



HAL
open science

Etude des écoulements et des transferts de masse dans différentes géométries de foie bioartificiel

Aude Marion Gautier

► **To cite this version:**

Aude Marion Gautier. Etude des écoulements et des transferts de masse dans différentes géométries de foie bioartificiel. Sciences de l'ingénieur [physics]. Université de Technologie de Compiègne, 2008. Français. NNT: . tel-00360206

HAL Id: tel-00360206

<https://theses.hal.science/tel-00360206>

Submitted on 10 Feb 2009

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

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



**UNIVERSITE DE TECHNOLOGIE DE COMPIEGNE
ECOLE DOCTORALE**

Doctorat

Bio-Ingénierie, Biomécanique, Biomatériaux

AUDE GAUTIER

Etude des écoulements et des transferts de masse
dans différentes géométries de foie bioartificiel

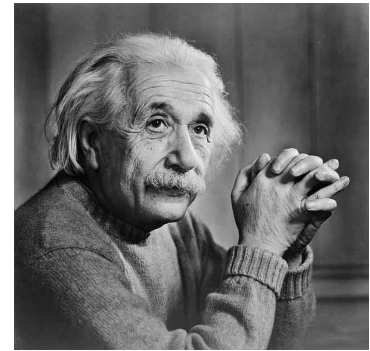
Thèse dirigée par Cécile Legallais et Aïssa Ould-Driss

Soutenue le 6 novembre 2008

Jury :

Mme	M. DUFRESNE (Examineur)
Melle	C. LEGALLAIS (Co-directeur de thèse)
Mme	A. MARC (Rapporteur)
M.	A. OULD - DRIS (Co-directeur de thèse)
Mme	C. SELDEN (Examineur)
Mme	C. WANDREY (Rapporteur)
M.	A. WERYNSKI (Examineur)

« A la lumière de la connaissance, l'heureux résultat semble presque aller de soi ; tout étudiant (...) peut l'appréhender sans trop de difficulté. Mais les longues années de tâtonnements, de recherches dans le noir, avec leur lancinante tension, l'alternance des périodes de confiance et de découragement, puis finalement la sortie vers la lumière, seuls ceux qui ont éprouvé cela peuvent le comprendre. »



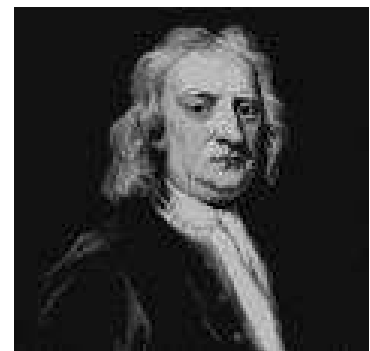
A. EINSTEIN

« Il est certain que l'humanité a besoin des gens pratiques qui travaillent surtout afin d'atteindre leurs propres buts, bien qu'ils se souviennent aussi des besoins de la totalité. Or elle a besoin aussi des rêveurs dont les aspirations désintéressées au but sont si intenses qu'ils ne sont capables de faire attention à leur propre profit matériel. »



M. CURIE

« C'est en me hissant sur les épaules de géants que je suis parvenu à voir plus loin. »



I. NEWTON

Remerciements

Tout d'abord, je remercie Cécile Legallais pour avoir réussi à me trouver un financement pour pouvoir réaliser cette thèse. Ensuite, je tiens à la remercier pour sa motivation, sa volonté d'aller de l'avant et pour son dévouement. Je lui suis sincèrement reconnaissante de m'avoir permise de participer à de nombreux congrès et à des missions scientifiques qui m'ont ouvert l'esprit vers d'autres approches scientifiques et travailler avec des experts internationaux renommés dans le domaine des Organes Artificiels. Elle a su me laisser une certaine autonomie en restant toujours à mon écoute et gardant confiance en tout ce que j'entreprenais.

Je remercie Aïssa Ould-Dris pour son aide incontournable sur le développement de modèles mathématiques afin de mieux appréhender les transferts de masse.

Je remercie Murielle Dufresne pour m'avoir encadrée, soutenue et aiguillée, pendant ces trois années, sur l'aspect biologique de ce travail avec beaucoup de patience et de détermination.

Je remercie les membres du jury d'avoir été présents à ma soutenance et pour leur participation à la discussion enrichissante à l'issue de ma présentation. Je tiens à remercier M. Werynski pour avoir accepté de présider le jury et d'avoir fait un aussi long trajet depuis la Pologne. Je joins à ces remerciements, Mme Marc et Mme Wandrey, pour leur participation à l'évaluation de ce travail en tant que rapporteurs. Je souhaite également exprimer ma reconnaissance à Mme Selden, pour sa présence en tant qu'examineur.

Je remercie également le Centre National de la Recherche Scientifique et la Région Picardie pour avoir soutenu ce projet pendant ces trois années.

