rat food diet and had free access to water. They were housed 2 per type III/H cage with an enriched environment.

4.4.3. Surgical procedure

Firstly, anesthesia was performed on animals by an intraperitoneal (i.p.) injection of a mix of ketamine and xylazine (2 mL/kg of a 100 mg/mL ketamine/200 mg/mL xylazine isotonic saline solution) using a 25G needle. They were then placed on a heated table maintaining a constant body temperature of 37°C. Perioperative analgesia was also administrated (i.p. injection of a 20 mg/mL buprenorphin isotonic

saline solution in an amount of 500 $\mu\text{L/kg}$). We performed a skin incision of about 1 cm along the back midline located between the shoulder blades. After blunt dissection of tissue, three capsules or beads were implanted subcutaneously on each side of the incision, which was closed using absorbable 4-0 Ethicon Vicryl suture thread. The rats were then allowed to recover under a heat lamp. During all the experiments, the animals were daily examined in order to evaluate their welfare. Various parameters were considered such as their rodent habits, their behavior to detect prospective anxiety or discomfort, their feeding and their weight. We also assessed inflammation potentially induced by implanted materials by identifying surgical site irritation or trace of scratching at this site. If inflammation was detected, a local antiseptic treatment was applied (Astrexine powder, chlorhexidin hydrochlorid, supplied by Pierre Fabre, France). At the end of the experiments, animals were euthanized with an i.p. injection of Nembutal (200 mg/kg, 25G needle) followed by a cervical dislocation. For the second experiment, the rats were first anesthetized before euthanasia, according to the protocol described above, in order to take blood samples that allowed the assessment of the direct inflammatory response by quantifying IL-6 concentration in plasma. The blood sampling was performed by intracardiac puncture using a 23G needle. After euthanasia, beads and capsules were first collected for characterization. Afterwards, surrounding tissues were sampled in order to assess local inflammation.

Experimental groups. For each experiment, three groups were considered:

- Control group (n=5 for the first experiment, n=8 for the second experiment): anaesthesia, surgery without implantation and recovery of tissues and blood were performed on rats.
- ASA bead group. This group was divided in two subgroups. In the first one, blank beads not containing HepG2 cells were implanted in rats (ASA subgroup, n=5 for

each experiment) and in the second one, animals were implanted with beads containing encapsulating cells (ASA-Cells subgroup, n=5 for first experiment, n=6 for second experiment).

- alginate@TiO₂ microcapsule group. This group was divided in two subgroups, in the same manner as ASA beads group. The first included rats implanted with blank capsules with no entrapped cells (TiO₂ subgroup, n=5 for each experiment) and the second was composed of animals receiving implants containing HepG2 cells (TiO₂-Cells subgroup, n=5 for each experiment).

4.5. Characterization techniques

4.5.1. Material properties

ASA beads and alginate@TiO₂ microcapsules were progressively dehydrated with ethanol and dried through a critical point drying process using liquid carbon dioxide to obtain aerogels. Implants collected after euthanasia of rats underwent the same process but were previously fixed in a 3 wt. % glutaraldehyde solution. Morphological properties were assessed using field emission scanning electron microscopy (FE-SEM) on a JEOL JSM-7500F electron microscope. Prior observation, the samples were sputter-coated with gold. The chemical composition of the different capsules was determined by a energy-dispersive X-rays analysis system (EDX, acceleration voltage = 15.00 kV, working distance = 8 mm).

4.5.2. Cell viability

The intracellular enzymatic activity of entrapped cells was assessed by the use of a vital dye staining (fluorescein diacetate, FDA). The intracellular esterases of living cells can release fluorescein from FDA. This molecule stays confined inside cells as the membrane integrity is preserved so that living HepG2 cells exhibit a green

fluorescence. Encapsulated cells were incubated within diluted FDA (5 μ M, in culture medium) for 5 minutes at room temperature. A fluorescent Multizoom AZ100 microscope (Nikon) allows the collection of micrographs, either in brightfield mode or in fluorescent mode. The pictures were taken at 536/40 nm with a colour camera (DSRi1, Nikon) by illuminating the samples with a 482/35 nm excitation light.

4.6. Histological staining

Subcutaneous tissues and part of collected beads or capsules were fixed in Duboscq-Brazil fluid for 48 h, then transferred in baths of ethanol, butanol and paraffin. They were then embedded in paraffin and cut into 6 μ m sections for staining allowing histological examination. For this purpose, HES protocol was processed, using a trichromic stain (Haematoxylin – Eosin – Safranin). Briefly, the microscope slides were successively passed through baths of toluene, methanol, water, haematoxylin, water, hydrochloric acid supplemented with ethanol, water, eosin, water, ethanol, isopropanol, safranin, isopropanol and toluene thanks to an automated stainer (COT 20 manufactured by Medite, Inc). DPX (for Distyrene, Plasticizer (tricresyl phosphate) and Xylene) was used to attach coverslips to the slides. A Multizoom AZ100 microscope (Nikon) allowed the histological observation of tissue with a DSRi1 camera in bright-field mode.

4.7. ELISA

The quantity of IL-6 in plasma samples was determined using an ELISA kit purchased from RayBiotech, Inc. (RayBio Rat IL-6 ELISA Kit). Plasma samples were collected by putting blood samples in 5 mL test tubes supplemented with 0.4 mL of

citrate buffer (Venoject, Terumo) to avoid coagulation and centrifuged immediately at 2500 rpm for 10 minutes. Supernatant was collected and stored in eppendorf at -80°C.

The quantity of MCP-1 in tissue lysates was determined using a MCP-1 ELISA kit (RayBiotech, Inc.). The collected muscle samples, stored at -80°C, were firstly lysed in PBS using a tissue homogenizer. The quantity of total proteins in tissue lysate was assessed using a dye reagent (Bio-Rad Protein Assay) and measuring absorbance at 595 nm. The concentration of MCP-1 measured was normalized per mg of total proteins in a tissue lysate sample.

4.8. Statistical analysis

Statistical analysis was performed to compare IL-6 and MCP-1 concentration data between Wistar rats with or without implants. The non-parametric two-tailed Mann-Whitney U test was applied with *p*-values less than 0.05 being considered as significant. These analyses were performed using XLSTAT 2013 software (Addinsoft).

ACKNOWLEDGMENTS

Grégory Leroux is grateful to the University of Namur for his research grant. The authors also thank Laetitia Giordano and Vanessa Colombaro from URPhyM for their help and advices with animals. Finally, Prof. Yves Poumay, Daniel Van Vlaender and Valérie De Glas from LabCeTi are sincerely thanked for their support in histological techniques and examination. The present work is in accordance with the rules of the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the project was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the University of Namur.

REFERENCES

- [1] A. Léonard, P. Dandoy, E. Danloy, G. Leroux, C.F. Meunier, J.C. Rooke and B.-L. Su, *Chem. Soc. Rev.*, 2011, **40**, 860-885.
- [2] M. Campàs, R. Carpentier and R. Rouillon, *Biotechnol. Adv.*, 2008, **26**, 370-378.
- [3] T. Oczkowski, E. Zwierkowska and S. Bartkowiak, *Bioelectrochemistry*, 2007, **70**, 192-197.
- [4] C.F. Meunier, J.C. Rooke, A. Léonard, H. Xie and B.-L. Su, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 3843, 3859.
- [5] J.C. Rooke, A. Léonard, H. Sarmento, C.F. Meunier, J.-P. Descy and B.-L. Su, *J. Mater. Chem.*, 2011, **21**, 951-959.
- [6] J.C. Rooke, A. Léonard, H. Sarmento, C.F. Meunier, J.-P. Descy and B.-L. Su, *J. Mater. Chem.*, 2008, **18**, 2833-2841.
- [7] J.-S. Cheng and Y.-J. Yuan, *Proteomics*, 2006, **6**, 2199-2207.
- [8] H. Dörnenburg, *Process Biochem.*, 2004, **39**, 1369-1375.
- [9] G. Carturan, R. Dal Monte, G. Pressi, S. Secondin and P. Verza, *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 1998, **13**, 273-276.
- [10] T.V. Laurinavichene, A.S. Fedorov, M.L. Ghirardi, M. Seibert and A.A. Tsygankov, *Int. J. Hydrogen Energy*, 2006, **31**, 659-667.
- [11] J.J. Hahn, M.L. Ghirardi and W.A. Jacoby, *Biochem. Eng. J.*, 2007, **37**, 75-79.
- [12] D.J. Dickson, C.J. Page and R.L. Ely, *Int. J. Hydrogen Energy*, 2009, **34**, 204-215.
- [13] P. Dandoy, C.F. Meunier, C. Michiels and B.-L. Su, *PLoS One*, 2011, **6(6)**, e20983, DOI: 10.1371/journal.pone.0020983.
- [14] G. Carturan, R. Dal Toso, S. Boninsegna and R. Dal Monte, *J. Mater. Chem.*, 2004, **14**, 2087-2098.
- [15] E.J. Pope, K. Braun and C.M. Peterson, *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 1997, **8**, 635-637.
- [16] J. Livage, T. Coradin and C. Roux, *J. Phys.: Condens. Matter*, 2001, **13**, 673-691.
- [17] A. Nieto, S. Areva, T. Wilson, R. Viitala, M. Vallet-Regi, *Acta Biomater.*, 2009, **5**, 3478-3487.
- [18] M.F. Desimone, G.S. Alvarez, M.L. Foglia and L.E. Diaz, *Recent Pat. Biotechnol.*, 2009, **3**, 55-60.
- [19] G. Orive, A. R. Gascón, R. M. Hernández, M. Igartua and J. L. Pedraz, *Trends Pharmacol. Sci.*, 2003, **24**, 207-210.
- [20] G. Orive, R.-M. Hernández, A.R. Gascón, R. Calafiore, T.M.S. Chang, P. de Vos, G. Hortelano, D. Hunkeler, I. Lacík and J.L. Pedraz, *Trends Biotechnol.*, 2004, **22**, 87-92.
- [21] S.R. King, R. Dorian and R.W. Storrs, *Graft*, 2001, **4**, 491-499.
- [22] J.A. Nagy, K.T. Herzberg, E.M. Masse, G.P. Zientara and H.F. Dvorak, *Cancer Res.*, 1989, **49**, 5448-5458.

- [23] T.A. Desai, D. Hansford and M. Ferrari, *J. Membr. Sci.*, 1999, **159**, 221-231.
- [24] A. Bartkowiak, L. Canaple, I. Ceausolglu, N. Nurdin, A. Renken, L. Rindibacher, C. Wandrey, B. Desvergne and D. Hunkeler, *Annals of the NY Acad. Sci.*, 1999, **875**, 135-145.
- [25] C.F. Meunier, P. Dandoy and B.-L. Su, *J. Colloid Interface Sci.*, 2010, **342**, 211-224.
- [26] A. Coiffier, T. Coradin, C. Roux, O.L.M. Bouvet and J. Livage, *J. Mater. Chem.*, 2001, **11**, 2039-2044.
- [27] A.J. Di Pasqua, K.K. Sharma, Y.-L. Shi, B.B. Toms, W. Ouellette, J.C. Dabrowiak and T. Asefa, *J. Inorg. Biochem.*, 2008, **102**, 1416-1423.
- [28] G. Arcangeli, V. Cupelli and G. Giuliano, *Sci. Total Environ.*, 2001, **270**, 135-139.
- [29] E.-J. Park and K. Park, *Toxicol. Lett.*, 2009, **184**, 18-25.
- [30] H. Nabeshi, T. Yoshikawa, K. Matsuyama, Y. Nakazato, S. Tochigi, S. Kondoh, T. Hirai, T. Akase, K. Nagano, Y. Abe, Y. Yoshioka, H. Kamada, N. Itoh, S. Tsunoda and Y. Tsutsumi, *Part. Fibre Toxicol.*, 2011, **8**, DOI: 10.1186/1743-8977-8-1.
- [31] A. Murua, A. Portero, G. Orive, R.M. Hernández, M. de Castro and J.L. Pedraz, *J. Control. Release*, 2008, **132**, 76-83.
- [32] A.C. Jen, M. Conley Wake and A.G. Mikos, *Biotechnol. Bioeng.*, 1996, **50**, 357-354.
- [33] N.C. Hunt and L.M. Grover, *Biotechnol. Lett.*, 2010, **32**, 733-742.
- [34] R.M. Hernandez, G. Orive, A. Murua and J.L. Pedraz, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2010, DOI: 10.1016/j.addr.2010.02.004.
- [35] W. Wang, X. Liu, Y. Xie, H. Zhang, W. Yu, Y. Xiong, W. Xie and X. Ma, *J. Mater. Chem.*, 2006, **16**, 3252-3267.
- [36] P. de Vos, A.F. Hamel and K. Tatarkiewicz, *Diabetologia*, 2002, **45**, 159-173.
- [37] P. de Vos, M. Spasojevic, B.J. de Haan, M.M. Faas, *Biomaterials*, 2012, **33**, 5552-5559.
- [38] S. Ponce, G. Orive, R. Hernández, A. R. Gascón, J.L. Pedraz, B.J. de Haan, M.M. Faas, H.J. Mathieu and P. de Vos, *Biomaterials*, 2006, **27**, 4831-4839.
- [39] B.L. Strand, L. Ryan, P.I. Veld, B. Kulseng, A.M. Rokstad, G. Skjåk-Braek and T. Espevik, *Cell Transplant.*, 2001, **10**, 263-275.
- [40] S. Boninsegna, R. Dal Toso, R. Dal Monte and G. Carturan, *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 2003, **26**, 1151-1157.
- [41] S. Sakai, T. Ono, H. Ijima and K. Kawakami, *Biomaterials*, 2001, **22**, 2827-2834.
- [42] T. Coradin, N. Nassif and J. Livage, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2003, **61**, 429-434.
- [43] P. Dandoy, C.F. Meunier, G. Leroux, V. Voisin, L. Giordano, N. Caron, C. Michiels and B.-L. Su, *PLoS One*, 2013, **8(1)**, e54683, DOI: 10.1371/journal.pone.0054683.

- [44] J.D. Bass, D. Grosso, C. Boissiere, E. Belamie, T. Coradin and C. Sanchez, *Chem. Mater.*, 2007, **19**, 4349-4356.
- [45] Y. Chen, Y. Yi, J.D. Brennan and M.A. Brook, *Chem. Mater.*, 2006, **18**, 5326-5335.
- [46] K. Cai, J. Bossert and K.D. Jandt, *Colloids Surf., B*, 2006, **49**, 136-144.
- [47] T. López, E. Ortiz, P. Quintana and R.D. González, *Colloids Surf., A*, 2007, **300**, 3-10.
- [48] G. Leroux, C.F. Meunier, C. Michiels and B.-L. Su, *Article 1 de cette thèse, soumis (J. Mat. Chem. B)*.
- [49] Y. Yan, B. Hao, X. Wang and G. Chen, *Dalton Trans.*, 2013, **42**, 12179-12184.
- [50] X. Shi, T. Cassagneau and F. Caruso, *Langmuir*, 2002, **18**, 904-910.
- [51] D. Fischer, Y. Li, B. Ahlemeyer, J. Krieglstein and T. Kissel, *Biomaterials*, 2003, **24**, 1121-1131.
- [52] C. Rival, M.S. Theas, V.A. Guazzone and L. Lustig, *J. Reprod. Immunol.*, 2006, **70**, 43-58.
- [53] T. van der Poll, C.V. Keogh, X. Guirao, W.A. Buurman, M. Kopf and S.F. Lowry, *J. Infect. Dis.*, 1997, **176**, 439-444.
- [54] M.J. Craig and R.D. Loberg, *Cancer Metastasis Rev.*, 2006, **25**, 611-619.
- [55] C. Gerard and B.J. Rollins, *Nat. Immunol.*, 2001, **2**, 108-115.
- [56] V. Vaithilingam and B.E. Tuch, *Rev. Diabet. Stud.*, 2011, **8**, 51-67.

Chapitre 6.

***Encapsulation de cellules β au sein des
matrices poreuses pour la délivrance
d'insuline sous stimulation par le glucose***

Chapitre 6

Encapsulation de cellules β au sein des matrices poreuses pour la délivrance d'insuline sous stimulation par le glucose

6.1. Avant-propos

Les microcapsules alginate@TiO₂ ont précédemment démontré qu'elles possédaient toutes les caractéristiques requises pour la conception d'un pancréas artificiel. Il s'agit maintenant de démontrer que ce matériau assure bien l'encapsulation de cellules β fonctionnelles sécrétant de l'insuline en réponse à une stimulation par du glucose *in vitro*. La culture de cellules β primaires en laboratoire est particulièrement difficile. Etant donné qu'il est nécessaire d'isoler régulièrement ces cellules de tissus animaux ou humains, de nombreuses recherches furent menées durant ces 30 dernières années sur la conception de lignées de cellules immortelles sécrétant de l'insuline (RIN¹, MIN², β TC³) mais la plupart d'entre elles répondent très faiblement ou de manière non-appropriée aux stimulations par du glucose. Les cellules INS-1E, une lignée clonale de cellules INS-1 (voir *point 2.2.1.2*), furent sélectionnées car elles possèdent l'avantage de produire une grande quantité d'insuline en réponse aux stimulations par du glucose à une concentration physiologique tandis que leur seul désavantage provient de la nécessité d'inclure du mercaptoéthanol, composé normalement toxique pour les cellules, dans leur milieu de culture. De plus, il s'agit de cellules issues d'un insulinome de rat, ce qui pourrait permettre par la suite d'étudier la régulation de la glycémie de rats diabétiques après implantation de microcapsules contenant ces cellules.

L'article qui suit démontre que les cellules INS-1E encapsulées dans les microcapsules alginate@TiO₂ répondent toujours aux stimulations par du glucose et ce jusqu'à plus de 40 jours post-encapsulation et que l'insuline diffuse parfaitement au

¹ P.A. Halban, G.A. Praz, C.B. Wollheim, *Biochem. J.*, 1983, **212**, 439-443.

² J.-I. Miyazaki, K. Araki, E. Yamato, H. Ikegami, T. Hasano, Y. Shibasaki, Y. Oka, K.-I. Yamamura, *Endocrinology*, 1990, **127**, 126-132.

³ S. Efrat, *Annals of the NY Acad. Sci.*, 1999, **875**, 286-293.

travers de la matrice, révélant de la sorte tout le potentiel de ce matériau pour le traitement du diabète de type 1.

Encapsulation of beta INS-1E Cells in Alginate@TiO₂ Microcapsules for the Controlled Delivery of Insulin

Grégory Leroux^{1,a}, Christophe F. Meunier^{1,b}, Carine Michiels², Bao-Lian Su^{1,*}

¹Laboratory of Inorganic Materials Chemistry (CMI),

²Laboratory of Biochemistry and Cellular Biology (URBC) - NARILIS
University of Namur, 61 rue de Bruxelles, B-5000 Namur, Belgium

ABSTRACT

Background: Type 1 diabetes mellitus is a disease increasingly widespread all around the world. As organ transplantation is limited by donor supply and needs to follow harsh and live-long immunosuppressive medication, the development of new devices for microencapsulation of xenogeneic insulin-releasing β -cells is a big challenge.

^a Assistant at University of Namur, Belgium

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

* Corresponding author. tel: +32 81 724531, fax +32 81 725414, e-mail Address:

bao-lian.su@unamur.be

Methodology/Principal findings: The current work evaluated the potential of an original alginate/TiO₂ hybrid core/shell structure as a reservoir of rat insulinoma-derived INS-1E cells, as a β -cell surrogate, for the treatment of type 1 diabetes mellitus. The hybrid material is a purified alginate microcapsule acting as a template for the formation of a layer of robust titanium dioxide. This layer is deposited according to a biomimetic approach involving an aqueous stable precursor (TiBALDH) and a long chain quaternary ammonium polymer (PDDAC). This hybrid microcapsule is thus prepared in a very simple and rapid one-step process under mild conditions, at room temperature. This device was validated by the examination of morphological properties (SEM) and chemical composition (EDX) of the core and the external layer of the material. The encapsulation of insulin-secreting INS-1E cells within the hybrid microcapsules revealed a high survival rate over more than 6 weeks as measured by their oxygen consumption and the use of a vital fluorescent stain. Entrapped cells also maintained response to glucose stimulation over the same period as shown by the monitoring of their insulin secretion.

Conclusions/Significance: The present study highlights the high survival rate of INS-1E cells encapsulated within alginate@TiO₂ hybrid microcapsules compared to simple purified alginate shells. The entrapped cells retained their responsive property to glucose for insulin secretion. This hormone was able to diffuse out of the shell, as required for cell therapy, making alginate@TiO₂ capsules an ideal device for treatment of type 1 diabetes mellitus to maintain glucose homeostasis.

1. INTRODUCTION

Among several human disorders involving hormone or proteins deficiency, type 1 diabetes mellitus is certainly one of the most widespread nowadays. This autoimmune disease leads to the destruction of insulin secreting β -cells, disrupting glucose homeostasis. The discontinuous insulin administration and the use of injection devices can certainly facilitate the life of patients but only delay the complications of the disease. Many efforts are made to design an appropriate treatment. Transplantation of islets of Langerhans has evolved into a prospective treatment as it allows the recovery of an endogenous insulin secretion and the control of glycaemia in insulin-dependent patients [1]. However, this treatment presents various restrictions such as very limited donor supply, in general one donor for 300 patients. Moreover, a patient required generally more than one donor [2]. Furthermore, about 90 % of insulin-dependence recurrence 5 years post-transplantation has been observed [3]. Finally, such transplantation requires a strong and life-long immunosuppressive medication inducing severe side-effects [4-6].

An alternative to avoid immunosuppression and its drawbacks is to separate the islets (or β -cells) from the host immune system by introducing a semi-permeable membrane that would prevent the entry of immune defenders while allowing the diffusion of essential nutrients, oxygen, metabolites and insulin through this barrier [7, 8]. This concept of immune-isolation could be applied to other human disorders such as Parkinson's disease, anaemia, Alzheimer's disease or dwarfism [9-12]. It has been first introduced by Bisceglie 80 years ago [13]. Since then, this kind of cell therapy methodologies has been largely used. Polymeric microcapsules proved to be suitable materials for such medical applications. Among them, sodium alginate can be quoted as the most referenced [14-16]. This natural copolymer extracted from brown algae forms

small spheres with a solid crust and a liquid cell-reservoir core once added dropwise to a solution containing calcium ions thanks to a cross-linking reaction occurring between these cations and carboxylate functions of the biopolymer. Chitosan, agarose and collagen are other polymers that could be used in microencapsulation [17-19]. However, despite their biocompatibility, their ideal surface/volume ratio, their protection of entrapped biological materials against mechanical stress and their modular viscosity properties, they present weak mechanical resistance. This is why alginate spheres, which exhibit anionic surface, are generally coated with cationic macromolecule such as PLL (Poly-L-Lysine) or PLO (Poly-L-Ornithine) in order to improve their mechanical strength [20, 21]. Nevertheless, these molecules are referenced as inflammatory cell attractor so that an outer purified alginate layer is added around capsules.

Dandoy *et al.* reported the use of alginate beads mineralized with silica and recovered with an external layer of calcium alginate for cell entrapment [22, 23]. This material takes profit of the biocompatibility of alginate and the improved stability and the mechanical properties of silica while avoiding the usual drawbacks of SiO₂ materials such as the mechanical stress induced by matrix contraction or the release of toxic by-products during sol-gel reaction [24-27]. Mechanical properties could be even further improved by using TiO₂ instead of SiO₂ as titania generally exhibits enhanced mechanical strength, pH stability and thermal resistance [28, 29]. Furthermore, the dissolution problem of SiO₂ occurred in *in vivo* condition [30] can be eliminated.

Recently, a new biomimetic synthesis of SiO₂ or TiO₂ has been reported, based on the mechanism of formation of diatoms exoskeleton. Indeed, long chain polyamines such as PLL or amine-terminated dendrimers could interact with silicic acid derivatives and allow biosilicification in diatoms. These molecules are also able to play the role of

catalyst in the formation of titanium dioxide; under mild conditions, from titanium(IV) bis(ammonium lactato)dihydroxide (TiBALDH), a water stable precursor [31-35].

In this context, we have reported the design, synthesis and application in the field of cell encapsulation of a biocompatible hybrid alginate@TiO₂ microcapsule prepared in a simple and rapid one-step process under mild conditions. These capsules have been synthesized using poly(diallyldimethylammonium) chloride (PDDAC), a water-soluble and biocompatible polyamine [36], as a catalyst for the destabilization of TiBALDH. Sodium alginate acts as a host for the cells and as a template for the polymerization of the precursor to obtain a hybrid external layer composed of calcium alginate and TiO₂ with a reduced pore size, reinforcing the material and acting as a molecular sieve to avoid the entry of immune defenders. The spherical particles of about 5 mm of diameter are white-colored and quite robust with a TiO₂ layer of about 400 μm of thickness. These microcapsules exhibited thus improved mechanical properties compared with alginate/silica composite and allowed *in vitro* survival of entrapped HepG2 cells for more than 40 days as well as excellent diffusion of albumin outside of the capsule [37]. They also displayed *in vivo* biocompatibility and improved properties of immune-isolation [38].

The present study assesses the potential of these capsules as a reservoir of insulin-secreting xenogeneic β-cells or of pancreatic islets to maintain glucose homeostasis. Rat insulinoma-derived INS-1E cells have been used as they constitute a widely used β-cell surrogate and as they secrete insulin in response to glucose concentrations in the physiological range [39-41].

2. RESULTS AND DISCUSSION

2.1. Material characterization

Materials used in the field of medical applications and more particularly in cell therapy have to meet some criteria such as biocompatibility towards encapsulated biological materials and host organism, mechanical properties maintaining long-term *in vivo* performance and a high porosity with a pore size that allows the diffusion of nutrients and metabolites while avoiding the entry of immune defenders. As the molecular weight of immunoglobulin G (IgG), the smallest defender of our immune system, is assessed to be 150 kDa, a MWCO (Molecular Weight Cut-Off) of about 17 nm (generally referenced up to 20 nm) would fit this application, according to the equation of Stokes [42-45]. Alginate@TiO₂ microcapsule exhibits a MWCO of about 4 to 12 nm, satisfying the requirement for immune-isolation.

A study on morphological properties of alginate@TiO₂ microcapsules and encapsulated INS-1E cells was performed. INS-1E cell survival within this hybrid material as well as their ability to maintain their response to glucose concentrations were then quantified. The potential of these microcapsules as a device for cell therapy to treat type 1 diabetes mellitus is thus then evaluated.

Purified alginate and alginate@TiO₂ microcapsules were supercritically dried with liquid carbon dioxide in order to preserve their structure and the porous network by avoiding capillary actions. The aerogels obtained have been characterized by scanning electron microscopy (SEM). Figure 1 shows micrographs of the surface and the inner core of alginate capsules as well as of INS-1E cells enclosed within this matrix. Microcapsules were kept up to 47 days in culture medium, with a well-preserved morphology. Alginate@TiO₂ microcapsules are presented at Figure 2, where we can see a cross-section of the shell, highlighting the presence of a TiO₂ crust and the

presence of cells well dispersed within the core part of the material. The inner portion of the mineralized capsule (Figure 2C) presents the same morphological properties as those of the inner part of simple polymeric capsule (Figure 1B) confirming that the polymerization of the titanium precursor occurred at the external surface of the material. The outer parts of the capsules present differences as cracks of about 10 μm can be observed at the external surface of purified alginate capsule stored for 47 days in culture medium (37°C/5 % CO_2) (Figure 1A(i)) while mineralized microcapsule shows a very dense surface after 40 days in the same conditions (Figure 2B). Furthermore, Figure 1A(ii) shows that cracks at the external surface of alginate capsule are not present immediately after preparation. These observations suggest an enhanced mechanical property of hybrid alginate-titania material and a more effective protection against immune defenders, as already reported [37]. It is worth noting that the entrapped INS-1E cells are grouped into small clusters, in the same manner as in culture conditions.

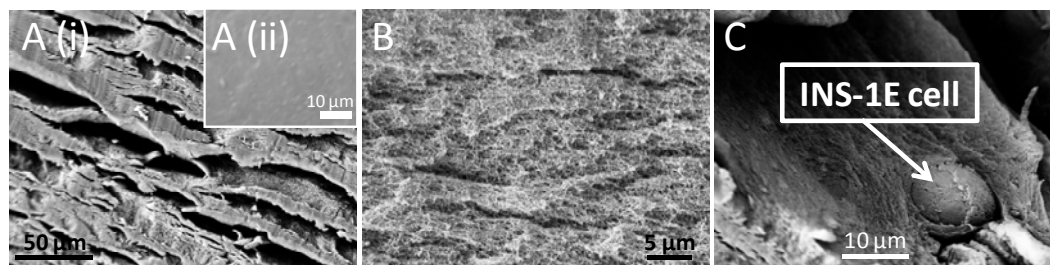


Figure 1. Scanning electron microscopy micrographs of the surface (A) and core (B) of a purified alginate capsule as well as INS-1E cells encapsulated within this capsule (C).

The material was kept 47 days in culture medium (except A(ii) which is a control observed directly after preparation) and was supercritically dried with CO_2 prior analyses.

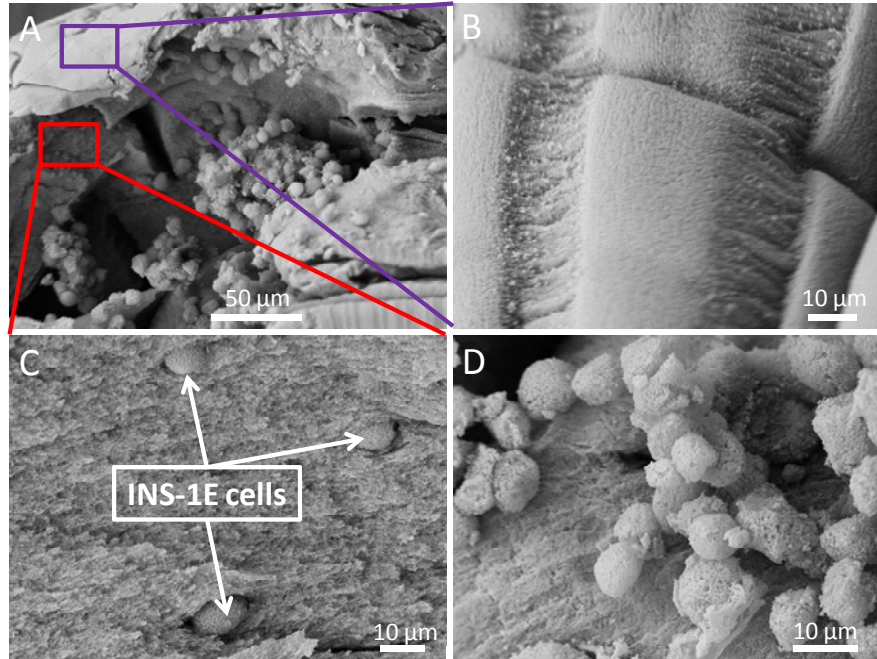


Figure 2. SEM images of a cross section of alginate@TiO₂ mineralized microcapsules highlighting encapsulated INS-1E cells (A), of the external porous TiO₂ crust (B), of the alginate core coating cells (C) and of enclosed INS-1E cells clusters (D).

The material was kept 40 days in culture medium and was supercritically dried with CO₂ prior analyses.

EDX analyses were also performed on alginate@TiO₂ microcapsules in order to compare the chemical composition of the inner and the outer parts of the material. Figure 3 presents EDX spectrum and morphology of the inner core (A) and the external titanium dioxide crust (B) of the hybrid microcapsule. The presence of the CK α , OK α and CaK α peaks for the two parts of the shell was noticed, indicating that it is well a calcium alginate-based material. The presence of titanium in a much larger proportion at the surface of the capsule was also observed, indicating that the formation of titanium dioxide occurred well around the capsule to form a hybrid Ca-alginate/TiO₂ layer reinforcing the material and allowing the enclosed cells to live in an aqueous media without mechanical constraints.

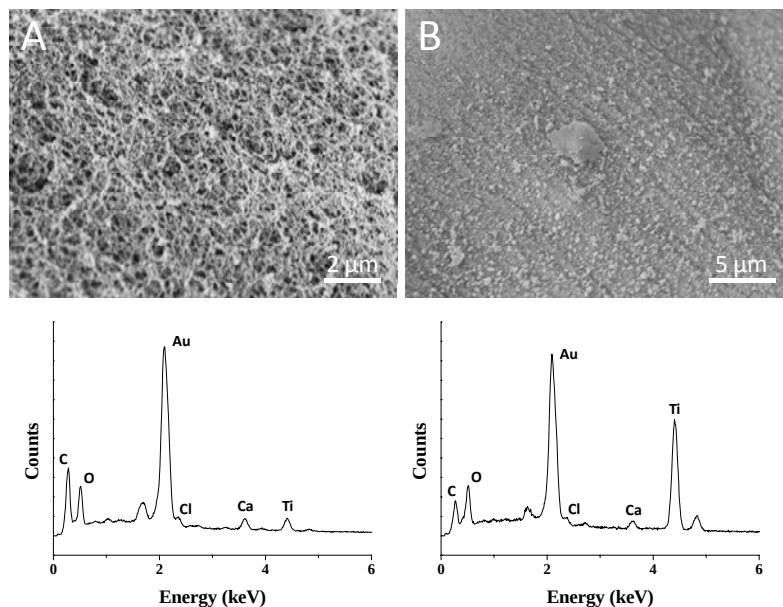


Figure 3. SEM images and EDX spectrum of the core (A) and external surface (B) of an alginate@TiO₂ microcapsule.

The capsules were supercritically dried with CO₂ immediately after synthesis for analyses.

2.2. Cell viability

The viability of INS-1E cells encapsulated within microcapsules was monitored over time.

2.2.1. Oxygen consumption measurements

The oxygen consumption by enclosed cells was measured using a Clark's cell device. This parameter is directly proportional to the number of living cells. Figure 4 presents the relative respiration over time with 100 % corresponding to the oxygen consumption of INS-1E cells entrapped within one capsule just after encapsulation. As previously reported with HepG2 cells, the viability of INS-1E cells was maintained for more than 40 days as the relative respiration slightly increased over the whole period. It has to be noted that the respiration activity of cells increased up to ~250 % when encapsulated in alginate@TiO₂ microcapsules while it remained around 100 % in the case of simple purified alginate capsules. Cell proliferation may explain the rapid increase in respiration activity of INS-1E cells. One possible explanation why no

increase in relative respiration is observed for alginate capsules is that there was a leakage of the cells outside of the material during the 42 days. Indeed, large cracks were observed at the surface of these capsules (Figure 1B).

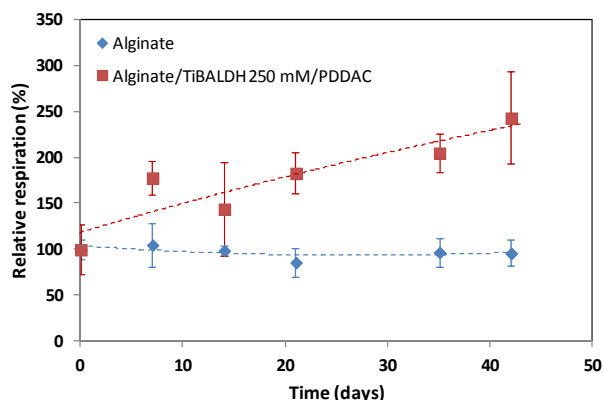


Figure 4. Study of oxygen consumption by INS-1E cells encapsulated within pure alginate capsules and alginate@TiO₂ microcapsules.

100 % corresponds to the oxygen consumption of cells entrapped within one capsule ($1.3 \cdot 10^2 \mu\text{mol of O}_2 \text{ hour}^{-1} \text{ capsule}^{-1}$). Results are presented as means $\pm$ 1 S.D. (n = 3).

2.2.2. Fluorescence measurements

The survival of entrapped cells was confirmed by using fluorescein diacetate (FDA), a vital fluorescent dye. Living cells with active intracellular enzymatic activity can release fluorescein from FDA due to esterases. As fluorescein presents a green fluorescence, living cells with intact plasma membrane become fluorescent. Micrographs of INS-1E cells enclosed within alginate@TiO₂ microcapsules are depicted in Figure 5. These pictures were taken in brightfield and in fluorescent mode in order to evaluate the proportion of surviving cells. The capsules were cut into thin slices prior incubation and observation. We observed that cells were homogeneously dispersed 1 hour post-encapsulation and that more than 90 % of them were alive. 35 and 42 days later, most of cells still exhibited green fluorescence but they were present locally as clusters, as already observed by SEM (Figure 2A and 2D) and in culture

flasks, indicating division of the cells. These results are in a good agreement with the results obtained by the oxygen consumption measurements (Figure 4).

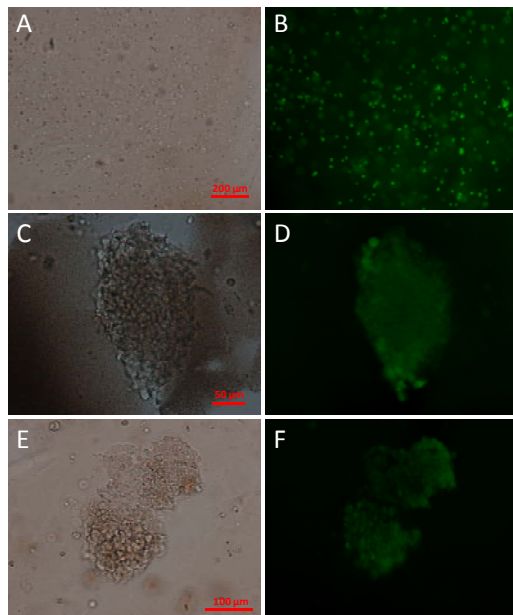


Figure 5. Microscopy images highlighting the survival of cells.

Brightfield (A, C, E) and fluorescent microscopy images (B, D, F) of INS-1E cells three-dimensionally entrapped within alginate@TiO₂ microcapsules and labeled with fluorescein diacetate (viability probe). The micrographs were taken 1 hour (A, B), 35 days (C, D) and 42 days (E, F) post-encapsulation.

2.3. Glucose-stimulated insulin secretion

The secretion of insulin by entrapped INS-1E cells stimulated by glucose and the diffusion of insulin outside of the porous capsules were studied by the measurement of insulin concentration in the supernatant of the secretagogue media. We evaluated the response to glucose of enclosed cells at 2 and 6 weeks post-encapsulation. The results were expressed as stimulation index defined by the difference of insulin concentration secreted under stimulation of 15 mM glucose or 15 mM glucose + 1 μ M forskolin minus the basal secretion level when cells were exposed to 3 mM glucose. Forskolin is an activator of adenylate cyclase that stimulates the release of insulin. Response to glucose results are presented in Figure 6. There was a significant difference ($p < 0.05$)

in insulin secreted levels by cells stimulated with glucose + forskolin compared to basal levels. It was not the case when cells were stimulated with 15 mM glucose only except for cells entrapped in pure alginate for 47 days. It can be concluded that entrapped INS-1E cells still significantly respond to stimulation and maintained their metabolic activity. Furthermore, for each condition of stimulation, a significant difference ($p < 0.05$) was observed between secreted insulin levels measured at 2 and 6 weeks post-encapsulation in simple alginate spheres or alginate@TiO₂ microcapsules. This increase in insulin secretion over time supports the results presented in Figures 4 and 5 that suggest cell proliferation. These results also show that two materials displayed porosity well adapted to the entry of nutrients while allowing the diffusion of insulin outside of the capsules.