Je remercie mes collègues de laboratoire pour leur contribution à la bonne ambiance du laboratoire ;-) et leurs fous rires contagieux : Eric Leclerc, Benoît Carpentier, Régis Baudoin, Zaher Kharboutly, Magali Bartkowski, Jean-Matthieu Prot, Leila Choucha-Snouber, Silvia Perrone et Steffy Demming.

Je remercie Patrick Paullier pour tous ses conseils avisés aussi bien scientifiques qu'au niveau de la vie en société remplis de sagesse et d'expériences vécues.

Je remercie également pour leurs conseils et leur aide précieuse, mes collègues « de couloir » de l'équipe de Mme Nagel : Pascale Vigneron, Elodie Velzenberger, Oumou Goundiam, Jean-Luc Duval et Liliane Petitjean.

Pour l'aspect administratif concernant les missions, la pédagogie et le suivi du doctorat, je remercie sincèrement Clotilde Vanhoutte, Chantal Guilbert, Catherine Lacourt, Marie-José Fleury du laboratoire Biomécanique et Bio-Ingénierie, Martine Marchandise, Marie Lotiquet, Pascale Accard, Nathalie Barrast, Odile Leclerc, Martine Drewniak et leur directrice Chantal Pérot de l'Ecole Doctorale sans oublier les secrétaires du département du Génie Biologique, Marie-Christine Guyard et Myriam Sawezyn.

Je remercie M. Lemke et M. Von Harten de la société Membrana GmbH, pour leur écoute et leurs nombreux conseils sur l'étude des membranes sous forme de fibres creuses utilisées dans ce projet.

Je tiens à remercier Docteur Delavenne et Docteur Sanchez de l'Hôpital de Compiègne pour avoir accepté d'effectuer les tests d'alpha-foetoprotéine et de lactate sur mes échantillons pendant ces trois années et de m'accueillir à chaque fois avec une grande gentillesse.

Pour l'acquisition des images au microscope environnemental de haute qualité, je remercie Frédéric Nadaud du Service Analyse Physico-Chimique pour son aide précieuse ainsi que Alain Le Verger pour les problèmes informatiques qu'il a su résoudre avec rapidité et efficacité.

Je remercie M. Lecoester, de l'URISP, pour m'avoir également soutenue pour l'obtention de cette bourse de thèse et qui a toujours répondu présent quand j'avais besoin d'une aide.

Au final, il me reste à remercier toute ma famille et mes amis proches pour leur soutien pendant toutes ces années : mes parents, mes frères, mes grands-parents avec une pensée plus particulière à mon mari Cyrille et à mon petit garçon Thomas. Merci pour vos encouragements et d'avoir toujours été à mes côtés...

Aude GAUTIER

Novembre 2008

INTRODUCTION.....	8
CHAPITRE I. LA SUPPLEANCE HEPATIQUE.....	9
A. <i>Introduction.....</i>	9
B. <i>Le foie.....</i>	10
1. L'anatomie du foie.....	10
2. Les fonctions du foie.....	12
a. Fonction endocrine.....	13
b. Traitement des déchets organiques.....	14
c. Sécrétion biliaire.....	15
3. Les pathologies du foie et leur traitement.....	15
C. <i>La transplantation et ses limites.....</i>	17
D. <i>La suppléance hépatique.....</i>	21
1. Le foie artificiel.....	21
2. Le foie bioartificiel.....	29
E. <i>Synthèse.....</i>	51
F. <i>Mise en place du projet.....</i>	52
CHAPITRE II. LE BIOREACTEUR A LIT FLUIDISE UTILISANT L'ENCAPSULATION.....	54
A. <i>Introduction.....</i>	54
B. <i>Optimisation de l'encapsulation et caractérisation des transferts de masse.....</i>	56
1. Impact du type d'alginate et du diamètre des billes sur les transferts de masse et les activités métaboliques des cellules C3A encapsulées en vue d'une application à un foie bioartificiel.....	56
a. Introduction.....	59
b. Materials and methods.....	62
c. Results.....	68
d. Discussion.....	76
e. Conclusion.....	78
f. Acknowledgement.....	78
g. References.....	79
2. Effet d'une nouvelle technique d'encapsulation basée sur un champ électrostatique.....	83
a. Introduction.....	83
b. Matériels et méthodes.....	83
c. Etude de faisabilité : mise au point de la technique et résultats préliminaires.....	84
d. Culture des C3A en billes d'alginate sur du long-terme.....	89
C. <i>Modélisation mathématique des transferts de masse.....</i>	93
a. Introduction.....	94
b. Materials and methods.....	96
c. Results.....	102
d. Discussion.....	109
e. Conclusions.....	111
f. References.....	112
D. <i>Synthèse partielle.....</i>	116
CHAPITRE III. LE BIOREACTEUR A AIRLIFT UTILISANT L'ENCAPSULATION.....	118
CHAPITRE IV. LE MICROBIOREACTEUR A FIBRES CREUSES.....	129
a. Introduction.....	131
b. Materials and methods.....	135
c. Results.....	143
d. Discussion.....	156
e. Conclusions.....	159
f. Acknowledgements.....	160
g. Appendix.....	161
h. References.....	162
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	165
REFERENCES.....	169
ANNEXES.....	184
ANNEXE 1 : MATERIEL ET METHODES DETAILLES.....	184
<i>Culture cellulaire.....</i>	184
<i>Protocole de culture des C3A en billes d'alginate et mise en perfusion en bioréacteur à lit fluidisé (valable pour une flasque T75).....</i>	184
<i>Protocole de culture des C3A en minimodule à fibres creuses et mise en circuit des minimodules (valable pour une flasque T75).....</i>	188
<i>Dosages.....</i>	190
<i>Evaluation de la viabilité cellulaire.....</i>	195
ANNEXE 2 : ARTICLE SUPPLEMENTAIRE.....	196