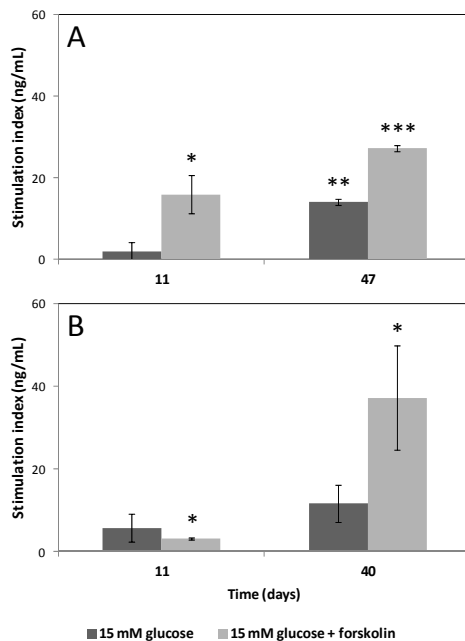


Figure 6. Insulin secretion by enclosed INS-1E cells in the supernatant of the alginate (A) and alginate@TiO₂ (B) capsules under stimulation with 15 mM glucose or 15 mM glucose supplemented with 1 μM forskolin.

Stimulation index is defined by the increase in insulin secretion (ng mL⁻¹) when stimulated by glucose (or glucose/forskolin) minus the basal secretion (3 mM). Values are means ± 1 S.D. (n = 3). * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$ compared to the basal insulin secretion.

3. CONCLUSIONS

The present work evaluated the potential of hybrid alginate@TiO₂ microcapsules as a device for medical applications such as cell therapy and more particularly as an implant for the treatment of type 1 diabetes mellitus. The presence of a layer of TiO₂ around calcium alginate spheres was highlighted by scanning electron microscopy and the morphological properties of the hybrid microcapsules have been compared with those of simple purified alginate capsules, showing the improved mechanical strength, MWCO and thus encapsulated cell immune-isolation of the alginate@TiO₂ material.

The encapsulation of rat insulinoma-derived INS-1E cells inside microcapsules exhibits an enhanced survival rate in capsules composed of alginate/titania composite in comparison to alginate alone. The entrapped cells maintained their property to respond to glucose concentrations 6 weeks post-encapsulation and the insulin released is able to diffuse out of the capsules. Alginate@TiO₂ hybrid shell could be thus an ideal alternative to previously described materials for organ transplantation for the treatment of the increasingly widespread type 1 diabetes mellitus.

4. MATERIALS AND METHODS

4.1. Chemical materials

Titanium(IV) bis(ammonium lactato)dihydroxide solution (TiBALDH, 50 wt. % in H₂O), poly(diallyldimethylammonium) chloride solution (PDDAC, average Mw 100,000-200,000, 20 wt. % in H₂O), alginic acid sodium salt, from brown algae (for immobilization of microorganisms), calcium chloride (dihydrate, 99 %), ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA, tetrasodium salt, 97 %), hydrochloric acid (Molecular Biology Grade, 36.5-38.0 %), sodium hydroxide (reagent grade, 98 %, anhydrous), chloroform (anhydrous, 99 %), glutaraldehyde (50 wt. % in H₂O), fluorescein diacetate (FDA, used as cell viability stain), glucose solution (BioUltra, for molecular biology, ~20 % in H₂O), sodium chloride (ACS reagent, 99,0 %), potassium chloride (for molecular biology, 99.0 %), potassium phosphate monobasic (plant cell culture tested, 99 %), magnesium sulfate heptahydrate (Plant Cell Culture Tested), sodium bicarbonate (Plant Cell Culture Tested), albumin, from bovine serum (BSA, 98 % (agarose gel electrophoresis, lyophilized powder, essentially fatty acid free, essentially globulin free)) and dimethyl sulfoxide (BioReagent, for molecular biology, suitable for plant cell culture, 99.9 %) were provided by Sigma-Aldrich; ethanol (absolute) by Fisher; PBS (Phosphate Buffered Saline, 0.0067 M (PO₄), For Cell Culture) by Lonza; and forskolin (*Coleus forskohlii* in DMSO) by Merck Millipore. Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI, 1640), foetal bovine serum, HEPES buffer solution (1 M), sodium pyruvate (100 mM, 100X), L-Glutamine (200 mM, 100X) and 2-mercaptoethanol (50 mM) were purchased from Invitrogen (Casbald, USA). Sodium alginate powder was purified according to the method described by de Vos *et al.* [15] where the commercial powder is dissolved in an aqueous solution of EGTA 1 mM to remove Mg⁺² and Ca⁺² cations before being

filtered and successively washed by HCl, chloroform and butanol in order to eliminate remaining ions and proteins. Purified product is finally obtained by adjusting pH at 7.0 and by adding absolute ethanol to the solution in order to precipitate it. The compound is dried using vane pump.

4.2. Biological materials

Rat insulin-secreting cell line INS-1E sensitive to glucose stimulation was provided from Prof. Pierre Maechler (University of Geneva, Department of Cell Physiology and Metabolism) and Prof. Patrick Gilon (UCL, EDIN, Endocrinology, Diabetes and Nutrition division). The Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI, 1640) used for cultivation of INS-1E cells was supplemented with HEPES (10 mM), sodium pyruvate (1 mM), glutamine (2 mM), 2-mercaptoethanol (0.05 mM) and 10 % of foetal bovine serum. Cells were incubated in 75-cm² flasks (Costar, Lowell, USA), at 37°C in a humid atmosphere of 5 % CO₂, and the medium was replaced by fresh one every 2 days. Once the cells were 100 % confluent (4 or 5 days), they were washed with PBS (Phosphate Buffer Saline) before to be treated with a trypsin/EDTA mixture. Trypsinised cells were suspended in fresh medium for encapsulation. For further cultivation, cells were diluted in 11 mL of medium and 3 mL of this suspension were finally put in new 75-cm² flasks containing 15 mL of fresh culture medium with serum.

4.3. Encapsulation of INS-1E cells in hybrid microcapsules

The different solutions used in the preparation of hybrid microcapsules were previously adjusted at pH 7.4.

First route. INS-1E cells in suspension in their culture medium were mixed with 3 % wt. sodium alginate to obtain a final density of $1.7 \cdot 10^6$ cells mL⁻¹. This

mixture was dropped on a CaCl_2 solution (100 mM) using sterile 3.0 mL plastic Pasteur pipettes (VWR) and the droplets were let incubated for 5 minutes in order to allow the cross-linking reaction and to obtain capsules formed of a solid Ca-alginate external crust and of a liquid Na-alginate core containing cells. The microcapsules were finally recovered and put in test tubes filled with fresh culture medium with serum and maintained at 37°C (95% air/5 % CO_2).

Second route. Alginate@ TiO_2 microcapsules were obtained as described previously [37].

A INS-1E cell suspension containing 3.0 % wt. of purified Na-alginate (1:1 vol.) was mixed with the titanium precursor solution (TiBALDH, 250 mM), diluted in culture medium without serum and additives to obtain a final cell density of $1.1 \cdot 10^6$ cells mL^{-1} . Then, this suspension was extruded into a buffered aqueous solution containing calcium chloride and PDDAC (100 mM either) and the droplets were left for incubation until the apparition of a solid white crust of titanium dioxide (5 minutes). The mineralized microcapsules were then recovered and were put in test tubes (3/tube) filled with 5.0 mL of fresh culture medium with serum.

4.4. Characterization techniques

4.4.1. Material properties

Microcapsules were dried through a process of critical point drying with liquid carbon dioxide, after being incubated in 3 % glutaraldehyde and dehydrated with ethanol, to obtain aerogels. Morphological properties were analyzed by field emission scanning electron microscopy (FE-SEM) on a JEOL JSM-7500F electron microscope, after being sputter-coated with gold. The chemical composition of the internal core and external layer of alginate@ TiO_2 capsules was determined using an energy-dispersive

X-rays analysis system (EDX) with an acceleration voltage of 15.00 kV and a working distance of 8 mm.

4.4.2. Cell viability

The viability of enclosed INS-1E cells was monitored by the measurement of their consumption of oxygen using a Clark's cell vessel provided by HansaTech Instruments. Briefly, 3 capsules were put in the device, containing 1.0 mL of fresh culture medium. The relative respiration of INS-1E cells was determined taking the measurement of oxygen consumption just after the encapsulation as the reference value (100 %).

Cells survival was confirmed thanks to fluorescein diacetate (FDA), a vital dye stain. INS-1E cells were incubated within FDA diluted in culture medium (5 μ M) for 5 minutes at room temperature. Pictures were then taken either in brightfield mode or in fluorescent mode at 536/40 nm with a colour camera (DSRi1, Nikon) by illuminating the samples with a 482/35 nm excitation light; using a fluorescence microscope (Multizoom AZ100, Nikon).

4.4.3. Glucose –stimulated insulin secretion

An evaluation of insulin secretion outside of the capsules by entrapped INS-1E cells was performed at different periods of time. Briefly, culture medium was removed from test tubes containing hybrid materials. Cells were washed twice with Hank's balanced sodium salt solution (HBSS) (114 mmol/L NaCl, 4.7 mmol/L KCl, 1.2 mmol/L KH_2PO_4 , 1.16 mmol/L MgSO_4 , 20 mmol/L HEPES, 2.5 mmol/L CaCl_2 , 25.5 mmol/L NaHCO_3 and 0.2 % BSA, pH 7.2). The first wash was just a quick rinse while for the second wash; the cells were incubated in HBSS for 2 hours, at 37°C (5% CO_2).

Then, the secretagogues diluted in HBSS were added a further period of 2 hours. 3 mM glucose was used for the determination of basal insulin secretion level while 15 mM glucose and 15 mM glucose supplemented with 1 μ M forskolin were used for stimulated secretion, using independent samples for each assay. The supernatants were finally recovered in order to measure insulin concentration using a Rat/Mouse Insulin ELISA Kit provided by Merck Millipore.

4.4.4. Statistical analysis

The concentration of insulin secreted by encapsulated INS-1E cells in the supernatant when stimulated by 15 mM glucose (or 15 mM glucose + 1 μ M forskolin) was compared to basal secretion (stimulation by 3 mM glucose). Results were analyzed by unpaired Student's *t*-test, using XLSTAT 2013 software (Addinsoft) and with $p < 0.05$ being considered as significant.

ACKNOWLEDGMENTS

Grégory Leroux thanks the University of Namur for his research grant. The authors are also grateful to Prof. Pierre Maechler of the University of Geneva and to Prof. Patrick Gilon of the Catholic University of Leuven (UCL) for kindly giving them the rat insulin-secreting cell line INS-1E.

REFERENCES

- [1] A.M.J. Shapiro, J.R.T. Lakey, E.A. Ryan, G.S. Korbitt, E. Toth, G.L. Warnock, N.M. Kneteman and R.V. Rajotte, *N. Engl. J. Med.*, 2000, **343**, 230-238.
- [2] A.M.J. Shapiro, C. Ricordi, B.J. Hering, H. Auchincloss, R. Lindblad, R.P. Robertson, A. Secchi, M.D. Brendel, T. Berney, D.C. Brennan, E. Cagliero, R. Alejandro, E.A. Ryan, B. DiMercurio, P. Morel, K.S. Polonsky, J.-A. Reems, R.G. Bretzel, F. Bertuzzi, T. Froud, R. Kandaswamy, D.E.R. Sutherland, G. Eisenbarth, M. Segal, J. Preiksaitis, G.S. Korbitt, F.B. Barton, L. Viviano, V.

- Seyfert-Margolis, J. Bluestone and J.R.T. Lakey, *N. Engl. J. Med.*, 2006, **355**, 1318-1330.
- [3] E.A. Ryan, B.W. Paty, P.A. Senior, D. Bigam, E. Alfadhli, N.M. Kneteman, J.R.T. Lakey and A.M.J. Shapiro, *Diabetes*, 2005, **54**, 2060-2069.
- [4] B. Ludwig, A. Rotem, J. Schmid, G.C. Weir, C.K. Colton, M.D. Brendel, T. Neufeld, N.L. Block, K. Yavriyants, A. Steffen, S. Ludwig, T. Chavakis, A. Reichel, D. Azarov, B. Zimermann, S. Maimon, M. Balyura, T. Rozenshtein, N. Shabtay, P. Vardi, K. Bloch, P. de Vos, A.V. Schally, S.R. Bornstein and U. Barkai, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012, **109**, 5022-5027.
- [5] A. Hyder, C. Laue and J. Schrezenmeir, *Toxicol. In Vitro*, 2005, **19**, 541-546.
- [6] E.A. Ryan, J.R.T. Lakey, R.V. Rajotte, G.S. Korbitt, T. Kin, S. Imes, A. Rabinovitch, J.F. Elliott, D. Bigam, N.M. Kneteman, G.L. Warnock, I. Larsen and A.M.J. Shapiro, *Diabetes*, 2001, **50**, 710-719.
- [7] G. Orive, A. R. Gascón, R. M. Hernández, M. Igartua and J. L. Pedraz, *Trends Pharmacol. Sci.*, 2003, **24**, 207-210.
- [8] C.F. Meunier, P. Dandoy and B.-L. Su, *J. Colloid Interface Sci.*, 2010, **342**, 211-224.
- [9] A. Léonard, P. Dandoy, E. Danloy, G. Leroux, C.F. Meunier, J.C. Rooke and B.-L. Su, *Chem. Soc. Rev.*, 2011, **40**, 860-885.
- [10] M. Ming, X. Li, X. Fan, D. Yang, L. Li, S. Chen, Q. Gu and W. Le, *J. Transl. Med.*, 2009, **7**, 53.
- [11] C. Rinsch, P. Dupraz, B.L. Schneider, N. Déglon, P.H. Maxwell, P.J. Ratcliffe and P. Aebischer, *Kidney Int.*, 2002, **62**, 1395-1401.
- [12] P.L. Chang, J.M. Van Raamsdonk, G. Hortelano, S.C. Barsoum, N.C. MacDonald and T.L. Stockley, *Trends Biotechnol.*, 1999, **17**, 78-83.
- [13] V. Bisceglie, *Ztschr. Krebsforsch.*, 1933, **40**, 122-140.
- [14] G. Orive, R.-M. Hernández, A.R. Gascón, R. Calafiore, T.M.S. Chang, P. de Vos, G. Hortelano, D. Hunkeler, I. Lacík and J.L. Pedraz, *Trends Biotechnol.*, 2004, **22**, 87-92.
- [15] P. de Vos, M. Spasojevic, B.J. de Haan, M.M. Faas, *Biomaterials*, 2012, **33**, 5552-5559.
- [16] A.C. Jen, M. Conley Wake and A.G. Mikos, *Biotechnol. Bioeng.*, 1996, **50**, 357-354.
- [17] P. de Vos, A.F. Hamel and K. Tatarkiewicz, *Diabetologia*, 2002, **45**, 159-173.
- [18] E.S. O'Sullivan, A. Vegas, D.G. Anderson and G.C. Weir, *Endocr. Rev.*, 2011, **32**, 827-844.
- [19] R.M. Hernandez, G. Orive, A. Murua and J.L. Pedraz, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2010, DOI: 10.1016/j.addr.2010.02.004.
- [20] C.G. Thanos, B.E. Bintz, W.J. Bell, H. Qian, P.A. Schneider, D.H. MacArthur and D.F. Emerich, *Biomaterials*, 2006, **27**, 3570-2579.
- [21] S. Ponce, G. Orive, R. Hernández, A. R. Gascón, J.L. Pedraz, B.J. de Haan, M.M. Faas, H.J. Mathieu and P. de Vos, *Biomaterials*, 2006, **27**, 4831-4839.

- [22] P. Dandoy, C.F. Meunier, C. Michiels and B.-L. Su, *PLoS One*, 2011, **6(6)**, e20983, DOI: 10.1371/journal.pone.0020983.
- [23] P. Dandoy, C.F. Meunier, G. Leroux, V. Voisin, L. Giordano, N. Caron, C. Michiels and B.-L. Su, *PLoS One*, 2013, **8(1)**, e54683, DOI : 10.1371/journal.pone.0054683.
- [24] H. Uludag, P. de Vos and P.A. Tresco, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2000, **42**, 29-64.
- [25] A. Nieto, S. Areva, T. Wilson, R. Viitala, M. Vallet-Regi, *Acta Biomater.*, 2009, **5**, 3478-3487.
- [26] M.F. Desimone, G.S. Alvarez, M.L. Foglia and L.E. Diaz, *Recent Pat. Biotechnol.*, 2009, **3**, 55-60.
- [27] T. Coradin, N. Nassif and J. Livage, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2003, **61**, 429-434.
- [28] T. López, E. Ortiz, P. Quintana and R.D. González, *Colloids Surf., A*, 2007, **300**, 3-10.
- [29] Y. Chen, Y. Yi, J.D. Brennan and M.A. Brook, *Chem. Mater.*, 2006, **18**, 5326-5335.
- [30] S.H. Yang, E.H. Ko and I.S. Choi, *Langmuir*, 2012, **28**, 2151-2155.
- [31] Y. Yan, B. Hao, X. Wang and G. Chen, *Dalton Trans.*, 2013, **42**, 12179-12184.
- [32] S.L. Sewell and D.W. Wright, *Chem. Mater.*, 2006, **18**, 3108-3113.
- [33] Y. Jiang, D. Yang, L. Zhang, Q. Sun, X. Sun, J. Li and Z. Jiang, *Adv. Funct. Mater.*, 2009, **19**, 150-156.
- [34] M.B. Dickerson, K.H. Sandhage and R.R. Naik, *Chem. Rev.*, 2008, **108**, 4935-4978.
- [35] N. Kröger and K.H. Sandhage, *MRS Bull.*, 2010, **35**, 122-126.
- [36] D. Fischer, Y. Li, B. Ahlemeyer, J. Krieglstein and T. Kissel, *Biomaterials*, 2003, **24**, 1121-1131.
- [37] G. Leroux, C.F. Meunier, C. Michiels and B.-L. Su, *Article 1 de cette thèse, soumis (J. Mat. Chem. B)*.
- [38] G. Leroux, C.F. Meunier, V. Voisin, I. Habsch, N. Caron, C. Michiels and B.-L. Su, *Article 2 de cette thèse, en voie de soumission*.
- [39] A. Merglen, S. Theander, B. Rubi, G. Chaffard, C.B. Wollheim and P. Maechler, *Endocrinology*, 2004, **145(2)**, 667-678.
- [40] H.E. Hohmeier, H. Mulder, G. Chen, R. Henkel-Rieger, M. Prentki and C.B. Newgard, *Diabetes*, 2000, **49**, 424-430.
- [41] M. Orecná, R. Hafko, Z. Bacová, J. Podskocová, D. Chorvát Jr. and V. Strbák, *Physiol. Res.*, 2008, **57**, 935-945.
- [42] J.A. Nagy, K.T. Herzberg, E.M. Masse, G.P. Zientara and H.F. Dvorak, *Cancer Res.*, 1989, **49**, 5448-5458.
- [43] P.J. Morris, *Trends Biotechnol.*, 1996, **14**, 163-167.
- [44] S.R. King, R. Dorian and R.W. Storrs, *Graft*, 2001, **4**, 491-499.
- [45] T.A. Desai, D. Hansford and M. Ferrari, *J. Membr. Sci.*, 1999, **159**, 221-231.

Chapitre 7.

Conclusions générales et perspectives

Conclusions générales

L'objet de cette thèse de doctorat portait sur la conception d'un matériau inorganique adapté à l'encapsulation de cellules animales en vue de développer un organe artificiel pour le traitement de maladies provoquées par un dysfonctionnement cellulaire. Nos travaux se sont portés plus spécifiquement sur la conception d'un pancréas artificiel pour le traitement du diabète de type 1. Le matériau encapsulant les cellules à implanter se doit de répondre à une série de critères pour pouvoir prétendre jouer le rôle qui lui est destiné :

- Une **porosité** permettant l'entrée des nutriments essentiels et la diffusion de l'insuline dans le corps tout en empêchant l'entrée des anticorps et des cellules inflammatoires pouvant provoquer une réaction de rejet ;
- Une **biocompatibilité** vis-à-vis des cellules encapsulées et de l'organisme implanté grâce à l'utilisation de réactifs non-toxiques, dans des conditions de synthèse douces, permettant de préparer un matériau de forme atraumatique dont les propriétés ne varient pas au cours du temps ;
- Une **résistance mécanique** permettant à l'implant de protéger les cellules encapsulées de tout stress mécanique *in vivo* et de remplir son rôle pendant plusieurs dizaines d'années.

L'encapsulation *in situ* dans un matériau inorganique poreux et biocompatible tel le dioxyde de titane s'est rapidement imposée. Le procédé sol-gel mettant en jeu des précurseurs alkoxydiques a toutefois rapidement montré plusieurs limites. En effet, un test de cytotoxicité a démontré le caractère nocif de certains additifs indispensables à la préparation des matériaux et des sous-produits de réaction gorgant leurs pores. De plus, le phénomène de contraction matricielle apparaissant au cours du temps provoque un stress mécanique au niveau des cellules.

Pour résoudre ces problèmes, nous avons eu l'idée de réaliser une pré-encapsulation dans des capsules d'alginate, un biopolymère ayant déjà fait ses preuves dans le domaine de l'encapsulation cellulaire d'un point de vue biocompatibilité mais souffrant d'une faible résistance mécanique. Nous avons entrepris de combiner la biocompatibilité de l'alginate à la robustesse du dioxyde de titane. Les cellules ont donc tout d'abord été encapsulées dans des capsules d'alginate avant que ces dernières

ne soient renforcées en étant elles-mêmes placées dans un gel de TiO_2 pour obtenir une matrice de type *core/shell*. Cette méthode s'est également avérée inadaptée, les cellules encapsulées n'ayant pas survécu plus d'un jour, probablement à cause des sous-produits de réaction du procédé sol-gel diffusant dans les microcapsules.

Un matériau original *core/shell* alginate/ TiO_2 fut alors développé en utilisant un précurseur stabilisé en solution aqueuse, le TiBALDH, pouvant être polymérisé sous l'action de polyamines possédant des charges positives comme le polycation PDDAC. Un procédé en une étape fut mis au point permettant de former des microcapsules hybrides alginate@ TiO_2 où l'alginate est renforcé par une fine couche de TiO_2 à sa surface, sans sous-produits toxiques.

Le modèle de microcapsules hybride alginate-titane fut proposé après des études réalisées par microscopie optique, microscopie électronique à balayage et EDX. Nous avons démontré que ce matériau présentait une résistance mécanique améliorée par rapport à de simples capsules d'alginate et à des hybrides alginate-silice. Bien que globalement macroporeuses, les microcapsules alginate@ TiO_2 présentent un MWCO adapté à l'immuno-isolation, probablement grâce à la couche de TiO_2 en surface. Ensuite, l'encapsulation de cellules modèles HepG2 a permis de prolonger leur viabilité et leur activité pendant plus de 6 semaines. L'albumine sécrétée par ces cellules diffusait également parfaitement au travers des microcapsules, vers le milieu dans lequel étaient conservés les matériaux.

Des études *in vivo* conduites chez des animaux de laboratoire ont permis d'évaluer la biocompatibilité des microcapsules hybrides et l'immuno-isolation des cellules encapsulées. Ces paramètres ont été comparés à ceux exhibés par des billes minéralisées alginate-silice/alginate (ASA). Ces deux types d'implants n'ont pas provoqué de réactions inflammatoires chez les animaux implantés mais l'immuno-isolation des cellules fut plus efficace chez l'hybride alginate-titane.

Face à ces résultats très encourageants, nous avons débuté des études sur des cellules β , plus spécifiquement des cellules d'un insulinome de rat obtenu par irradiation aux rayons X, les cellules INS-1E. Dans un premier temps, il fallait s'assurer que ces cellules, répondant à une stimulation par du glucose en culture, continuaient à le faire une fois encapsulées. Nos expériences réalisées *in vitro* ont révélé le maintien de l'activité de ces cellules pendant plus de 40 jours et ont confirmé que l'insuline pouvait bien diffuser hors de l'hybride alginate@ TiO_2 .

Ce matériau original semble donc tout à fait adapté à une utilisation en tant que pancréas artificiel, répondant idéalement aux paramètres prédéfinis de porosité et biocompatibilité, et présentant une résistance mécanique intéressante.

Perspectives

Le premier point sur lequel s'attarder serait l'évaluation de l'efficacité des implants *in vivo* en vérifiant qu'ils permettent bien de réguler la glycémie d'un organisme diabétique. Pour ce faire, des animaux de laboratoire sains seraient rendus diabétiques par administration de streptozotocine, une molécule toxique pour les cellules β et régulièrement utilisée en recherche fondamentale pour la production d'animaux modèles pour le traitement du diabète^{1,2}. Une fois que les animaux présenteraient une hyperglycémie stable pendant plusieurs jours, les billes seraient implantées de la même façon que lors des expériences réalisées au cours de cette thèse et une prise de sang quotidienne permettrait de réaliser un dosage ELISA, toujours de la même manière que lors de cette thèse, de l'insuline dans le sérum sanguin (*figure 7.1*). Il serait également intéressant d'étudier d'autres sites d'implantation, telle que la cavité péritonéale où il devrait être observé une diffusion plus efficace de l'insuline sécrétée vers la veine porte et où des implantations d'îlots de Langerhans encapsulés ont déjà donné de bons résultats³.

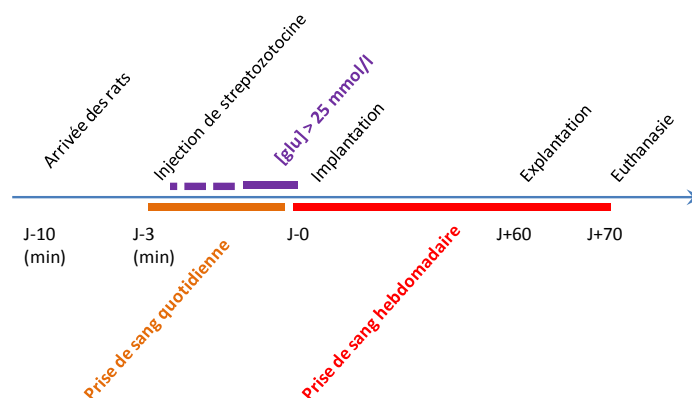


Figure 7.1 : Schéma expérimental chronologique d'un projet visant à vérifier la régulation de la glycémie d'un organisme vivant rendu diabétique, par les implants développés au cours de cette thèse.

¹ A.A. Rossini, A.A. Like, W.L. Chick, M.C. Appel, G.F. Cahill Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1977, **74**(6), 2485-2489.

² M.J. Reed, K. Meszaros, L.J. Entes, M.D. Claypool, J.G. Pinkett, T.M. Gadbois, G.M. Reaven, *Metabolism*, 2000, **49**(11), 1390-1394.

³ A.I. Silva, A.N. de Matos, I.G. Brons, M Mateus, *Med. Res. Rev.*, 2006, **26**(2), 181-222.

En parallèle, il serait opportun d'étudier la nature des cellules recouvrant la surface des capsules, que nous avons pu observer lors des expériences *in vivo* réalisées au cours de cette thèse. Il conviendrait en effet de s'assurer que ce recrutement cellulaire n'évolue pas en une coque fibreuse autour des implants, ce qui pourrait avoir pour effet de limiter l'indispensable diffusion des nutriments vers les cellules et des substances sécrétées par les cellules encapsulées ou tout simplement de provoquer le rejet des organes artificiels. Cette étude peut être réalisée par un marquage immunohistochimique des fibroblastes et des autres cellules fibrogéniques (lymphocytes, macrophages, ...)⁴. Si une telle fibrose était constatée, il conviendrait dès lors d'étudier la manière de moduler la surface et/ou composition des capsules afin de limiter cette colonisation cellulaire. Par exemple, de Vos *et al*⁵ ont démontré que la colonisation de la surface de capsules d'alginate/poly-L-lysine (PLL) par des cellules fibrogéniques était plus importante lorsque le ratio unités G/unités M de l'alginate augmentait alors que rien de tel n'était observé lorsque le polycation PLL était absent. Cette observation suggérerait que la réponse immunitaire n'était pas dirigée contre l'alginate mais contre le polycation insuffisamment lié aux unités G de l'alginate.

De ce point de vue, il serait également intéressant, au niveau fondamental, d'approfondir les études sur le mécanisme de formation du dioxyde de titane à partir du TiBALDH et de polyamines cationiques. Les propriétés du matériau conçu au cours de cette thèse pourraient également être étudiées en fonction des polyelectrolytes utilisés, la résistance mécanique pouvant peut-être ainsi être encore améliorée. L'étude des interactions cellules-matrices est également une perspective intéressante, dans le sens où, comme mentionné dans l'introduction générale (*point 1.3.1*), la modification de la surface des matériaux par diverses molécules organiques peut permettre d'améliorer les fonctionnalités des cellules encapsulées.

Il conviendrait également de vérifier les caractéristiques de la microcapsule hybride ainsi que la viabilité et l'activité des cellules encapsulées sur un laps de temps plus long, ceci n'ayant malheureusement pu être réalisé dans le temps imparti pour cette thèse. Il est à supposer qu'un matériau idéal, c'est-à-dire totalement biocompatible ; possédant une porosité adaptée et une résistance mécanique supportant les contraintes induites par les tissus de l'organisme hôte ainsi que la pression provoquée par les cellules encapsulées proliférant ; conservant ses propriétés intactes au cours du temps ; et implantés en un endroit permettant un apport suffisant

⁴ P. de Vos, C.G. Hoogmoed, H.J. Busscher, *J. Biomed. Mater. Res.*, 2002, **60(2)**, 252-259.

⁵ P. de Vos, B. de Haan, R. Van Schilfgaarde, *Biomaterials*, 1997, **18(3)**, 273-278

en oxygène aux cellules ; devrait permettre de pouvoir soigner un patient tout au long de sa vie, les cellules encapsulées étant préservées de toute hypoxie ou nécrose. Il faudrait enfin s'intéresser au type de cellules à encapsuler pour réguler la glycémie chez l'homme, les cellules INS-1E utilisées au cours de cette thèse produisant de l'insuline de rat. La voie la plus prometteuse consiste en l'exploitation de cellules souches pluripotentes embryonnaires, la différenciation de cellules souches adultes en cellules sécrétrices d'insuline étant moins évidente⁶. Les succès engendrés par ces études permettraient alors d'enclencher la vitesse supérieure, en passant aux essais cliniques chez l'homme et à terme, nous l'espérons, à la possibilité pour tous les patients souffrant de cette maladie de bénéficier d'une thérapie les libérant enfin de leurs maux.

Ensuite, l'utilisation de ces microcapsules pourrait être étendue à d'autres maladies. En effet, l'encapsulation de cellules exprimant le facteur de croissance des cellules nerveuses (NGF) pourraient peut-être permettre de traiter la maladie d'Alzheimer⁷ alors que l'encapsulation de cellules sécrétant de la dopamine⁸ ou le facteur neurotrophique dérivé des cellules gliales (GDNF)⁹ serait un traitement potentiel de la maladie de Parkinson.

⁶ Y. Dor, J. Brown, O.I. Martinez, D.A. Melton, *Nature*, 2004, **429(6987)**, 41-46.

⁷ L.U. Wahlberg, G. Lind, P.M. Almqvist, P. Kusk, J. Tornøe, B. Juliusson, M. Söderman, E. Selldén, Å. Seiger, M. Eriksdotter-Jönnhagen, B. Linderöth, *J. Neurosurg.*, 2012, **117**, 340-347.

⁸ I. Date, T. Shingo, H. Yoshida, K. Fujiwara, K. Kobayashi, T. Ohmoto, *Cell Transplant.*, 2000, **9(5)**, 705-709.

⁹ H. Kishima, T. Poyot, J. Bloch, J. Dauguet, F. Condé, F. Dollé, F. Hinnen, W. Pralong, S. Palfi, N. Déglon, P. Aebischer, P. Hantraye, *Neurobiol. Dis.*, 2004, **16**, 428-439.

Bibliographie

Liste des références bibliographiques

Chapitre 1 - Introduction

- [1] Organisation Mondiale de la Santé (OMS), <http://www.who.int>, consulté le 21 août 2013.
- [2] G. Danaei, M.M. Finucane, Y. Lu, G.M. Singh, M.J. Cowan, C.J. Paciorek, J.K. Lin, F. Farzadfar, Y.-H. Khang, G.A. Stevens, M. Rao, M.K. Ali, L.M. Riley, C.A. Robinson, M. Ezzati, *Lancet*, 2011, **378**, 31-40.
- [3] L.C. Silbert, *Neurology*, 2007, **69**, E8-E11 (figure modifiée à partir d'une image originale).
- [4] A. Léonard, P. Dandoy, E. Danloy, G. Leroux, C.F. Meunier, J.C. Rooke, B.-L. Su, *Chem. Soc. Rev.*, 2011, **40**, 860-885.
- [5] G. Carturan, R. Dal Monte, G. Pressi, S. Secondin, P. Verza, *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 1998, **13**, 273-276.
- [6] H. Dörnenburg, *Process Biochem.*, 2004, **39**, 1369-1375.
- [7] J.-S. Cheng, Y.-J. Yuan, *Proteomics*, 2006, **6**, 2199-2207.
- [8] Le Papyrus d'Ebers (1600 ACN).
- [9] J.-J. Peumery, « Histoire illustrée du diabète de l'antiquité à nos jours », 1987, Ed. Dacosta, Paris.
- [10] J. Zajac, A. Shrestha, P. Patel, L. Poretsky, « Principle of Diabetes Mellitus », 2010, Ed. Leonid Poretsky, 3-16.
- [11] G. Eknayan, J. Nagy, *Adv. Chronic Kidney Dis.*, 2005, **12(2)**, 223-229.
- [12] <http://solutionsgreffe.wifeo.com/iv-a-la-therapie-cellulaire.php>, consulté le 21 août 2013 (figure modifiée à partir d'une image originale).
- [13] <http://www.diabetesdaily.com/wiki/File:Glucose-insulin-release.png>, consulté le 21 août 2013 (figure modifiée à partir d'une image originale).
- [14] <http://www.interactive-biology.com/3730/the-basics-of-protein-structure-and-function/>, consulté le 21 août 2013 (figure modifiée à partir d'une image originale).
- [15] http://bass.bio.uci.edu/~hudel/bs99a/lecture26/lecture7_3.html, consulté le 26 août 2013 (figure modifiée à partir d'une image originale).
- [16] American Diabetes Association, *Diabetes Care*, 2013, **36(1)**, S67-S74.
- [17] International Diabetes Federation, <http://www.idf.org/diabetesatlas/5e/diabetes-in-the-young>, consulté le 26 août 2013.
- [18] D. Mathis, L. Vence, C. Benoist, *Nature*, 2001, **414**, 792-798.
- [19] J.D. Trudeau, J.P. Dutz, E. Arany, D.J. Hill, W.E. Fieldus, D.T. Finegood, *Diabetes*, 2000, **49**, 1-7.
- [20] S. Turley, L. Poirot, M. Hattori, C. Benoist, D. Mathis, *J. Exp. Med.*, 2003, **198(10)**, 1527-1537.
- [21] M. Woo, *Endocrinologie – Conférences scientifiques*, 2004, **4(3)**.

- [22] J.W. Yoon, H.S. Jun, P. Santamaria, *Autoimmunity*, 1998, **27(2)**, 109-122.
- [23] A. Grimaldi, « Traité de diabétologie », 2005, Ed. Flammarion – Médecine-Sciences, 117-118 (figure modifiée à partir d'une image originale).
- [24] J. Fohlman, G. Friman, *Ann. Med.*, 1993, **25(6)**, 569-574.
- [25] M.C. Honeyman, B.S. Coulson, N.L. Stone, S.A. Gellert, P.N. Goldwater, C.E. Steele, J.J. Couper, B.D. Tait, P.G. Colman, L.C. Harrison, *Diabetes*, 2000, **49**, 1319-1324.
- [26] M.C. Honeyman, N.L. Stone, L.C. Harrison, *Mol. Med.*, 1998, **4**, 231-239.
- [27] J.W. Yoon, C.J. Kim, R.G. McArthur, *Clin. Invest. Med.*, 1987, **10(5)**, 457-469
- [28] L.V. Miller, J.D. Stokes, C. Silpipat, *Diabetes Care*, 1978, **1(2)**, 73-76.
- [29] L.M. Maier, L.S. Wicker, *Curr. Opin. Immunol.*, 2005, **17**, 601-608.
- [30] <http://www.kidcyber.com.au/topics/diabetes2.htm>, consulté le 26 août 2013 (figure modifiée à partir d'une image originale).
- [31] S.F. Michaliszyn, G.Q. Shaibi, L. Quinn, C. Fritschi, M.S. Faulkner, *Pediatr. Diabetes*, 2009, **10(6)**, 389-394.
- [32] <http://vulgariz.com/medecine-sante/diabete/un-pancreas-artificiel-pour-diabetiques/>, consulté le 27 août 2013 (figure modifiée à partir d'une image originale).
- [33] A.P. Ryle, F. Sanger, L.F. Smith, R. Kitai, *Biochem J.*, 1955, **60(4)**, 541-556.
- [34] R.S. Yalow, S.A. Berson, *J. Clin. Invest.*, 1960, **39**, 1157-1175.
- [35] P.G. Katsoyannis, A. Tometsko, *Proc. Natl.Acad. Sci. USA.*, 1966, **55(6)**, 1554-1561.
- [36] M. Lepore, S. Pampanelli, C. Fanelli, F. Porcelatti, L. Bartocci, A. Di Vincenzo, C. Cordoni, E. Costa, P. Brunetti, G.B. Bolli, *Diabetes*, 2000, **49**, 2142-2148.
- [37] Plate-forme de formation de la SSPF (Société Scientifique des Pharmaciens Francophones), <http://sspf.claroline.com/index.php>, consulté le 29 août 2013.
- [38] W.D. Kelly, R.C. Lillehei, F.K. Merkel, Y. Idezuki, F.C. Goetz, *Surgery*, 1967, **61(6)**, 827-837.
- [39] A.C. Gruessner, D.E.R. Sutherland, *Clin. Transplant.*, 2005, **19**, 433-455.
- [40] D.M. Nathan, H. Fogel, D. Norman, P.S. Russell, N. Tolkoff-Rubin, F.L. Delmonico, H. Auchincloss Jr., J. Camuso, A.B. Cosimi, *Transplantation*, 1991, **52**, 85-91.
- [41] R.W.G. Gruessner, D.E.R. Sutherland, C. Troppmann, E. Benedetti, N. Hakim, D.L. Dunn, A.C. Gruessner, *J. Am. Coll. Surf.*, 1997, **185**, 128-144.
- [42] 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, *N. Engl. J. Med.*, 2000, **343**, 230-238.
- [43] E.A. Ryan, B.W. Paty, P.A. Senior, D. Bigam, E. Alfadhli, N.M. Kneteman, J.R.T. Lakey, A.M.J. Shapiro, *Diabetes*, 2005, **54**, 2060-2069.
- [44] A.M.J. Shapiro, C. Ricordi, B.J. Hering, H. Auchincloss, R. Lindblad, R.P. Robertson, A. Secchi, M.D. Brendel, T. Berney, D.C. Brennan, E. Cagliero, R. Alejandro, E.A. Ryan, B. DiMercurio, P. Morel, K.S. Polonsky, J.-A. Reems, R.G. Bretzel, F. Bertuzzi, T. Froud, R. Kandaswamy, D.E.R. Sutherland, G. Eisenbarth, M. Segal, J. Preiksaitis, G.S. Korbitt, F.B. Barton, L. Viviano, V. Seyfert-Margolis, J. Bluestone, J.R.T. Lakey, *N. Engl. J. Med.*, 2006, **355**, 1318-1330.
- [45] J. Beck, R. Angus, B. Madsen, D. Britt, B. Vernon, K.T. Nguyen, *Tissue Eng.*, 2007, **13(3)**, 589-599.
- [46] B. Ludwig, A. Rotem, J. Schmid, G.C. Weir, C.K. Colton, M.D. Brendel, T. Neufeld, N.L. Block, K. Yavriyants, A. Steffen, S. Ludwig, T. Chavakis, A. Reichel, D. Azarov, B. Zimmermann, S. Maimon, M. Balyura, T. Rozenshtein, N. Shabtay, P. Vardi, K.