Introduction

Le foie est un organe dont l'implication est majeure dans le maintien de l'homéostasie en raison du nombre et de l'importance des fonctions métaboliques qu'il possède. De nombreuses pathologies sont susceptibles de provoquer une perte fonctionnelle pouvant remettre en cause le pronostic vital du patient. Dans les cas d'hépatite aiguë voire fulminante ou de décompensation aiguë d'une pathologie chronique, le seul traitement disponible à l'heure actuelle est la transplantation hépatique. Cependant, en raison du manque de greffons et du nombre de personnes inscrites sur liste d'attente, des systèmes transitoires extracorporels de suppléance sont mis au point afin de permettre l'attente de la greffe ou la régénération du foie et le rétablissement des fonctions hépatiques du patient.

Des foies purement artificiels ont été développés ces dernières années, cependant, ces systèmes ont le désavantage de ne pouvoir que les fonctions de détoxification. L'idée d'un foie bioartificiel utilisant les fonctionnalités des hépatocytes (cellules majoritaires du tissu hépatique) dans un bioréacteur a alors germé. Différentes géométries sont à l'heure actuelle étudiées, à des stades plus ou moins avancés.

Au sein de l'UMR CNRS 6600, des chercheurs travaillent depuis plusieurs années sur l'élaboration, l'évaluation et le perfectionnement de systèmes de foie bioartificiel hébergeant des cellules hépatiques d'origine humaine, C3A, encapsulés dans des billes d'alginate.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes tout d'abord concentrés sur l'optimisation du système de foie bioartificiel à lit fluidisé, en caractérisant différents paramètres liés à l'encapsulation des hépatocytes. Puis, nous avons abordé d'autres géométries de bioréacteurs : la première étant un nouveau bioréacteur de type « airlift », la seconde étant une géométrie plus classiques à fibres creuses, mais étudiée avec le point de vue du bio-ingénieur.

CHAPITRE I. LA SUPPLEANCE HEPATIQUE

A. Introduction

Le foie humain est un organe pesant environ 1,5 kg et remplissant de multiples fonctions. Les hépatocytes (composant les 2/3 de la population cellulaire) jouent un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie, grâce à leurs fonctions complexes de détoxication, de transformations et de synthèses...

Toute maladie altérant celui-ci aura des conséquences graves pour le patient. Dans les cas les plus sérieux, la greffe est actuellement le seul traitement disponible, mais présente un certain nombre de limites : pénurie de greffons (en 2006, 1693 personnes en attente et 1024 transplantations), opération chirurgicale risquée, traitement immunosuppresseur lourd.

Des systèmes bioartificiels de suppléance transitoire sont actuellement à l'étude, pour permettre au patient d'attendre, soit une greffe, soit la régénération de son propre foie, une fois les agents toxiques éliminés. Ces dispositifs reposent sur l'utilisation de cellules fonctionnelles dans un environnement adapté et placées dans un circuit extracorporel. Si certains essais cliniques paraissent encourageants, on observe à l'heure actuelle leurs limites, puisque l'application directe à l'homme ne permet pas de comprendre le fonctionnement, les apports et les limites des différents bioréacteurs développés. Dans ce chapitre, nous récapitulerons brièvement, dans un premier temps, les caractéristiques du foie en trois parties : son anatomie, ses fonctions et enfin les pathologies entraînant son dysfonctionnement. Puis dans un second temps, nous décrirons les traitements actuels, à savoir tout d'abord la transplantation puis les dispositifs de suppléance actuellement disponibles ou au stade expérimental.

B. Le foie

1. L'anatomie du foie

Le foie, le plus volumineux viscère du corps humain, est un organe vital qui assure de nombreuses fonctions au sein de l'organisme. Il est situé dans la partie supérieure droite de la cavité abdominale, dans la zone correspondant à l'hypocondre droit, occupant ainsi une partie de l'épigastre, en avant de l'estomac. Vue de l'extérieur, sa surface a un aspect granuleux et une couleur rouge sombre, et présente dans sa partie antérieure deux segments bien différenciés par l'insertion du ligament suspenseur qui le relie au diaphragme : le lobe gauche et le lobe droit (figure 1). Le foie est enveloppé sur presque toute sa surface par le péritoine abdominal et il se trouve sous une capsule de tissu fibreux nommée capsule de Glisson, qui le recouvre dans sa totalité (Benhamou *et al.*, 2008 et Paez *et al.*, 2000).