- Bloch, P. de Vos, A.V. Schally, S.R. Bornstein, U. Barkai, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012, **109**, 5022-5027.
- [47] E.A. Ryan, J.R.T. Lakey, R.V. Rajotte, G.S. Korbitt, T. Kin, S. Imes, A. Rabinovitch, J.F. Elliott, D. Bigam, N.M. Kneteman, G.L. Warnock, I. Larsen, A.M.J. Shapiro, *Diabetes*, 2001, **50**, 710-719.
- [48] A. Hyder, C. L. Laue, J. Schrezenmeir, *Toxicol. In Vitro*, 2005, **19**, 541-546.
- [49] S.A. Rogers, F. Chen, M. Talcott, M.R. Hammermann, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2004, **286**, E502-E509.
- [50] D. Tchorsh-Yutis, G. Hechet, A. Aronovich, E. Shezen, Y. Klionsky, C. Rosen, R. Bitcover, S. Eventov-Friedman, H. Katchman, S. Cohen, O. Tal, O. Milstein, H. Yagita, B.R. Blazar, Y. Reisner, *Diabetes*, 2009, **58**, 1585-1594.
- [51] G. Hecht, S. Eventov-Friedman, C. Rosen, E. Shezen, D. Tchorsh, A. Aronovich, E. Freud, H. Golan, R. El-Hasid, H. Katchman, B.J. Hering, A. Zung, Z. Kra-Oz, P. Shaked-Mishan, A. Yusim, A. Shtabsky, P. Idelevitch, A. Tobar, A. Harmelin, E. Bachar-Lustig, Y. Raisner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009, **106**(21), 8659-8664.
- [52] K. Paradis, G. Langford, Z. Long, W. Heneine, P. Sansdtrom, W.M. Switzer, L.E. Chapman, C. Lockety, D. Onions, The XEN 111 Study Group, E. Otto, *Science*, 1999, **285**, 1236-1241.
- [53] C.E.B. Couri, M.C.B. Oliveira, A.B.P.L. Stracieri, D.A. Moraes, F. Pieroni, G.M.N. Barros, M.I.A. Madeira, K.C.R. Malmegrim, M.C. Foss-Freitas, B.P. Simões, E.Z. Martinez, M.C. Foss, R.K. Burt, J.C. Voltarelli, *JAMA*, 2009, **301**(15), 1573-1579.
- [54] T. Kuwabara, M. Asashima, *J. Mol. Cell Biol.*, 2012, **4**(3), 133-139.
- [55] K.A. D'Amour, A.G. Bang, S. Eliazar, O.G. Kelly, A.D. Agulnick, N.G. Smart, M.A. Moorman, E. Kroon, M.K. Carpenter, E.E. Baetge, *Nature Biotechnology*, 2006, **24**, 1392-1401.
- [56] S. Assady, G. Maor, M. Amit, J. Itskovitz-Eldor, K.L. Skorecki, M. Tzukerman, *Diabetes*, 2001, **50**, 1691-1697.
- [57] G. Orive, A.R. Gascón, R.M. Hernández, M. Igartua, J.L. Pedraz, *Trends Pharmacol. Sci.*, 2003, **24**, 207-210.
- [58] V. Bisceglie, *Ztschr. Krebsforsch.*, 1933, **40**, 122-140.
- [59] R.T. Prehn, J.M. Weaver, G.H. Algire, *J. Natl. Cancer Inst.*, 1954, **15**(3), 509-517.
- [60] F. Lim, A.M. Sun, *Science*, 1980, **21**, 908-910.
- [61] P.M. Galletti, P. Aebischer, M.J. Lysaght, *ASAIO Journal*, 1995, **41**, 49-57.
- [62] P. de Vos, A.F. Hamel, K. Tatarkiewicz, *Diabetologia*, 2002, **45**(2), 159-173.
- [63] M. Ming, X. Li, X. Fan, D. Yang, L. Li, S. Chen, Q. Gu, W. Le, *J. Transl. Med.*, 2009, **7**:53, DOI : 10.1186/1479-5876-7-53.
- [64] C. Spuch, D. Antequera, A. Portero, G. Orive, R.M. Hernández, J.A. Molina, F. Bermejo-Pareja, J.L. Pedraz, E. Carro, *Biomaterials*, 2010, **31**, 5608-5618.
- [65] C. Rinsch, P. Dupraz, B.L. Schneider, N. Déglon, P.H. Maxwell, P.J. Ratcliffe, P. Aebischer, *Kidney Int.*, 2002, **62**, 1395-1401.
- [66] P.L. Chang, J.M. Van Raamsdonk, G. Hortelano, S.C. Barsoum, N.C. MacDonald, T.L. Stockley, *Trends Biotechnol.*, 1999, **17**, 78-83.
- [67] M. Gavrilescu, Y. Christi, *Biotechnol. Adv.*, 2005, **23**, 471-499.
- [68] K.E. Apt, P.W. Behrens, *J. Phycol.*, 1999, **35**, 215-226.

- [69] S. Charlet, F. Gillet, M.L. Villareal, J.N. Barbotin, M.A. Fliniaux, J.E. Nava-Saucedo, *Plant. Physiol. Biochem.*, 2000, **38**, 875-880.
- [70] J.C. Rooke, A. Léonard, H. Sarmento, C.F. Meunier, J.-P. Descy, B.-L. Su, *J. Mater. Chem.*, 2011, **21**, 951-959.
- [71] C.F. Meunier, J.C. Rooke, A. Léonard, H. Xie, B.-L. Su, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 3843-3859.
- [72] S. Daunert, G. Barrett, J.S. Feliciano, R.S. Shetty, S. Shrestha, W. Smith-Spencer, *Chem. Rev.*, 2000, **100**, 2705-2738.
- [73] M. Park, S.-L. Tsai, W. Chen, *Sensors*, 2013, **13**, 5777-5795.
- [74] Y. Lei, W. Chen, A. Mulchandani, *Anal. Chim. Acta.*, 2006, **568**, 200-210.
- [75] J.R. Premkumar, O. Lev, R. Rosen, S. Belkin, *Adv. Mater.*, 2001, **13**, 1773-1775.
- [76] M. Campàs, R. Carpentier, R. Rouillon, *Biotechnol. Adv.*, 2008, **26**, 370-378.
- [77] T. Branyik, G. Kuncova, J. Paca, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2000, **54**, 168-172.
- [78] C.J. Cunningham, I.B. Ivshina, V.I. Lozinsky, J.C. Philip, *Int. Biodeter. Biodegr.*, 2004, **54**, 309-332.
- [79] M.E. Stefanova, A.I. Tonkova, E.P. Dobрева, D.I. Spasova, *Folia Microbiol.*, 1998, **43(1)**, 42-46.
- [80] H. Iwata, H. Amemiya, T. Matsuda, H. Takano, R. Hayashi, T. Akutsu, *Diabetes*, 1989, **38**, 224-225.
- [81] S. Lahooti, M.V. Sefton, *Biomaterials*, 2000, **21**, 987-995.
- [82] G. Karoubi, M.L. Ormiston, D.J. Stewart, D.W. Courtman, *Biomaterials*, 2009, **30**, 5445-5455.
- [83] B.A. Zielinski, P. Aebischer, *Biomaterials*, 1994, **15(13)**, 1049-1056.
- [84] A.A. Hardikar, M.V. Risbud, R.R. Bhonde, *J. Biosci.*, 1999, **24(3)**, 371-376.
- [85] K. Aiedeh, M.O. Taha, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2001, **13**, 159-168.
- [86] C.L. Hastrings, H.M. Kelly, M.J. Murphy, F.P. Barry, F.J. O'Brien, G.P. Duffy, *J. Control. Release*, 2012, **161**, 73-80.
- [87] B.P. Chan, T.Y. Hui, C.W. Yeung, J. Li, I. Mo, G.C. Chan, *Biomaterials*, 2007, **28**, 4652-4666.
- [88] J. Liu, H. Zhou, M.D. Weir, H.H. Xu, Q. Chen, C.A. Trotman, *Tissue Eng. A*, 2012, **18**, 2303-2314.
- [89] S. Sakai, T. Ono, H. Ijima, K. Kawakami, *Biomaterials*, 2002, **23**, 4177-4183.
- [90] T. Joki, M. Machluf, A. Atala, J. Zhu, N.T. Seyfried, I.F. Dunn, T. Abe, R.S. Carroll, P. McL. Black, *Nature Biotechnol.*, 2001, **19(1)**, 35-39.
- [91] I. Gill, A. Ballesteros, *Trends Biotechnol.*, 2000, **18**, 282-296.
- [92] S.B. Anderson, C. Lin, D.V. Kuntzler, K.S. Anseth, *Biomaterials*, 2011, **32**, 3564-3574.
- [93] P. de Vos, H.A. Lazarjani, D. Poncelet, M.M. Faas, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2013, **In Press**, DOI: 10.1016/j.addr.2013.11.005.
- [94] E. Santos, J.L. Pedraz, R.M. Hernández, G. Orive, *J. Control. Release*, 2013, **170**, 1-14.
- [95] V. Vaithilingam, B.E. Tuch, *Rev. Diabet. Stud.*, 2011, **8**, 51-67.
- [96] G.C. Weir, *Diabetologia*, 2013, **56**, 1458-1461.
- [97] J.A.M. Steele, J.-P. Hallé, D. Poncelet, R.J. Neufeld, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2013, **In Press**, DOI: 10.1016/j.addr.2013.09.015.
- [98] D. Dufrane, P. Gianello, *World J. Gastroenterol.*, 2012, **18(47)**, 6885-6893.

- [99] D. Dufrane, M. van Steenberghe, R.-M. Goebeels, A. Saliez, Y. Guiot, P. Gianello, *Biomaterials*, 2006, **27**, 3201-3208.
- [100] G. Langlois, J.Dusseault, S. Bilodeau, S.K. Tam, D. Magassouba, J.-P. Hallé, *Acta Biomater.*, 2009, **5**, 3433-3440.
- [101] E. Santos, J. Zarate, G. Orive, R.M. Hernández, J.L. Pedraz, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2010, **670**, 5-21.
- [102] H. Uludag, P. de Vos, P.A. Tresco, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 2000, **42**, 29-64.
- [103] D. Jacobs-Tulleneers-Thevissen, M. Chintinne, Z. Ling, P. Gillard, L. Schoonjans, G. Delvaux, B.-L. Strand, F. Gorus, B.Keymeulen, D. Pipeleers, *Diabetologia*, 2013, **56(7)**, 1605-1614.
- [104] R. Calafiore, G. Basta, G. Luca, A. Lemmi, M.P. Montanucci, G. Calabrese, L. Racanicchi, F. Mancuso, P. Brunetti, *Diabetes Care*, 2006, **29(1)**, 137-138.
- [105] B.E. Tuch, G.W. Keogh, L.J. Williams, W. Wu, J.L. Foster, V. Vaithilingham, R. Philips, *Diabetes Care*, 2009, **32(10)**, 1887-1889.
- [106] R.M. Hernández, G. Orive, A. Murua, J.L. Pedraz, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2010, **62**, 711-730.
- [107] A. King, S. Sandler, A. Andersson, *J. Biomed. Mater. Res.*, 2001, **57(3)**, 374-383.
- [108] Y. Teramura, O.P. Oommen, J. Olerud, J. Hilborn, B. Nilsson, *Biomaterials*, 2013, **34**, 2683-2693.
- [109] P. de Vos, A. Andersson, S.K. Tam, M.M. Faas, J.-P. Hallé, *Immunol. Endocr. Metab. Agents Med. Chem.*, 2006, **6(2)**, 139-153.
- [110] S.A. Safley, H. Cui, S. Cauffiel, C. Tucker-Burden, C.J. Weber, *J. Diabetes Sci. Technol.*, 2008, **2(5)**, 760-767.
- [111] S.K. Tam, S. Bilodeau, J. Dusseault, G. Langlois, J.P. Hallé, L.H. Yahia, *Acta Biomater.*, 2011, **7**, 1683-1692.
- [112] G. Basta, P. Sarchielli, G. Luca, L. Racanicchi, C. Nastruzzi, L. Guido, F. Mancuso, G. Macchiarulo, G. Calabrese, P. Brunetti, R. Calafiore, *Transpl. Immunol.*, 2004, **13**, 289-296.
- [113] M. Sobol, A. Bartkowiak, B. de Haan, P. de Vos, *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2013, **101(7)**, 1907-1914.
- [114] G. Orive, R.M. Hernández, A.R. Gascón, M. Igartua, A. Rojas, J.L. Pedraz, *Biotechnol. Bioeng.*, 2001, **76**, 285-294.
- [115] J.M. Anderson, A. Rodriguez, D.T. Chang, *Semin. Immunol.*, 2008, **20**, 86-100.
- [116] B.L. Strand, L. Ryan, P.I. Veld, B. Kulseng, A.M. Rokstad, G. Skjåk-Braek, T. Espevik, *Cell Transplant.*, 2001, **10**, 263-275.
- [117] R.W. Sands, D.J. Mooney, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2007, **18**, 448-453.
- [118] G. Orive, M. De Castro, H.-J. Kong, R.M. Hernández, S. Ponce, D.J. Mooney, J.L. Pedraz, *J. Control. Release*, 2009, **135**, 203-210.
- [119] C. Wang, R.R. Varshney, D.-A. Wang, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2010, **62**, 699-710.
- [120] K.Y. Lee, H.J. Kong, R.G. Larson, D.J. Mooney, *Adv. Mater.*, 2003, **15**, 1828-1832.
- [121] D.F. Williams, *Biomaterials*, 2011, **32**, 4195-4197.
- [122] C.E. Hamm, R. Merkel, O. Springer, P. Jurkojc, C. Maier, K. Prechtel, V. Smetacek, *Nature*, 2003, **421**, 841-843.
- [123] J. Bradbury, *PLoS Biol.*, 2004, **2(10)**, e306. DOI: 10.1371/journal.pbio.0020306.
- [124] D. Avnir, T. Coradin, O. Lev, J. Livage, *J. Mater. Chem.*, 2006, **16**, 1013-1030.

- [125] E.J.A. Pope, K. Braun, C.M. Peterson, *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 1997, **8**, 635-639.
- [126] A. Nieto, S. Areva, T. Wilson, R. Viitala, M. Vallet-Regi, *Acta Biomater.*, 2009, **5**, 3478-3487.
- [127] Y. Jiang, Q. Sun, Z. Jiang, L. Zhang, J. Mi, L. Li, X. Sun, *Mater. Sci. Eng. C*, 2009, **29**, 328-334.
- [128] J. Yu, S. Liu, H. Ju, *Biosens. Bioelectron.*, 2003, **19**, 509-514.
- [129] Y. Chen, Y. Yi, J.D. Brennan, M.A. Brook, *Chem. Mater.*, 2006, **18**, 5326-5335.
- [130] Z.-T. Jiang, Y.-M. Zuo, *Anal. Chem.*, 2001, **73**, 686-688.
- [131] S. Takemoto, K. Tsuru, S. Hayakawa, A. Osaka, S. Takashima, *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 2001, **21**, 97-104.
- [132] H.P.H. Yiu, P.A. Wright, *J. Mater. Chem.*, 2005, **15**, 3690-3700.
- [133] L. Washmon-Kriel, V.L. Jimenez, K.J. Balkus Jr, *J. Mol. Catal. B : Enzym.*, 2000, **10**, 453-469.
- [134] A.M. Tope, N. Srinivas, S.J. Kulkarni, K. Jamil, *J. Mol. Catal. B : Enzym.*, 2001, **16**, 17-26.
- [135] T. Coradin, M. Boissière, J. Livage, *Curr. Med. Chem.*, 2006, **13(1)**, 99-108.
- [136] C.J. Brinker, G.W. Scherer, « Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing », 1990, Academic Press.
- [137] R.B. Bhatia, C.J. Brinker, A.K. Gupta, A.K. Singh, *Chem. Mater.*, 2000, **12**, 2434-2441.
- [138] A. Coiffier, T. Coradin, C. Roux, O.M.M. Bouvet, J. Livage, *J. Mater. Chem.*, 2001, **11**, 2039-2044.
- [139] G. Carturan, R. Dal Toso, S. Boninsegna, R. Dal Monte, *J. Mater. Chem.*, 2004, **14**, 2087-2098.
- [140] D.-M. Liu, I.W. Chen, *Acta Mater.*, 1999, **47**, 4535-4544.
- [141] K.S. Finnie, J.R. Barlett, J.L. Woolfrey, *J. Mater. Chem.*, 2000, **10**, 1099-1101.
- [142] M.A. Brook, Y. Chen, K. Guo, Z. Zhang, W. Jin, A. Deisingh, J. Cruz-Aguado, J.D. Brennan, *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 2004, **31**, 343-348.
- [143] M.L. Ferrer, F. Del Monte, D. Levy, *Chem. Mater.*, 2002, **14**, 3619-3621.
- [144] R. Campostrini, G. Carturan, R. Caniato, A. Piovan, R. Filippini, G. Innocenti, E.M. Cappelletti, *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 1996, **7**, 87-97.
- [145] E. Callone, R. Campostrini, G. Carturan, A. Cavazza, R. Guzzon, *J. Mater. Chem.*, 2008, **18**, 4839-4848.
- [146] S. Boninsegna, R. Dal Toso, R. Dal Monte, G. Carturan, *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 2003, **26**, 1151-1157.
- [147] T. Coradin, N. Nassif, J. Livage, *Appl. Microbiol. Technol.*, 2006, **61**, 429-434.
- [148] S. Sakai, T. Ono, H. Ijima, K. Kawakami, *J. Membr. Sci.*, 2002, **205**, 183-189.

Chapitre 2 - Objectifs et stratégie scientifique

- [1] C.F. Meunier, P. Dandoy, B.-L. Su, *J. Coll. Interf. Sci.*, 2010, **342**, 211-224.
- [2] S.Y. Tsang, S.C. Tam, I. Bremner, M.J. Burkitt, *Biochem. J.*, 1996, **317**, 13-16.

- [3] D. Mottet, V. Dumont, Y. Deccache, C. Demazy, N. Ninane, M. Raes, C. Michiels, *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**, 31277-31285.
- [4] M. Skelin, M. Rupnik, A. Cencič, *ALTEX*, 2010, **27**, 105-113.
- [5] B. Soria, E. Andreu, G. Berná, E. Fuentes, A. Gil, T. León-Quinto, F. Martín, E. Montanya, A. Nadal, J.A. Reig, C. Ripoll, E. Roche, J.V. Sanchez-Andrés, J. Segura, *Pflügers Arch – Eur. J. Physiol.*, 2000, **440**, 1-18.
- [6] A.F. Gazdar, W.L. Chick, H.K. Oie, H.L. Sims, D.L. King, G.C. Weir, V. Lauris, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, **77**(6), 3519-3523.
- [7] R.F. Santerre, R.A. Cook, R.M.D. Crisel, J.D. Sharp, R.J. Schmidt, D.C. Williams, C.P. Wilson, *Proc. Natl., Acad. Sci. USA*, 1981, **78**(7), 4339-4343.
- [8] C.B. Newgard, *Diabetes*, 1994, **43**, 341-350.
- [9] S. Efrat, D. Hanahan, *Mol. Cell. Biol.*, 1987, **7**(1), 192-198.
- [10] M. Asfari, D. Janjic, P. Meda, G. Li, P.A. Halban, C.B. Wollheim, *Endocrinology*, 1992, **130**(1), 167-178.
- [11] A. Merglen, S. Theander, B. Rubi, G. Chaffard, C.B. Wollheim, P. Maechler, *Endocrinology*, 2004, **145**(2), 667-678.
- [12] H. Hirashima, H. Imai, V. Balek, *J. Non-Cryst. Solids*, 2001, **285**, 96-100.
- [13] B. Yao, L. Zhang, *J. Mater. Sci.*, 1999, **34**, 5983-5987.
- [14] T. López, E. Ortiz, P. Quintana, R.D. González, *Colloids Surf., A*, 2007, **300**, 3-10.