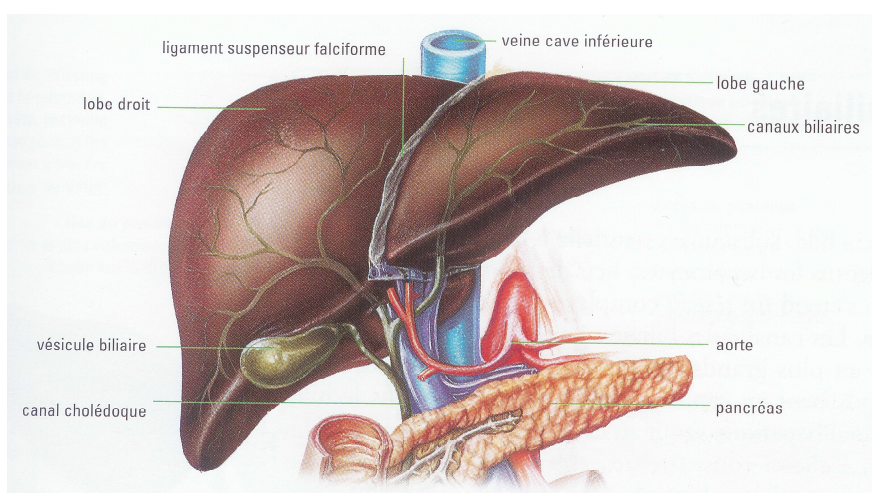


Figure 1 Représentation d'une vue antérieure du foie (Paez *et al.*, 2000)

Le foie est abondamment vascularisé, à la fois par l'artère hépatique et par la veine porte, qui y pénètrent toutes deux au niveau du hile. Il est alimenté en sang oxygéné par l'artère hépatique qui fournit 20% du sang. Il reçoit également 80 % du sang chargé de substances nutritives en provenance des autres organes du système digestif par la veine porte (Whitfield *et al.*, 1996). Tout le sang traité par le foie est drainé par la veine hépatique et rejoint la circulation via la veine cave (figure 2).

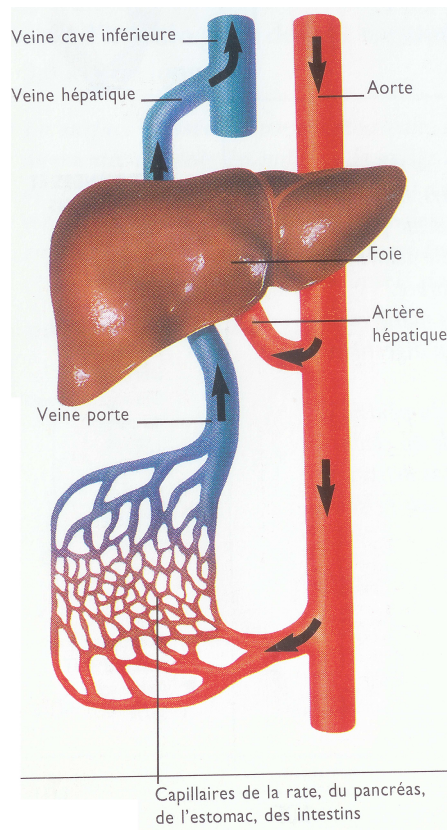


Figure 2 Schéma de la vascularisation hépatique (Whitfield *et al.*, 1996)

Le foie est composé de lobules hépatiques hexagonaux qui constituent les unités fonctionnelles élémentaires (figure 3). Chaque lobe du foie se compose de milliers de lobules, constitués de cellules hépatiques (hépatocytes) disposées de façon radiale à partir de la veinule centrale en direction de la périphérie du lobule. Les hépatocytes sont disposés en rangées irrégulières rayonnant à partir d'une veinule centrale où aboutissent les sinusoides, qui les entourent de sang. Ces cellules sont alimentées en sang par des branches de l'artère hépatique et de la veine porte, auxquelles s'ajoute un réseau vasculaire de sinusoides. Ce sang provient d'une branche de la veine porte et, après avoir traversé le lobule, il est drainé par une branche de la veine hépatique. Le sang circule autour des hépatocytes des espaces portes en direction des veinules centrales. Le trajet de la bile se fait dans la direction opposée. Les canalicules biliaires sont formés par l'alignement des hépatocytes et dirigent la bile sécrétée à leur niveau vers la périphérie du lobule où elle se déverse dans des conduits biliaires plus gros, les conduits biliaires interlobulaires. La bile chemine ensuite vers les conduits hépatiques communs droit et gauche et le canal cholédoque.

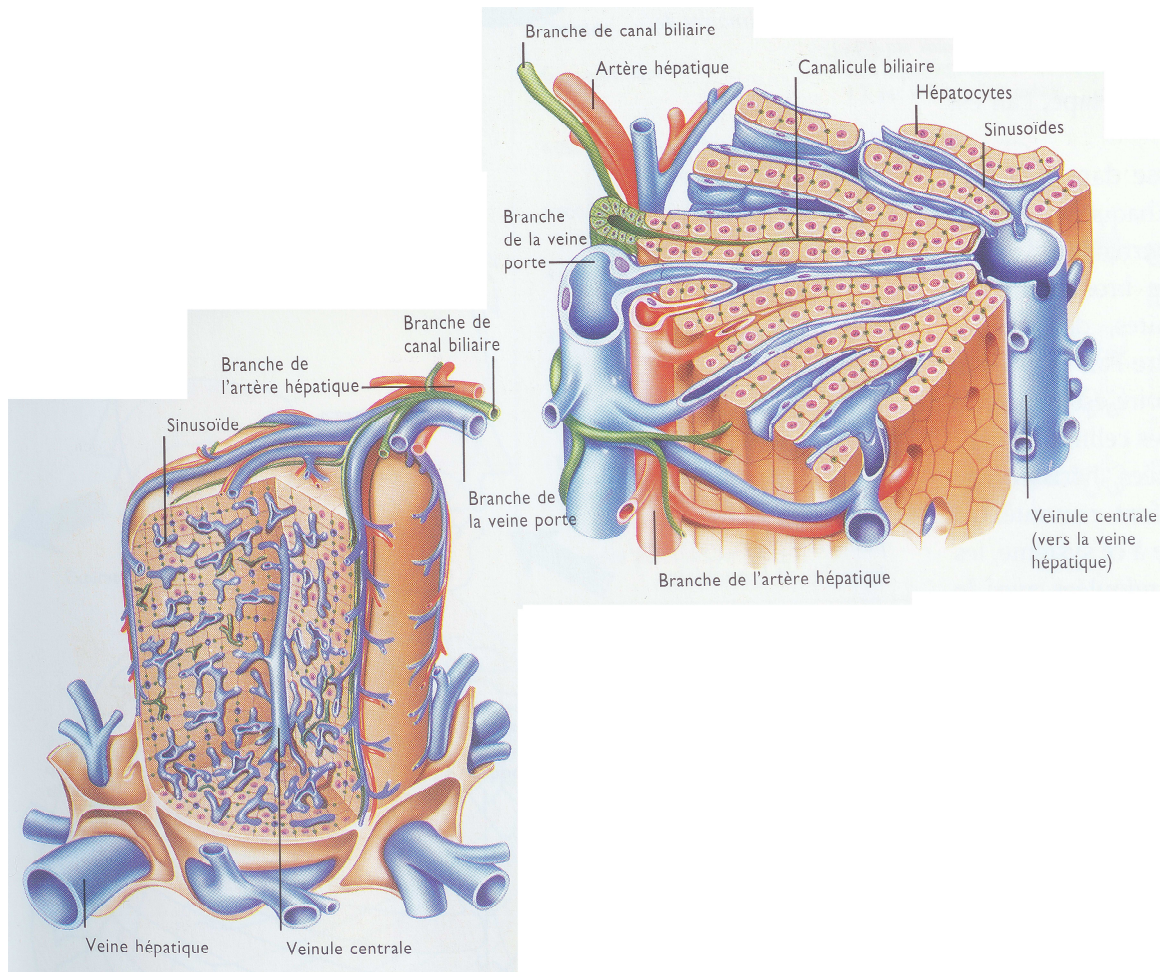


Figure 3 Schéma du lobule hépatique (à gauche) et sa coupe (à droite) (Whitfield *et al.*, 1996)

Le foie est composé de quatre types cellulaires essentiellement. Tout d'abord, les hépatocytes, cellules polyédriques de 20 à 30 μm de diamètre, qui réalisent la majeure partie des fonctions métaboliques. Le foie normal contient environ 100 milliards d'hépatocytes. Ces cellules occupent environ 80% du volume du foie (11000 μm^3). Elles sont délimitées par une membrane cellulaire qui présente d'abondantes microvillosités. Les trois autres types cellulaires sont les cellules épithéliales des canaux biliaires qui sécrètent la bile, les cellules endothéliales situées au niveau de l'intima des vaisseaux et, enfin, les cellules de Kupffer, qui sont des macrophages accrochés à la face luminale des cellules endothéliales au niveau des sinusoides (Benhamou *et al.*, 2008).

2. Les fonctions du foie

Cette partie énumérant les différentes fonctions du foie s'appuie sur l'ouvrage Physiologie humaine écrit par Guénard *et al.*, (1996).

a. Fonction endocrine

Le foie occupe une position centrale dans le métabolisme de l'organisme : les nutriments apportés par la veine porte sont stockés ou transformés par le foie avant d'être redistribués aux autres organes en fonction des besoins.