Chapitre 3 – Partie expérimentale

- [1] C.J. Brinker, G.W. Scherer, « Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing », 1990, Academic Press, 501-505.
- [2] <http://www.supercritical-solutions.com/fr/supercritical-co2>, consulté le 29 août 2013 (figure modifiée à partir d'une image originale).
- [3] K.S.W. King, S.J. Gregg, « Adsorption, Surface area and Porosity », 1982, London, Academic Press.
- [4] International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), <http://www.iupac.org/publications/pac/1985/pdf/5704x0603.pdf>, consulté le 10 décembre 2013.
- [5] <http://www.er.uqam.ca/nobel/r27734/solcon/surfasp.html>, consulté le 29 août 2013 (figure modifiée à partir d'une image originale).
- [6] E.P. Barret, L.G. Joyner, P.P. Halenda, *J. Am. Chem. Soc.*, 1951, **73**, 373-380.
- [7] S. Brunauer, P.H. Emmett, E. Teller, *J. Am. Chem. Soc.*, 1938, **60**, 309-319.
- [8] B.J. Clark, T. Frost, M.A. Russell, « UV Spectroscopy: Techniques, Instrumentation and Data Handling », 1993, Chapman and Hall, London, 1-15.
- [9] B. Valeur, « Invitation à la fluorescence moléculaire », 2004, Ed. De Boeck, 21-31.
- [10] G. Wang, J. Zhang, A.H. Dewilde, A.K. Pal, D. Bello, J.M. Therrien, S.J. Braunhut, K.A. Marx, *Toxicology*, 2012, **299**, 99-111 (figure modifiée à partir d'une image originale).

- [11] <http://www.allcells.com/blog/how-to-count-fresh-primary-cells/>, consulté le 29 août 2013 (figure modifiée à partir d'une image originale).
- [12] Hansatech Instruments, <http://hansatech-instruments.com/>, consulté le 2 septembre 2013 (figure modifiée à partir d'une image originale).
- [13] J.R. Crowther, « The ELISA Guidebook », 2001, Humana Press, 17-18.

Chapitre 4 - Conception d'une matrice poreuse, résistante et biocompatible pour l'encapsulation de cellules animales

- [1] B.W. Lee, R. Faller, A.K. Sum, I. Vattulainen, M. Patra, M. Karttunen, *Fluid Phase Equilib.*, 2004, **225**, 63-68.
- [2] B.-L. Su, C. Sanchez, X.-Y. Yang, « Hierarchically Structured Porous Materials : From Nanoscience to Catalysis, Separation, Optics, Energy and Life Science », 2011, Wiley, 241-267.
- [3] Y. Yi, Y. Chen, M.A. Brook, J.D. Brennan, *Chem. Mater.*, 2006, **18**, 5336-5342.
- [4] H. Honda, K. Suzuki, Y. Sugahara, *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 2001, **22**, 133-138.
- [5] C. Sanchez, J. Livage, M. Henry, J. Babonneau, *J. Non-Cryst. Solids*, 1988, **100**, 65-76.
- [6] A. Ponton, S. Barboux-Doeuff, C. Sanchez, *Colloids Surf., A*, 2000, **162**, 177-192.
- [7] Y. Takahashi, A. Ohsugi, T. Arafuka, T. Ohya, T. Ban, Y. Ohya, *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 2000, **17**, 227-238.
- [8] C.P. Scherer, C.G. Pantano, *J. Non-Cryst. Solids*, 1986, **82**, 246-255.
- [9] S. Sato, S. Oimatsu, R. Takahashi, *Chem. Commun.*, 1997, **22**, 2219-2220.
- [10] S. Doeuff, M. Henry, C. Sanchez, J. Livage, *J. Non-Cryst. Solids*, 1987, **89**, 206-216.
- [11] U. Schubert, *J. Mater. Chem.*, 2005, **15**, 3701-3715.
- [12] Y. Chen, Y. Yi, J.D. Brennan, M.A. Brook, *Chem. Mater*, 2006, **18**, 5326-5335.
- [13] Reproduit avec la permission de l'éditeur à partir de : Y. Chen, Y. Yi, J.D. Brennan, M.A. Brook, *Chem. Mater*, 2006, **18**, 5326-5335, copyright © 2006, American Chemical Society.
- [14] C. Depagne, C. Roux, T. Coradin, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, **400**, 965-976.
- [15] P.J. Morris, *Trends Biotechnol.*, 1996, **14**, 163-167.
- [16] S.R. King, R. Dorian, R.W. Storrs, *Graft*, 2001, **4**, 491-499.
- [17] J.A. Nagy, K.T. Herzberg, E.M. Masse, G.P. Zientara, H.F. Dvorak, *Cancer Res.*, 1989, **49**, 5448-5458.
- [18] P. Dandoy, C.F. Meunier, C. Michiels, B.-L. Su, *PLoS One*, 2011, **6(6)**, e20983, DOI: 10.1371/journal.pone.0020983.
- [19] A. Bartkowiak, L. Canaple, I. Ceausolglu, N. Nurdin, A. Renken, L. Rindibacher, C. Wandrey, B. Desvergne, D. Hunkeler, *Annals of the NY Acad. Sci.*, 1999, **875**, 135-145.
- [20] T.A. Desai, D. Hansford, M. Ferrari, *J. Membr. Sci.*, 1999, **159**, 221-231.
- [21] E.S. O'Sullivan, A. Vegas, D.G. Anderson, G.C. Weir, *Endocr. Rev.*, 2011, **32**, 827-844.

- [22] A. Murua, A. Portero, G. Orive, R.M. Hernández, M. de Castro, J.L. Pedraz, *J. Control. Release*, 2008, **132**, 76-83.
- [23] P. de Vos, M. Spasojevic, B.J. de Haan, M.M. Faas, *Biomaterials*, 2012, **33**, 5552-5559.
- [24] K.I. Draget, G. Skjåk-Braek, O. Smidsrød, *Int. J. Biol. Macromol.*, 1997, **21**, 47-55.
- [25] S.V. Patwardhan, S.J. Clarson, *J. Inorg. Organomet. Polym.*, 2003, **13**, 193-203.
- [26] D.J. Kim, K.-B. Lee, Y.S. Chi, W.-J. Kim, H.-J. Paik, I.S. Choi, *Langmuir*, 2004, **20**, 7904-7906.
- [27] Y. Yan, B. Hao, X. Wang, G. Chen, *Dalton Trans.*, 2013, **42**, 12179-12184.
- [28] S.H. Yang, E.H. Ko, I.S. Choi, *Langmuir*, 2012, **28**, 2151-2155.
- [29] N. Kröger, K.H. Sandhage, *MRS Bull.*, 2010, **35**, 122-126.
- [30] M.B. Dickerson, K.H. Sandhage, R.R. Naik, *Chem. Rev.*, 2008, **108**, 4935-4978.
- [31] X. Shi, T. Cassagneau, F. Caruso, *Langmuir*, 2002, **18**, 904-910.
- [32] Y. Jiang, D. Yang, L. Zhang, Q. Sun, X. Sun, J. Li, Z. Jiang, *Adv. Funct. Mater.*, 2009, **19**, 150-156.
- [33] S.L. Sewell, D.W. Wright, *Chem. Mater.*, 2006, **18**, 3108-3113.
- [34] H.R. Luckarift, M.B. Dickerson, K.H. Sandhage, J.C. Spain, *Small*, 2006, **2(5)**, 640-643.
- [35] K.E. Cole, A.M. Valentine, *Biomacromolecules*, 2007, **8**, 1641-1647.
- [36] K.E. Cole, A.N. Ortiz, M.A. Schoonen, A.M. Valentine, *Chem. Mater.*, 2006, **18**, 4592-4599.
- [37] D. Fischer, Y. Li, B. Ahlemeyer, J. Krieglstein, T. Kissel, *Biomaterials*, 2003, **24**, 1121-1131.

Article: Design of Hybrid Alginate@TiO₂ Microcapsules as a Reservoir of Animal Cells and Drug Delivery System for Cell Therapy

Certaines références reliées à cet article et répertoriées ci-dessous ont déjà été citées dans d'autres chapitres de cette thèse.

- [1] B. Ludwig, A. Rotem, J. Schmid, G.C. Weir, C.K. Colton, M.D. Brendel, T. Neufeld, N.L. Block, K. Yavriyants, A. Steffen, S. Ludwig, T. Chavakis, A. Reichel, D. Azarov, B. Zimmermann, S. Maimon, M. Balyura, T. Rozenshtein, N. Shabtay, P. Vardi, K. Bloch, P. de Vos, A.V. Schally, S.R. Bornstein, U. Barkai, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012, **109**, 5022-5027.
- [2] M. Löhr, A. Hoffmeyer, J.-C. Kröger, M. Freund, J. Hain, A. Holle, P. Karle, W.T. Knöfel, S. Liebe, P. Müller, H. Nizze, M. Renner, R.M. Saller, T. Wagner, K. Hauenstein, W.H. Günzburg, B. Salmons, *Lancet*, 2001, **357**, 1591-1592.
- [3] W. Xu, L. Liu, I.G. Charles, *The FASEB Journal*, 2002, **16**, 213-215.
- [4] C.F. Meunier, P. Dandoy, B.-L. Su, *J. Colloid Interface Sci.*, 2010, **342**, 211-224.
- [5] T. Kobayashi, Y. Aomatsu, H. Kanehiro, M. Hisanaga, Y. Nakajima, *Transplant. Proc.*, 2003, **35**, 484-485.

- [6] M. Ming, X. Li, X. Fan, D. Yang, L. Li, S. Chen, Q. Gu, W. Le, *J. Transl. Med.*, 2009, **7**:53, DOI : 10.1186/1479-5876-7-53.
- [7] A. Léonard, P. Dandoy, E. Danloy, G. Leroux, C.F. Meunier, J.C. Rooke, B.-L. Su, *Chem. Soc. Rev.*, 2011, **40**, 860-885.
- [8] P.L. Chang, J.M. Van Raamsdonk, G. Hortelano, S.C. Barsoum, N.C. MacDonald, T.L. Stockley, *Trends Biotechnol.*, 1999, **17**, 78-83.
- [9] C. Rinsch, P. Dupraz, B.L. Schneider, N. Déglon, P.H. Maxwell, P.J. Ratcliffe, P. Aebischer, *Kidney Int.*, 2002, **62**, 1395-1401.
- [10] S. Sakai, T. Ono, H. Ijima, K. Kawakami, *Biomaterials*, 2002, **23**, 4177, 4183.
- [11] G. Orive, A. R. Gascón, R. M. Hernández, M. Igartua, J. L. Pedraz, *Trends Pharmacol. Sci.*, 2003, **24**, 207-210.
- [12] G. Orive, R.-M. Hernández, A.R. Gascón, R. Calafiore, T.M.S. Chang, P. de Vos, G. Hortelano, D. Hunkeler, I. Lacík, J.L. Pedraz, *Trends Biotechnol.*, 2004, **22**, 87-92.
- [13] P.J. Morris, *Trends Biotechnol.*, 1996, **14**, 163-167.
- [14] S.R. King, R. Dorian, R.W. Storrs, *Graft*, 2001, **4**, 491-499.
- [15] J.A. Nagy, K.T. Herzberg, E.M. Masse, G.P. Zientara, H.F. Dvorak, *Cancer Res.*, 1989, **49**, 5448-5458.
- [16] P. Dandoy, C.F. Meunier, C. Michiels, B.-L. Su, *PLoS One*, 2011, **6**(6), e20983, DOI: 10.1371/journal.pone.0020983.
- [17] G. Carturan, R. Dal Toso, S. Boninsegna, R. Dal Monte, *J. Mater. Chem.*, 2004, **14**, 2087-2098.
- [18] A. Bartkowiak, L. Canaple, I. Ceausolglu, N. Nurdin, A. Renken, L. Rindibacher, C. Wandrey, B. Desvergne, D. Hunkeler, *Annals of the NY Acad. Sci.*, 1999, **875**, 135-145.
- [19] T.A. Desai, D. Hansford, M. Ferrari, *J. Membr. Sci.*, 1999, **159**, 221-231.
- [20] V. Bisceglie, *Ztschr. Krebsforsch.*, 1933, **40**, 122-140.
- [21] H. Uludag, P. de Vos, P.A. Tresco, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2000, **42**, 29-64.
- [22] R.M. Hernandez, G. Orive, A. Murua, J.L. Pedraz, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2010, **62**(7-8), 711-730.
- [23] A.C. Jen, M. Conley Wake, A.G. Mikos, *Biotechnol. Bioeng.*, 1996, **50**, 357-354.
- [24] S. Lahooti, M.V. Sefton, *Biomaterials*, 2000, **21**, 987-995.
- [25] P. de Vos, A.F. Hamel, K. Tatarkiewicz, *Diabetologia*, 2002, **45**, 159-173.
- [26] G. Orive, R.M. Hernández, A.R. Gascón, R. Calafiore, T.M.S. Chang, P. de Vos, G. Hortelano, D. Hunkeler, I. Lacík, A.M.J. Shapiro, J.L. Pedraz, *Nat. Med.*, 2003, **9**, 104-107.
- [27] W. Wang, X. Liu, Y. Xie, H. Zhang, W. Yu, Y. Xiong, W. Xie, X. Ma, *J. Mater. Chem.*, 2006, **16**, 3252-3267.
- [28] P. de Vos, M. Spasojevic, B.J. de Haan, M.M. Faas, *Biomaterials*, 2012, **33**, 5552-5559.
- [29] E.S. O'Sullivan, A. Vegas, D.G. Anderson, G.C. Weir, *Endocr. Rev.*, 2011, **32**, 827-844.
- [30] P. de Vos, C.G. van Hoogmoed, J. van Zanten, S. Netter, J.H. Srubbe, H.J. Busscher, *Biomaterials*, 2003, **24**, 305-312.
- [31] S. Ponce, G. Orive, R. Hernández, A. R. Gascón, J.L. Pedraz, B.J. de Haan, M.M. Faas, H.J. Mathieu, P. de Vos, *Biomaterials*, 2006, **27**, 4831-4839.
- [32] C.G. Thanos, B.E. Bintz, W.J. Bell, H. Qian, P.A. Schneider, D.H. MacArthur, D.F. Emerich, *Biomaterials*, 2006, **27**, 3570-2579.

- [33] D.W. Green, I. Leveque, D. Walsh, D. Howard, X. Yang, K. Partridge, S. Mann, R.O.C. Oreffo, *Adv. Funct. Mater.*, 2005, **15**, 917-923.
- [34] A. Nieto, S. Areva, T. Wilson, R. Viitala, M. Vallet-Regi, *Acta Biomater.*, 2009, **5**, 3478-3487.
- [35] J. Livage, T. Coradin, C. Roux, *J. Phys.: Condens. Matter*, 2001, **13**, 673-691.
- [36] M.F. Desimone, G.S. Alvarez, M.L. Foglia, L.E. Diaz, *Recent Pat. Biotechnol.*, 2009, **3**, 55-60.
- [37] R.B. Bhatia, C.J. Brinker, A.K. Gupta, A.K. Singh, *Chem. Mater.*, 2000, **12**, 2434-2441.
- [38] P. de Vos, A. Andersson, S.K. Tam, M.M. Faas, J.P. Halle, *Immunol. Endocr. Metabol. Agents Med. Chem.*, 2006, **6**, 139-153.
- [39] A. Murua, A. Portero, G. Orive, R.M. Hernández, M. de Castro, J.L. Pedraz, *J. Control. Release*, 2008, **132**, 76-83.
- [40] S. Boninsegna, R. Dal Toso, R. Dal Monte, G. Carturan, *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 2003, **26**, 1151-1157.
- [41] T. Coradin, N. Nassif, J. Livage, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2003, **61**, 429-434.
- [42] S. Sakai, T. Ono, H. Ijima, K. Kawakami, *J. Membr. Sci.*, 2002, **205**, 183-189.
- [43] P. Dandoy, C.F. Meunier, G. Leroux, V. Voisin, L. Giordano, N. Caron, C. Michiels, B.-L. Su, *PLoS One*, 2013, **8(1)**, e54683, DOI : 10.1371/journal.pone.0054683.
- [44] T. López, E. Ortiz, P. Quintana, R.D. González, *Colloids Surf., A*, 2007, **300**, 3-10.
- [45] J.C. Rooke, A. Léonard, H. Sarmiento, C.F. Meunier, J.-P. Descy, B.-L. Su, *J. Mater. Chem.*, 2011, **21**, 951-959.
- [46] C.F. Meunier, J.C. Rooke, A. Léonard, P. Van Cutsem, B.-L. Su, *J. Mater. Chem.*, 2010, **20**, 929-936.
- [47] S.H. Yang, E.H. Ko, I.S. Choi, *Langmuir*, 2012, **28**, 2151-2155.
- [48] N. Rausch, E.P. Burte, *J. Electrochem. Soc.*, 1993, **140(1)**, 145-149.
- [49] K. Wessels, A. Feldhoff, M. Wark, J. Rathousky, T. Oekermann, *Electrochem. Solid-State Lett.*, 2006, **9(6)**, C93-C96.
- [50] P. Hoyer, H. Masuda, *J. Mater. Sci. Lett.*, 1996, **15**, 1228-1230.
- [51] H. Niederwald, S. Laux, M. Kennedy, U. Schallenberg, A. Duparré, M. Mertin, N. Kaiser, D. Ristau, *Appl. Optics*, 1999, **38(16)**, 3610-3613.
- [52] M.J. Alam, D.C. Cameron, *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 2002, **25**, 137-145.
- [53] H. Yin, Y. Wada, T. Kitamura, S. Kambe, S. Murasawa, H. Mori, T. Sakata, S. Yanagida, *J. Mater. Chem.*, 2001, **11**, 1694-1703.
- [54] Y. Chen, Y. Yi, J.D. Brennan, M.A. Brook, *Chem. Mater.*, 2006, **18**, 5326-5335.
- [55] C. Sanchez, J. Livage, M. Henry, F. Babonneau, *J. Non-Cryst. Solids*, 1988, **100**, 65-76.
- [56] H. Honda, K. Suzuki, Y. Sugahara, *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 2001, **22**, 133-138.
- [57] B.W. Lee, R. Faller, A.K. Sum, I. Vattulainen, M. Patra, M. Karttunen, *Fluid Phase Equilib.*, 2004, **225**, 63-68.
- [58] S.V. Patwardhan, S.J. Clarson, *J. Inorg. Organomet. Polym.*, 2003, **13**, 193-203.
- [59] D.J. Kim, K.-B. Lee, Y.S. Chi, W.-J. Kim, H.-J. Paik, I.S. Choi, *Langmuir*, 2004, **20**, 7904-7906.
- [60] Y. Yan, B. Hao, X. Wang, G. Chen, *Dalton Trans.*, 2013, **42**, 12179-12184.
- [61] N. Kröger, K.H. Sandhage, *MRS Bull.*, 2010, **35**, 122-126.
- [62] M.B. Dickerson, K.H. Sandhage, R.R. Naik, *Chem. Rev.*, 2008, **108**, 4935-4978.
- [63] X. Shi, T. Cassagneau, F. Caruso, *Langmuir*, 2002, **18**, 904-910.

- [64] Y. Jiang, D. Yang, L. Zhang, Q. Sun, X. Sun, J. Li, Z. Jiang, *Adv. Funct. Mater.*, 2009, **19**, 150-156.
- [65] S.L. Sewell, D.W. Wright, *Chem. Mater.*, 2006, **18**, 3108-3113.
- [66] D. Fischer, Y. Li, B. Ahlemeyer, J. Krieglstein, T. Kissel, *Biomaterials*, 2003, **24**, 1121-1131.
- [67] H. Sedaira, K.A. Idriss, M.S. Abdel-Aziz, *Analyst*, 1996, **121**, 1079-1084.
- [68] S. Brunauer, P. Emmett, E. Teller, *J. Am. Chem. Soc.*, 1938, **60**, 309-319.