A) Hydrates de carbone

Le foie est l'organe principal du maintien de l'homéostasie glucidique. En fonction des repas et des besoins de l'organisme, il peut stocker le glucose ou le redistribuer vers les autres organes. La mise en réserve du glucose se fait dans l'hépatocyte sous forme de glycogène stocké dans le cytoplasme. Au niveau des hépatocytes péri-portaux, le glucose utilisé pour la synthèse de glycogène est fabriqué dans la cellule à partir de sources non glucidiques comme le lactate, les acides gras, et les acides aminés. A l'inverse, la synthèse de glycogène dans les hépatocytes péri-hépatiques (également appelés centrolobulaires, c'est-à-dire ceux situés près des veinules hépatiques, à la sortie des sinusoides) est réalisée à partir du glucose présent dans les sinusoides. Ces hépatocytes possèdent également une activité de glycolyse. Ainsi, le métabolisme glucidique assuré par le foie est rapidement régulé en fonction de la glycémie. Le métabolisme hépatique des hydrates de carbone est contrôlé par des hormones pancréatiques (insuline et glucagon), par le système nerveux autonome et par la concentration en glucose des sinusoides.

B) Protéines

Le foie joue un rôle essentiel dans la synthèse de nombreuses protéines. La plupart des protéines plasmatiques sont synthétisées par le foie : quantitativement, l'albumine est le principal produit de la synthèse protéique hépatocytaire. L'albumine assure le maintien de la pression oncotique plasmatique, et sert de molécule de liaison et de transport pour de nombreuses petites molécules. Les protéines de l'hémostase y sont également synthétisées : le fibrinogène, les facteurs du complexe prothrombinique (II, V, VII, IX, X).

C) Lipides

Le foie joue un rôle fondamental dans l'homéostasie du cholestérol et des triglycérides. C'est le principal organe de synthèse et d'élimination du cholestérol. Cette molécule provenant d'autres organes est capté par l'hépatocyte par des récepteurs spécifiques des LDL (Low Density Lipoprotein) et peut être mis en réserve dans les membranes. Enfin le cholestérol est éliminé de l'organisme dans la bile.

b. Traitement des déchets organiques

Le foie participe à la biotransformation et à l'élimination de nombreux déchets organiques d'origine endogène, et de certaines substances d'origine exogène (toxines et médicaments), les xénobiotiques.

A) Catabolisme protéique

Le foie est le site essentiel du métabolisme de l'ammoniaque, principal déchet toxique résultant du catabolisme des protéines. Les hépatocytes péri-portaux captent l'ammoniaque et le transforment en urée, qui est ensuite éliminée par les reins. Ce système permet la transformation de la majeure partie de l'ammoniaque. Seuls les hépatocytes péri-hépatiques possèdent l'enzyme glutamine synthase permettant la transformation de l'ammoniaque en glutamine : l'affinité élevée de la glutamine synthase pour son substrat permet la détoxification de l'ammoniaque non métabolisé par les hépatocytes périportaux.

B) Acides biliaires

Le foie joue un rôle clé dans le métabolisme des acides biliaires : synthèse à partir du cholestérol, élimination dans la bile, et captation des acides biliaires présents dans la circulation sanguine après leur réabsorption intestinale. Chez l'homme, il existe trois types principaux d'acides biliaires :

- les acides biliaires primaires qui sont synthétisés par l'hépatocyte à partir du cholestérol
- les acides biliaires secondaires qui sont synthétisés à partir des acides primaires
- les acides biliaires tertiaires, peu importants quantitativement, qui sont synthétisés à partir des acides secondaires

C) Métabolisme de la bilirubine

La bilirubine est le produit de dégradation de l'hème : 80% de la bilirubine proviennent de l'hémoglobine libérée par le vieillissement des globules rouges ; les 20% restants proviennent d'autres hémoprotéines comme la myoglobine, les cytochromes tissulaires. La bilirubine est insoluble dans l'eau : la bilirubine libre est transportée dans le plasma essentiellement par l'albumine. Au niveau hépatique, la bilirubine est captée par des récepteurs situés sur le pôle sinusoïdal des hépatocytes : cette liaison bilirubine-récepteurs s'accompagne de la libération dans le sinusoïde de l'albumine transporteuse.

D) Métabolisme des xénobiotiques

Les toxines et les médicaments doivent être éliminés de l'organisme pour éviter leur accumulation toxique. La plupart des xénobiotiques hydrosolubles sont éliminés par les reins. En revanche, les substances liposolubles doivent être rendues hydrosolubles pour permettre leur élimination. Ces modifications sont surtout réalisées par le foie, et à un moindre degré par d'autres organes (poumon, reins, intestin).

c. Sécrétion biliaire

La bile représente la sécrétion exocrine du foie : c'est une solution aqueuse contenant des électrolytes et des substances organiques. Parmi elles, on retrouve principalement les acides biliaires, le cholestérol et les phospholipides. La bile fabriquée par les hépatocytes est secrétée dans les canalicules puis modifiée dans les canaux biliaires.