Chapitre 5 - Etude *in vivo* de la biocompatibilité des matrices hybrides et de l'immuno-isolation des cellules encapsulées

- [1] P. Dandoy, C.F. Meunier, G. Leroux, V. Voisin, L. Giordano, N. Caron, C. Michiels, B.-L. Su, *PLoS One*, 2013, **8(1)**, e54683, DOI : 10.1371/journal.pone.0054683.
- [2] S.-M. Hsu, L. Raine, H. Fanger, *J. Histochem. Cytochem.*, 1981, **29(4)**, 577-580.

Article: Alginate-Based Hybrid Materials as An “Artificial Organ” Model: *In Vivo* Biocompatibility and Evaluation of Entrapped Human Cell Immune-Isolation

Certaines références reliées à cet article et répertoriées ci-dessous ont déjà été citées dans d'autres chapitres de cette thèse.

- [1] A. Léonard, P. Dandoy, E. Danloy, G. Leroux, C.F. Meunier, J.C. Rooke, B.-L. Su, *Chem. Soc. Rev.*, 2011, **40**, 860-885.
- [2] M. Campàs, R. Carpentier, R. Rouillon, *Biotechnol. Adv.*, 2008, **26**, 370-378.
- [3] T. Oczkowski, E. Zwierkowska, S. Bartkowiak, *Bioelectrochemistry*, 2007, **70**, 192-197.
- [4] C.F. Meunier, J.C. Rooke, A. Léonard, H. Xie, B.-L. Su, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 3843, 3859.
- [5] J.C. Rooke, A. Léonard, H. Sarmiento, C.F. Meunier, J.-P. Descy, B.-L. Su, *J. Mater. Chem.*, 2011, **21**, 951-959.
- [6] J.C. Rooke, A. Léonard, H. Sarmiento, C.F. Meunier, J.-P. Descy, B.-L. Su, *J. Mater. Chem.*, 2008, **18**, 2833-2841.
- [7] J.-S. Cheng, Y.-J. Yuan, *Proteomics*, 2006, **6**, 2199-2207.
- [8] H. Dörnenburg, *Process Biochem.*, 2004, **39**, 1369-1375.
- [9] G. Carturan, R. Dal Monte, G. Pressi, S. Secondin, P. Verza, *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 1998, **13**, 273-276.

- [10] T.V. Laurinavichene, A.S. Fedorov, M.L. Ghirardi, M. Seibert, A.A. Tsygankov, *Int. J. Hydrogen Energy*, 2006, **31**, 659-667.
- [11] J.J. Hahn, M.L. Ghirardi, W.A. Jacoby, *Biochem. Eng. J.*, 2007, **37**, 75-79.
- [12] D.J. Dickson, C.J. Page, R.L. Ely, *Int. J. Hydrogen Energy*, 2009, **34**, 204-215.
- [13] P. Dandoy, C.F. Meunier, C. Michiels, B.-L. Su, *PLoS One*, 2011, **6(6)**, e20983, DOI: 10.1371/journal.pone.0020983.
- [14] G. Carturan, R. Dal Toso, S. Boninsegna, R. Dal Monte, *J. Mater. Chem.*, 2004, **14**, 2087-2098.
- [15] E.J. Pope, K. Braun, C.M. Peterson, *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 1997, **8**, 635-637.
- [16] J. Livage, T. Coradin, C. Roux, *J. Phys.: Condens. Matter*, 2001, **13**, 673-691.
- [17] A. Nieto, S. Areva, T. Wilson, R. Viitala, M. Vallet-Regi, *Acta Biomater.*, 2009, **5**, 3478-3487.
- [18] M.F. Desimone, G.S. Alvarez, M.L. Foglia, L.E. Diaz, *Recent Pat. Biotechnol.*, 2009, **3**, 55-60.
- [19] G. Orive, A. R. Gascón, R. M. Hernández, M. Igartua, J. L. Pedraz, *Trends Pharmacol. Sci.*, 2003, **24**, 207-210.
- [20] G. Orive, R.-M. Hernández, A.R. Gascón, R. Calafiore, T.M.S. Chang, P. de Vos, G. Hortelano, D. Hunkeler, I. Lacík, J.L. Pedraz, *Trends Biotechnol.*, 2004, **22**, 87-92.
- [21] S.R. King, R. Dorian, R.W. Storrs, *Graft*, 2001, **4**, 491-499.
- [22] J.A. Nagy, K.T. Herzberg, E.M. Masse, G.P. Zientara, H.F. Dvorak, *Cancer Res.*, 1989, **49**, 5448-5458.
- [23] T.A. Desai, D. Hansford, M. Ferrari, *J. Membr. Sci.*, 1999, **159**, 221-231.
- [24] A. Bartkowiak, L. Canaple, I. Ceausolglu, N. Nurdin, A. Renken, L. Rindibacher, C. Wandrey, B. Desvergne, D. Hunkeler, *Annals of the NY Acad. Sci.*, 1999, **875**, 135-145.
- [25] C.F. Meunier, P. Dandoy, B.-L. Su, *J. Colloid Interface Sci.*, 2010, **342**, 211-224.
- [26] A. Coiffier, T. Coradin, C. Roux, O.L.M. Bouvet, J. Livage, *J. Mater. Chem.*, 2001, **11**, 2039-2044.
- [27] A.J. Di Pasqua, K.K. Sharma, Y.-L. Shi, B.B. Toms, W. Ouellette, J.C. Dabrowiak, T. Asefa, *J. Inorg. Biochem.*, 2008, **102**, 1416-1423.
- [28] G. Arcangeli, V. Cupelli, G. Giuliano, *Sci. Total Environ.*, 2001, **270**, 135-139.
- [29] E.-J. Park, K. Park, *Toxicol. Lett.*, 2009, **184**, 18-25.
- [30] H. Nabeshi, T. Yoshikawa, K. Matsuyama, Y. Nakazato, S. Tochigi, S. Kondoh, T. Hirai, T. Akase, K. Nagano, Y. Abe, Y. Yoshioka, H. Kamada, N. Itoh, S. Tsunoda, Y. Tsutsumi, *Part. Fibre Toxicol.*, 2011, **8**, DOI: 10.1186/1743-8977-8-1.
- [31] A. Murua, A. Portero, G. Orive, R.M. Hernández, M. de Castro, J.L. Pedraz, *J. Control. Release*, 2008, **132**, 76-83.
- [32] A.C. Jen, M. Conley Wake, A.G. Mikos, *Biotechnol. Bioeng.*, 1996, **50**, 357-354.
- [33] N.C. Hunt, L.M. Grover, *Biotechnol. Lett.*, 2010, **32**, 733-742.
- [34] R.M. Hernandez, G. Orive, A. Murua, J.L. Pedraz, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2010, DOI: 10.1016/j.addr.2010.02.004.
- [35] W. Wang, X. Liu, Y. Xie, H. Zhang, W. Yu, Y. Xiong, W. Xie, X. Ma, *J. Mater. Chem.*, 2006, **16**, 3252-3267.
- [36] P. de Vos, A.F. Hamel, K. Tatarkiewicz, *Diabetologia*, 2002, **45**, 159-173.
- [37] P. de Vos, M. Spasojevic, B.J. de Haan, M.M. Faas, *Biomaterials*, 2012, **33**, 5552-5559.
- [38] S. Ponce, G. Orive, R. Hernández, A. R. Gascón, J.L. Pedraz, B.J. de Haan, M.M. Faas, H.J. Mathieu, P. de Vos, *Biomaterials*, 2006, **27**, 4831-4839.

- [39] B.L. Strand, L. Ryan, P.I. Veld, B. Kulseng, A.M. Rokstad, G. Skjåk-Braek, T. Espevik, *Cell Transplant.*, 2001, **10**, 263-275.
- [40] S. Boninsegna, R. Dal Toso, R. Dal Monte, G. Carturan, *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 2003, **26**, 1151-1157.
- [41] S. Sakai, T. Ono, H. Ijima, K. Kawakami, *Biomaterials*, 2001, **22**, 2827-2834.
- [42] T. Coradin, N. Nassif, J. Livage, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2003, **61**, 429-434.
- [43] P. Dandoy, C.F. Meunier, G. Leroux, V. Voisin, L. Giordano, N. Caron, C. Michiels, B.-L. Su, *PLoS One*, 2013, **8(1)**, e54683, DOI : 10.1371/journal.pone.0054683.
- [44] J.D. Bass, D. Grosso, C. Boissiere, E. Belamie, T. Coradin, C. Sanchez, *Chem. Mater.*, 2007, **19**, 4349-4356.
- [45] Y. Chen, Y. Yi, J.D. Brennan, M.A. Brook, *Chem. Mater.*, 2006, **18**, 5326-5335.
- [46] K. Cai, J. Bossert, K.D. Jandt, *Colloids Surf., B*, 2006, **49**, 136-144.
- [47] T. López, E. Ortiz, P. Quintana, R.D. González, *Colloids Surf., A*, 2007, **300**, 3-10.
- [48] G. Leroux, C.F. Meunier, C. Michiels, B.-L. Su, *Article 1 de cette thèse, soumis (J. Mater. Chem. B)*.
- [49] Y. Yan, B. Hao, X. Wang, G. Chen, *Dalton Trans.*, 2013, **42**, 12179-12184.
- [50] X. Shi, T. Cassagneau, F. Caruso, *Langmuir*, 2002, **18**, 904-910.
- [51] D. Fischer, Y. Li, B. Ahlemeyer, J. Krieglstein, T. Kissel, *Biomaterials*, 2003, **24**, 1121-1131.
- [52] C. Rival, M.S. Theas, V.A. Guazzone, L. Lustig, *J. Reprod. Immunol.*, 2006, **70**, 43-58.
- [53] T. van der Poll, C.V. Keogh, X. Guirao, W.A. Buurman, M. Kopf, S.F. Lowry, *J. Infect. Dis.*, 1997, **176**, 439-444.
- [54] M.J. Craig, R.D. Loberg, *Cancer Metastasis Rev.*, 2006, **25**, 611-619.
- [55] C. Gerard, B.J. Rollins, *Nat. Immunol.*, 2001, **2**, 108-115.
- [56] V. Vaithilingam, B.E. Tuch, *Rev. Diabet. Stud.*, 2011, **8**, 51-67.

Chapitre 6 - Encapsulation de cellules β au sein des matrices poreuses pour la délivrance d'insuline sous stimulation par le glucose

- [1] P.A. Halban, G.A. Praz, C.B. Wollheim, *Biochem. J.*, 1983, **212**, 439-443.
- [2] J.-I. Miyazaki, K. Araki, E. Yamato, H. Ikegami, T. Hasano, Y. Shibazaki, Y. Oka, K.-I. Yamamura, *Endocrinology*, 1990, **127**, 126-132.
- [3] S. Efrat, *Annals of the NY Acad. Sci.*, 1999, **875**, 286-293.

Article: Encapsulation of beta INS-1E Cells in Alginate@TiO₂ Microcapsules for the Controlled Delivery of Insulin

Certaines références reliées à cet article et répertoriées ci-dessous ont déjà été citées dans d'autres chapitres de cette thèse.

- [1] 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, *N. Engl. J. Med.*, 2000, **343**, 230-238.
- [2] A.M.J. Shapiro, C. Ricordi, B.J. Hering, H. Auchincloss, R. Lindblad, R.P. Robertson, A. Secchi, M.D. Brendel, T. Berney, D.C. Brennan, E. Cagliero, R. Alejandro, E.A. Ryan, B. DiMercurio, P. Morel, K.S. Polonsky, J.-A. Reems, R.G. Bretzel, F. Bertuzzi, T. Froud, R. Kandaswamy, D.E.R. Sutherland, G. Eisenbarth, M. Segal, J. Preiksaitis, G.S. Korbitt, F.B. Barton, L. Viviano, V. Seyfert-Margolis, J. Bluestone, J.R.T. Lakey, *N. Engl. J. Med.*, 2006, **355**, 1318-1330.
- [3] E.A. Ryan, B.W. Paty, P.A. Senior, D. Bigam, E. Alfadhli, N.M. Kneteman, J.R.T. Lakey, A.M.J. Shapiro, *Diabetes*, 2005, **54**, 2060-2069.
- [4] B. Ludwig, A. Rotem, J. Schmid, G.C. Weir, C.K. Colton, M.D. Brendel, T. Neufeld, N.L. Block, K. Yavriyants, A. Steffen, S. Ludwig, T. Chavakis, A. Reichel, D. Azarov, B. Zimmermann, S. Maimon, M. Balyura, T. Rozenshtein, N. Shabtay, P. Vardi, K. Bloch, P. de Vos, A.V. Schally, S.R. Bornstein, U. Barkai, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012, **109**, 5022-5027.
- [5] A. Hyder, C. Laue, J. Schrezenmeir, *Toxicol. In Vitro*, 2005, **19**, 541-546.
- [6] E.A. Ryan, J.R.T. Lakey, R.V. Rajotte, G.S. Korbitt, T. Kin, S. Imes, A. Rabinovitch, J.F. Elliott, D. Bigam, N.M. Kneteman, G.L. Warnock, I. Larsen, A.M.J. Shapiro, *Diabetes*, 2001, **50**, 710-719.
- [7] G. Orive, A. R. Gascón, R. M. Hernández, M. Igartua, J. L. Pedraz, *Trends Pharmacol. Sci.*, 2003, **24**, 207-210.
- [8] C.F. Meunier, P. Dandoy, B.-L. Su, *J. Colloid Interface Sci.*, 2010, **342**, 211-224.
- [9] A. Léonard, P. Dandoy, E. Danloy, G. Leroux, C.F. Meunier, J.C. Rooke, B.-L. Su, *Chem. Soc. Rev.*, 2011, **40**, 860-885.
- [10] M. Ming, X. Li, X. Fan, D. Yang, L. Li, S. Chen, Q. Gu, W. Le, *J. Transl. Med.*, 2009, **7**, 53.
- [11] C. Rinsch, P. Dupraz, B.L. Schneider, N. Déglon, P.H. Maxwell, P.J. Ratcliffe, P. Aebischer, *Kidney Int.*, 2002, **62**, 1395-1401.
- [12] P.L. Chang, J.M. Van Raamsdonk, G. Hortelano, S.C. Barsoum, N.C. MacDonald, T.L. Stockley, *Trends Biotechnol.*, 1999, **17**, 78-83.
- [13] V. Bisceglie, *Ztschr. Krebsforsch.*, 1933, **40**, 122-140.
- [14] G. Orive, R.-M. Hernández, A.R. Gascón, R. Calafiore, T.M.S. Chang, P. de Vos, G. Hortelano, D. Hunkeler, I. Lacík, J.L. Pedraz, *Trends Biotechnol.*, 2004, **22**, 87-92.
- [15] P. de Vos, M. Spasojevic, B.J. de Haan, M.M. Faas, *Biomaterials*, 2012, **33**, 5552-5559.
- [16] A.C. Jen, M. Conley Wake, A.G. Mikos, *Biotechnol. Bioeng.*, 1996, **50**, 357-354.
- [17] P. de Vos, A.F. Hamel, K. Tatarkiewicz, *Diabetologia*, 2002, **45**, 159-173.

- [18] E.S. O’Sullivan, A. Vegas, D.G. Anderson, G.C. Weir, *Endocr. Rev.*, 2011, **32**, 827-844.
- [19] R.M. Hernandez, G. Orive, A. Murua, J.L. Pedraz, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2010, DOI: 10.1016/j.addr.2010.02.004.
- [20] C.G. Thanos, B.E. Bintz, W.J. Bell, H. Qian, P.A. Schneider, D.H. MacArthur, D.F. Emerich, *Biomaterials*, 2006, **27**, 3570-2579.
- [21] S. Ponce, G. Orive, R. Hernández, A. R. Gascón, J.L. Pedraz, B.J. de Haan, M.M. Faas, H.J. Mathieu, P. de Vos, *Biomaterials*, 2006, **27**, 4831-4839.
- [22] P. Dandoy, C.F. Meunier, C. Michiels, B.-L. Su, *PLoS One*, 2011, **6(6)**, e20983, DOI: 10.1371/journal.pone.0020983.
- [23] P. Dandoy, C.F. Meunier, G. Leroux, V. Voisin, L. Giordano, N. Caron, C. Michiels, B.-L. Su, *PLoS One*, 2013, **8(1)**, e54683, DOI : 10.1371/journal.pone.0054683.
- [24] H. Uludag, P. de Vos, P.A. Tresco, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2000, **42**, 29-64.
- [25] A. Nieto, S. Areva, T. Wilson, R. Viitala, M. Vallet-Regi, *Acta Biomater.*, 2009, **5**, 3478-3487.
- [26] M.F. Desimone, G.S. Alvarez, M.L. Foglia, L.E. Diaz, *Recent Pat. Biotechnol.*, 2009, **3**, 55-60.
- [27] T. Coradin, N. Nassif, J. Livage, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2003, **61**, 429-434.
- [28] T. López, E. Ortiz, P. Quintana, R.D. González, *Colloids Surf., A*, 2007, **300**, 3-10.
- [29] Y. Chen, Y. Yi, J.D. Brennan, M.A. Brook, *Chem. Mater.*, 2006, **18**, 5326-5335.
- [30] S.H. Yang, E.H. Ko, I.S. Choi, *Langmuir*, 2012, **28**, 2151-2155.
- [31] Y. Yan, B. Hao, X. Wang, G. Chen, *Dalton Trans.*, 2013, **42**, 12179-12184.
- [32] S.L. Sewell, D.W. Wright, *Chem. Mater.*, 2006, **18**, 3108-3113.
- [33] Y. Jiang, D. Yang, L. Zhang, Q. Sun, X. Sun, J. Li, Z. Jiang, *Adv. Funct. Mater.*, 2009, **19**, 150-156.
- [34] M.B. Dickerson, K.H. Sandhage, R.R. Naik, *Chem. Rev.*, 2008, **108**, 4935-4978.
- [35] N. Kröger, K.H. Sandhage, *MRS Bull.*, 2010, **35**, 122-126.
- [36] D. Fischer, Y. Li, B. Ahlemeyer, J. Krieglstein, T. Kissel, *Biomaterials*, 2003, **24**, 1121-1131.
- [37] G. Leroux, C.F. Meunier, C. Michiels, B.-L. Su, *Article 1 de cette thèse, soumis (J. Mater. Chem. B)*.
- [38] G. Leroux, C.F. Meunier, V. Voisin, I. Habsch, N. Caron, C. Michiels, B.-L. Su, *Article 2 de cette thèse, en voie de soumission*.
- [39] A. Merglen, S. Theander, B. Rubi, G. Chaffard, C.B. Wollheim, P. Maechler, *Endocrinology*, 2004, **145(2)**, 667-678.
- [40] H.E. Hohmeier, H. Mulder, G. Chen, R. Henkel-Rieger, M. Prentki, C.B. Newgard, *Diabetes*, 2000, **49**, 424-430.
- [41] M. Orecná, R. Hafko, Z. Bacová, J. Podskocová, D. Chorvát Jr., V. Strbák, *Physiol. Res.*, 2008, **57**, 935-945.
- [42] J.A. Nagy, K.T. Herzberg, E.M. Masse, G.P. Zientara, H.F. Dvorak, *Cancer Res.*, 1989, **49**, 5448-5458.
- [43] P.J. Morris, *Trends Biotechnol.*, 1996, **14**, 163-167.
- [44] S.R. King, R. Dorian, R.W. Storrs, *Graft*, 2001, **4**, 491-499.
- [45] T.A. Desai, D. Hansford, M. Ferrari, *J. Membr. Sci.*, 1999, **159**, 221-231.