3. Les pathologies du foie et leur traitement

Le foie est ainsi responsable d'une multitude de fonctions cruciales pour le maintien de l'homéostasie, les deux principales étant la purification du sang et la synthèse de protéines. Lorsque le foie est endommagé, par atteinte virale ou en raison d'une consommation abusive d'alcool par exemple, ces fonctions peuvent être compromises.

Les principales affections sont représentées par les hépatites (hépatites virales aiguë et chronique, hépatite alcoolique aiguë, hépatites médicamenteuses), les tumeurs hépatiques (bénignes, malignes, primaires ou secondaires), la péri-hépatite, le syndrome de Budd-Chiari aigu dû à l'obstruction des veines sus-hépatiques, la thrombose portale, la pyléphlébite, l'obstruction de l'artère hépatique et la cholestase (Polson *et al.*, 2005).

Ces affections peuvent entraîner des insuffisances hépatiques. Il en existe deux types : l'insuffisance hépatique aiguë et la décompensation d'insuffisance hépatique chronique. Les insuffisances aiguës peuvent être d'origine toxique, virale ou ischémique (Holt, 1999) et s'accompagnent d'une perte massive d'hépatocytes chez des individus préalablement sains. La forme la plus sévère est l'insuffisance hépatique fulminante. Les décompensations d'insuffisance chronique sont dues à un facteur précipitant compliquant une maladie préexistante du foie (Tan, 2004).

L'insuffisance hépatique aiguë est un syndrome clinique rare dans lequel les fonctions majeures de détoxification et de synthèse du foie sont rapidement détériorées à des degrés

divers pouvant entraîner des complications sévères telles qu'une encéphalopathie hépatique, un ictère, des troubles de la coagulation, une hypercholestérolémie, la formation d'ascite, une insuffisance rénale et des désordres immunitaires (Tan, 2004 ; Zhou *et al.*, 2004).

Cette maladie est associée à une forte morbidité et à une forte mortalité en absence de transplantation, le taux de mortalité pouvant varier entre 10 et 90% selon l'étiologie et les conditions cliniques (Zhou *et al.*, 2004).

L'insuffisance hépatique résulte en une élévation des taux sanguins plasmatiques de nombreuses substances comme la bilirubine, l'ammoniaque, le lactate, les acides gras libres et les acides aminés aromatiques. Parmi ces substances toxiques, l'ammoniac et la bilirubine semblent jouer un rôle central dans les manifestations cliniques de l'encéphalopathie hépatique (Tan, 2004). L'accumulation de ces substances peut être à l'origine de troubles cardiovasculaires, rénaux et cérébraux. De plus, ces toxines sont susceptibles d'endommager le foie lui-même par une apoptose et une nécrose hépatocellulaire, créant ainsi un cercle vicieux qui doit être combattu (Stange *et al.*, 2000).

Le traitement de référence de l'insuffisance hépatique repose sur un traitement symptomatique des manifestations pathologiques et des complications afin de permettre au foie de commencer à se régénérer ou l'attente d'un greffon (Highleyman, 2004). A terme, le seul traitement efficace en cas d'insuffisance hépatique sévère reste la transplantation.

C. La transplantation et ses limites

En France, cette activité est régulée par l'Agence de la biomédecine, créée en 2005, et qui a repris l'ensemble des activités de l'Établissement français des Greffes en matière de prélèvement et de greffe. Elle a pour missions, entre autres, de gérer la liste nationale des personnes en attente de greffe et le registre national des refus de prélèvement, de coordonner les prélèvements d'organes, de répartir et attribuer les greffons et d'évaluer les résultats.

En 2006, 1 037 greffes de foie ont été réalisées ce qui représente une augmentation de 1 % par rapport à 2005, dont 36 à partir de greffons prélevés sur des donneurs vivants. Les greffes à partir de donneurs décédés augmentent de 3 %, mais celles utilisant des greffons prélevés sur donneurs vivants diminuent de 29 %. Le nombre de malades inscrits sur liste d'attente a augmenté de 6 % (1 788 malades inscrits en 2006, dont 1 302 nouveaux inscrits). La durée médiane d'attente était de 3,7 mois pour les malades inscrits entre 2003 et 2006, et elle reste stable depuis 1999, avec des disparités importantes de 2 à 8 mois selon les équipes.

L'incidence des décès des patients en attente de greffe hépatique a augmenté en 2006 après une diminution amorcée en 2003. Elle est de 297 décès pour 1000 patients par an, qui est le taux le plus élevé depuis 1998. Les modalités d'attribution des greffons hépatiques ont été modifiées en 2007, et permettent de greffer en priorité les malades les plus sévèrement atteints. L'objectif est de diminuer les risques de décès des patients sur liste d'attente et d'assurer ainsi une meilleure équité dans la répartition des greffons (Pessione *et al.*, 2007).