Chapitre 7 - Conclusions générales et perspectives

- [1] A.A. Rossini, A.A. Like, W.L. Chick, M.C. Appel, G.F. Cahill Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1977, **74(6)**, 2485-2489.
- [2] M.J. Reed, K. Meszaros, L.J. Entes, M.D. Claypool, J.G. Pinkett, T.M. Gadbois, G.M. Reaven, *Metabolism*, 2000, **49(11)**, 1390-1394. 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, *N. Engl. J. Med.*, 2000, **343**, 230-238.
- [3] A.I. Silva, A.N. de Matos, I.G. Brons, M. Mateus, *Med. Res. Rev.*, 2006, **26(2)**, 181-222.
- [4] P. de Vos, C.G. Hoogmoed, H.J. Busscher, *J. Biomed. Mater. Res.*, 2002, **60(2)**, 252-259.
- [5] P. de Vos, B. de Haan, R. Van Schilfgaarde, *Biomaterials*, 1997, **18(3)**, 273-278
- [6] Y. Dor, J. Brown, O.I. Martinez, D.A. Melton, *Nature*, 2004, **429(6987)**, 41-46.
- [7] L.U. Wahlberg, G. Lind, P.M. Almqvist, P. Kusk, J. Tornøe, B. Juliusson, M. Söderman, E. Selldén, Å. Seiger, M. Eriksdotter-Jönnhagen, B. Linderöth, *J. Neurosurg.*, 2012, **117**, 340-347.
- [8] I. Date, T. Shingo, H. Yoshida, K. Fujiwara, K. Kobayashi, T. Ohmoto, *Cell Transplant.*, 2000, **9(5)**, 705-709.
- [9] H. Kishima, T. Poyot, J. Bloch, J. Daguët, F. Condé, F. Dollé, F. Hinnen, W. Pralong, S. Palfi, N. Déglon, P. Aebischer, P. Hantraye, *Neurobiol. Dis.*, 2004, **16**, 428-439.

Annexe I

Composition du milieu de culture des HepG2 – DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

31885

Acides aminés

		mg/L	0,4	mM
Glycine	30			
L-Arginine HCl	84		0,398104	
L-Cystine 2HCl	63		0,201278	
L-Glutamine	580		3,962703	
L-Histidine HCl-H ₂ O	42		0,2	
L-Isoleucine	105		0,801527	
L-Leucine	105		0,801527	
L-Lysine HCl	146		0,797814	
L-Méthionine	30		0,201342	
L-Phénylalanine	66		0,4	
L-Sérine	42		0,4	
L-Thréonine	95		0,798319	
L-Tryptophane	16		0,078431	
L-Tyrosine	72		0,39779	
L-Valine	94		0,803419	

Vitamines

		mg/L	0,028571	mM
Chlorure de choline	4			
D-Pantothénate de calcium	4		0,008386	
Acide folique	4		0,00907	
Nicotinamide	4		0,032787	
Pyridoxine HCl	4		0,019608	
Riboflavine	0,4		0,001064	
Thiamine HCl	4		0,011869	
Inositol	7,2		0,04	

Sels inorganiques

CaCl ₂ .2H ₂ O	264	mg/L	1,795918	mM
Fe(NO ₃) ₃ .9H ₂ O	0,1		0,000248	
MgSO ₄ .7H ₂ O	200		0,813008	
KCl	400		5,333334	
NaHCO ₃	3700		44,04762	
NaCl	6400		110,344826	
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	141		0,915584	

Autres composants

D-Glucose (Dextrose)	1000	mg/L	5,555555	mM
Rouge de phénol	15		0,039851	
Pyruvate de sodium	110		1	

Composition du milieu de culture des INS-1E – RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640

Acides aminés

Glycine	10	mg/L	0,133333	mM
L-Arginine	200		1,149425	
L-Asparagine	50		0,378788	
Acide L-Aspartique	20		0,150376	
L-Cystine 2HCl	65		0,207668	
Acide L-Glutamique	20		0,136054	
L-Glutamine	300		2,054794	
L-Histidine	15		0,096774	
L-Hydroxyproline	20		0,152672	
L-Isoleucine	50		0,381679	
L-Leucine	50		0,381679	
L-Lysine HCl	40		0,218579	
L-Méthionine	15		0,100671	
L-Phénylalanine	15		0,090909	
L-Proline	20		0,173913	
L-Sérine	30		0,285714	
L-Thréonine	20		0,168067	
L-Tryptophane	5		0,02451	
L-Tyrosine sel disodique dihydrate	29		0,111111	
L-Valine	20		0,17094	

Vitamines

Biotine	0,2	mg/L	0,00082	mM
Chlorure de choline	3		0,021429	
D-Pantothénate de calcium	0,25		0,000524	

Acide folique	1	0,002268
Nicotinamide	1	0,008197
Acide 4-aminobenzoïque	1	0,007299
Pyridoxine HCl	1	0,004854
Riboflavine	0,2	0,000532
Thiamine HCl	1	0,002967
Vitamine B12	0	0,000004
Inositol	35	0,194444

Sels inorganiques

Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	100	mg/L	0,423729	mM
MgSO ₄	48,84		0,407	
KCl	400		5,333334	
NaHCO ₃	2000		23,809525	
NaCl	6000		103,44827	
Na ₂ HPO ₄	800		5,633803	

Autres composants

D-Glucose (Dextrose)	2000	mg/L	11,11111	mM
Glutathion (forme réduite)	1		0,003257	
Rouge de phénol	5		0,013284	

Annexe II

L'adsorption-désorption d'azote (BET)

L'analyse par adsorption-désorption d'azote est une technique de caractérisation de certaines propriétés texturales de matériaux poreux que sont :

- La surface spécifique ;
- Le volume poreux ;
- Le diamètre des pores et la distribution de celui-ci.

Le modèle d'adsorption développé par Stephen Brunauer, Paul Hugh Emmet et Edward Teller, qui ont donné leurs noms à celui-ci (théorie BET) se base sur la description de l'adsorption de molécules sur une surface solide faite par Langmuir.

Ce dernier s'est basé sur la tendance qu'ont les gaz à s'adsorber sur des surfaces métalliques ainsi que sur la théorie de la cinétique pour établir une théorie d'adsorption monocouche en émettant plusieurs hypothèses :

- L'adsorption est le résultat d'un équilibre adsorption-désorption des molécules de gaz ;
- L'adsorption forme toujours une monocouche occupant tous les sites d'adsorption ;
- Si l'énergie cinétique des molécules adsorbées est plus importante que l'énergie attractive de la surface, il y a désorption ;
- La surface d'adsorption est homogène, tous les sites sont équivalents et ont la même énergie ;
- Les molécules adsorbées ne subissent pas d'influence de la part des molécules voisines.

De ces hypothèses, Langmuir proposa une équation d'adsorption à température constante permettant de déterminer la surface spécifique des matériaux. En considérant que la vitesse d'adsorption est proportionnelle à la surface libre et à la pression, que la vitesse de désorption est proportionnelle à la surface occupée par des molécules d'adsorbat et que les vitesses d'adsorption et de désorption sont égales à l'état d'équilibre, il en résulte l'équation suivante :

$$(1 - \theta) P = b\theta$$

Où θ est le taux de recouvrement de la surface.

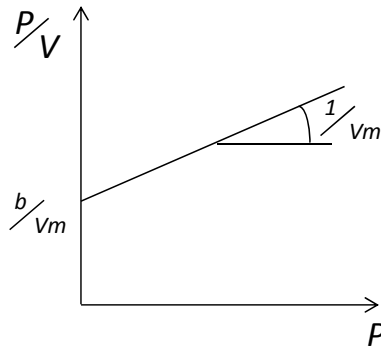
P est la pression à l'équilibre.

b est une constante.

Si V est le volume adsorbé et V_m le volume d'une monocouche, le taux de recouvrement θ vaut V/V_m et on peut dès lors écrire :

$$\frac{P}{V} = \frac{P}{V_m} + \frac{b}{V_m}$$

En dressant le graphique de P/V en fonction de P , il est alors possible de déterminer V_m :



Et, connaissant la surface occupée par une molécule d'adsorbat, il est alors possible de calculer la surface spécifique (S_{BET}) du matériau adsorbant :

$$S = A_m \cdot N \cdot \frac{V_m}{V_{STP}}$$

Où N est le nombre d'Avogadro ($6,02 \cdot 10^{23} \text{ mole}^{-1}$).

A_m est la section de la molécule adsorbée ($1,62 \cdot 10^{-19} \text{ m}^2$ pour l'azote (N_2) à 77K).

V_{STP} est le volume occupé par une mole de gaz aux conditions standards de température et de pression ($24790 \text{ cm}^3/\text{mol}$).

L'équation de Langmuir décrit cependant une situation idéale où la surface est homogène, où les molécules n'interagissent pas les unes avec les autres et où celles-ci s'adsorbent en formant une monocouche.

Or, les conditions expérimentales diffèrent quelque peu de cette situation idéale. En effet, l'adsorption de molécules à leur température d'ébullition sur une surface solide se fait en multicouches, ce qui fut pris en considération par Brunauer, Emmet et Teller pour étoffer la théorie de Langmuir (*figure AII.1*).

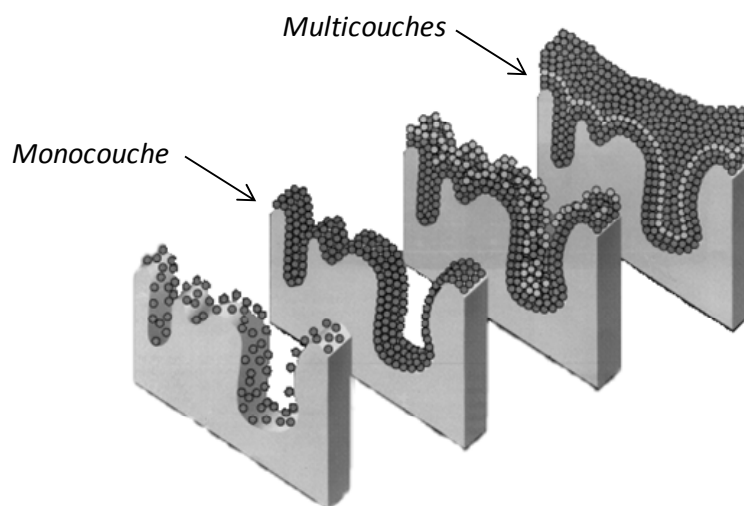


Figure AII.1 : Illustration du phénomène d'adsorption physique d'un gaz sur un matériau poreux.

Après formation de la monocouche, l'adsorption continue en raison des forces de Van der Waals. La chaleur d'adsorption de ces couches supplémentaires correspond à la chaleur de condensation du gaz et reste constante mais diffère de la chaleur d'adsorption de la première couche. La quantité de molécules adsorbées à l'équilibre correspond à la somme des quantités adsorbées à chaque couche et est exprimée par l'équation BET à deux constantes :

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

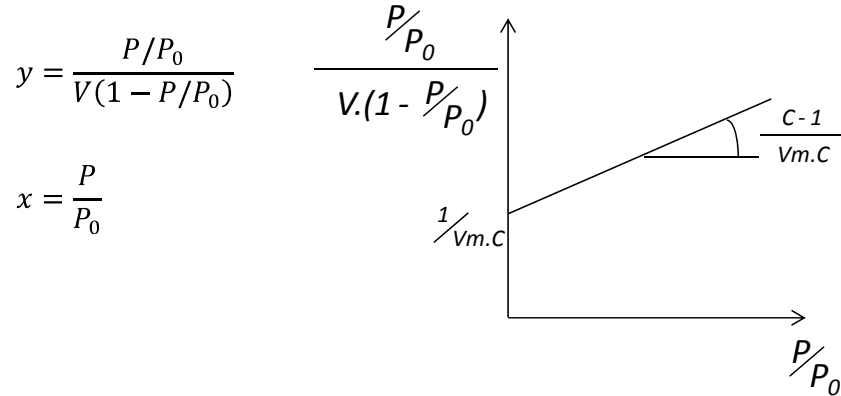
Où P est la pression d'équilibre.

P_0 est la pression de saturation du gaz à une température donnée.

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

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

Cette équation est celle d'une droite où



Où P/P_0 est la pression relative. Via la pente de la droite (A) et son origine à l'ordonnée (B), il est alors possible de retrouver le volume requis pour la formation d'une monocouche :

$$V_m = \frac{1}{A + B}$$

Tout comme avec l'équation de Langmuir, il est alors possible de définir la surface spécifique du matériau poreux de la même manière qu'expliqué précédemment.

L'équation BET est néanmoins limitée à la zone de pression relative comprise entre 0,05 et 0,35. Lorsque la pression relative est inférieure à 0,05, l'équilibre entre l'adsorption et la désorption n'a pas lieu car la vitesse d'adsorption est plus élevée que la vitesse de désorption. Il y a donc une hétérogénéité de surface. Quand cette valeur est supérieure à 0,35, il y a des possibilités de formation de multicouches.

L'analyse d'un matériau par adsorption-désorption d'azote à température constante permet d'obtenir un graphique de la quantité de molécules adsorbées sur la surface du solide en fonction de la pression relative. Ce sont les isothermes d'adsorption, pouvant être divisés en cinq catégories selon l'IUPAC (*figure AII.2*, déjà présentée au *point 3.2.2* et annotée *figure 3.2*). Ces isothermes renseignent sur la porosité du matériau étudié et sur les forces d'interaction entre adsorbat et adsorbant. Pour rappel, l'isotherme de type I, défini par Langmuir, est caractéristique des matériaux microporeux ($d_{\text{pores}} < 2 \text{ nm}$), les isothermes de type II et III représentent

des matériaux macroporeux ($d_{\text{pores}} > 50 \text{ nm}$) et ceux de type IV et V caractérisent les matériaux mésoporeux ($2 \text{ nm} < d_{\text{pores}} < 50 \text{ nm}$).

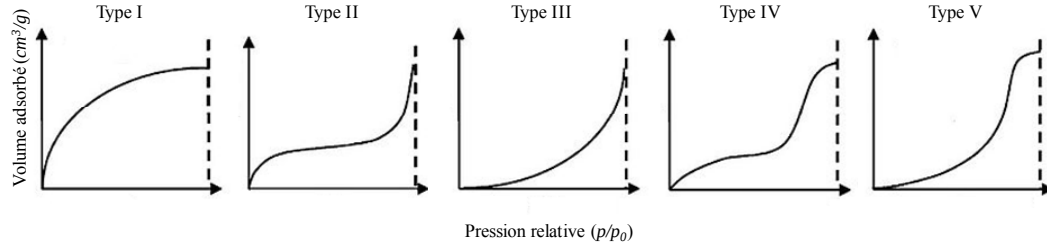


Figure AII.2 : Classification des isothermes selon IUPAC.

Les distinctions entre isothermes de type II et III et entre ceux de type IV et V proviennent des différences d'interactions à faible pression relative. En effet, dans ces zones de P/P_0 , une courbure concave de l'isotherme (types III et V) indique que la chaleur d'adsorption (interaction adsorbat-adsorbant) est supérieure à la chaleur de condensation (interaction adsorbat-adsorbat) alors que c'est l'inverse pour les types II et IV.

Lorsque la pression relative augmente, on passe de la monocouche de Langmuir à la formation de multicouches, qui se superposent jusqu'à former un ménisque concave lorsque les couches opposées finissent par se rejoindre. C'est le phénomène de condensation capillaire. Dans cette situation, les molécules se trouvant dans ce ménisque subissent une force intermoléculaire plus forte que dans la surface plane du même liquide. L'équation de Kelvin, décrivant la condensation d'un gaz à la surface d'un pore cylindrique, permet de montrer que la pression de vapeur au-dessus du ménisque concave doit être supérieure à la pression de saturation P_0 sur une surface plane à la même température. La condensation de vapeur a lieu au niveau de ce ménisque à une pression P fonction du rayon du pore :

$$\ln \frac{P}{P_0} = - \frac{2\gamma V_m}{RT r_k}$$

Où γ est la tension superficielle de l'adsorbat à la température T .

r_k est le rayon de courbure du ménisque.

R est la constante des gaz parfaits.

Le volume du pore sera, de ce fait, progressivement rempli par l'adsorbat condensé. Pour les matériaux microporeux, ce phénomène apparaît très rapidement, dû à la très faible taille de pores. Au-delà de la pression de condensation capillaire, on observe une saturation des pores en adsorbat, représentée par un plateau sur les isothermes. Ce plateau de saturation est également présent sur les isothermes des solides mésoporeux mais disparaît sur ceux des matériaux macroporeux, où la condensation capillaire commence très tard en raison de la grande taille de pores et donc de la grande quantité de multicouches nécessaire à la formation du ménisque.

L'application de la loi de Kelvin permet de déterminer la distribution de taille de pores du matériau analysé. Dans l'expression de cette loi, la valeur du rayon de courbure du ménisque (r_k) tient compte des couches d'adsorbat déjà adsorbées à la pression relative de mesure sur la surface du matériau. De ce fait, cette valeur ne représente pas le rayon des pores, qui se retrouverait sous-estimé. Barrett, Joyner et Halenda, qui donnent leur nom à la méthode permettant de déterminer la distribution de taille des pores (méthode BJH), ont remplacé la valeur de r_k dans l'équation de Kelvin par $r_p - t$ où r_p est le rayon réel du pore et t est l'épaisseur de la couche adsorbée à la paroi du pore avant la condensation capillaire, valant :

$$t = 0,43 \left(\frac{5}{\ln(P/P_0)} \right)^{1/3}$$

Cette relation entre la pression relative à laquelle a lieu la condensation capillaire et le rayon des pores et la théorie BET, reliant la pression relative et le volume adsorbé permettent d'avoir accès à la distribution de taille de pores via la dérivée du volume adsorbé par rapport au diamètre poreux (dV/dP) en fonction de la taille des pores.

En toute logique, les courbes d'adsorption et de désorption devraient se superposer sur les isothermes, permettant de mesurer V_m aussi bien lors de l'adsorption que lors de la désorption. Or, il est généralement observé un décalage au niveau de la pression relative de condensation capillaire, nommé boucle d'hystérésis. A ce jour, diverses explications à ce phénomène furent proposées mais aucune n'est unanimement validée.

Annexe III

Liste des publications relatives à cette thèse

1. **Whole-cell based hybrid materials for green energy production, environmental remediation and smart cell-therapy**

Chemical Society Reviews, 2011, **40**, 860-885.

A. Léonard, P. Dandoy, E. Danloy, G. Leroux, C.F. Meunier, J.C. Rooke, B.-L. Su

2. **A hybrid assembly by encapsulation of human cells within mineralised beads for cell therapy**

PLoS One, 2013, **8**(1), e54683, DOI: 10.1371/journal.pone.0054683.

P. Dandoy, C.F. Meunier, G. Leroux, V. Voisin, L. Giordano, N. Caron, C. Michiels, B.-L. Su

3. **Design of hybrid alginate@TiO₂ microcapsules as a reservoir of animal cells and drug delivery system for cell therapy**

Journal of Materials Chemistry B (submitted).

G. Leroux, C.F. Meunier, C. Michiels, B.-L. Su

Authors' contributions

GL carried out the experiments and drafted the manuscript. CFM participated in the design and coordination of the study. CM and BLS conceived of the study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

4. **Alginate-based hybrid materials as an “artificial organ” model: *in vivo* biocompatibility study and evaluation of entrapped human cell immune-isolation**

Submitted soon.

G. Leroux, C.F. Meunier, V. Voisin, I. Habsch, N. Caron, C. Michiels, B.-L. Su

Authors' contributions

GL and CFM carried out the experiments. GL drafted the manuscript. VV and IH helped to carry out parts of experiments. CFM and NC participated in the design and coordination of the study. CM and BLS conceived of the study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

5. **Encapsulation of beta INS-1E cells in alginate@TiO₂ microcapsules for the controlled delivery of insulin**

Submitted soon.

G. Leroux, C.F. Meunier, C. Michiels, B.-L. Su

Authors' contributions

GL carried out the experiments and drafted the manuscript. CFM participated in the design and coordination of the study. CM and BLS conceived of the study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