En France comme ailleurs, l'offre de greffons reste inférieure aux besoins même si l'activité de prélèvement et de greffe continue d'augmenter significativement. Les maladies hépatiques touchent toutes les classes d'âge mais surtout les personnes de 16 à 65 ans et en particulier les hommes (tableau 1).

	Greffons hépatiques en 2006		Malades en attente au 1 ^{er} janvier 2006		Nouveaux malades inscrits en 2006		Malades greffés en 2006		Malades décédés en 2006	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Age										
0-15 ans	38	3,7	39	8	77	5,9	73	7	4	3,3
16-45 ans	426	41,1	143	29,4	311	23,9	261	25,2	28	23
46-55 ans	212	20,4	159	32,7	422	32,4	322	31,1	46	37,7
56-65 ans	153	14,8	120	24,7	408	31,3	312	30,1	36	29,5
> 65 ans	208	20,1	25	5,1	84	6,5	69	6,7	8	6,6
[m ± ds*, ans]	47,6	18,4	46,4	16,2	48,8	15,5	48,1	16,1	50	13,6
Sexe										
Homme	583	56,2	325	66,9	895	68,7	697	67,2	93	76,2
Femme	454	43,8	161	33,1	407	31,3	340	32,8	29	23,8

Tableau 1 Caractéristiques démographiques des donneurs de foie et des malades inscrits en liste d'attente de greffes de foie en 2006 (Agence de la biomédecine, 2007)

Les patients atteints d'une cirrhose alcoolique représentent la majeure partie des personnes en attente d'une transplantation. La cirrhose post-hépatique C et le carcinome hépatocellulaire sont les deux autres populations les plus nombreuses à être dans le même cas. D'année en année, le nombre de personnes inscrites sur la liste d'attente d'une greffe ne cesse d'augmenter (tableau 2) et le nombre de patients qui décèdent également (figure 4).

Indication	2001			2002			2003			2004			2005			2006		
	n	%	pmh	n	%	pmh	n	%	pmh	n	%	pmh	n	%	pmh	n	%	pmh
Cirrhose alcoolique	274	26	4,5	334	32	5,5	315	29	5,1	366	32	5,9	342	28	5,5	357	27	5,8
Cirrhose post-hépatite (B, C ou D)																		
Cirrhose post-hépatite C	174	17	2,9	155	15	2,5	162	15	2,6	198	17	3,2	161	13	2,6	173	13	2,8
Cirrhose post-hépatite B ou B + D	61	6	1	54	5	0,9	40	4	0,7	48	4	0,8	54	4	0,9	45	3	0,7
Tumeur hépatique																		
Carcinome hépatocellulaire	141	13	2,3	133	13	2,2	159	15	2,6	151	13	2,5	194	16	3,1	242	19	3,9
Autre tumeur maligne	18	2	0,3	9	1	0,1	11	1	0,2	11	1	0,2	16	1	0,3	17	1	0,3
Autre tumeur bénigne	5	0	0,1	1	0	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	3	0	0
Déréalisation hépatite aiguë ou suraiguë																		
Hépatite fulminante	62	6	1	48	5	0,8	54	5	0,9	64	6	1	64	5	1	64	5	1
Autre insuffisance hépatite aiguë	6	1	0,1	8	1	0,1	2	0	0	6	1	0,1	8	1	0,1	13	1	0,2
Pathologie biliaire																		
Cirrhose d'origine biliaire	34	3	0,6	28	3	0,5	31	3	0,5	24	2	0,4	22	2	0,4	24	2	0,4
Atrésie des voies biliaires	33	3	0,5	32	3	0,5	37	3	0,6	28	2	0,5	40	3	0,6	39	3	0,6
Cholangite sclérosante	27	3	0,4	20	2	0,3	25	2	0,4	20	2	0,3	31	3	0,5	27	2	0,4
Maladie congénitale des voies biliaires	3	0	0	4	0	0,1	5	0	0,1	3	0	0	5	0	0,1	1	0	0
Autre cause																		
Pathologie métabolique	34	3	0,6	37	4	0,6	56	5	0,9	45	4	0,7	45	4	0,7	56	4	0,9
Cirrhose auto-immune	16	2	0,3	16	2	0,3	13	1	0,2	17	1	0,3	20	2	0,3	20	2	0,3
Autre cause de cirrhose	24	2	0,4	14	1	0,2	22	2	0,4	20	2	0,3	38	3	0,6	30	2	0,5
Autre pathologie	43	4	0,7	59	6	1	46	4	0,8	56	5	0,9	69	6	1,1	57	4	0,9
Re transplantation électorale ou non																		
Re transplantation en urgence	21	2	0,3	28	3	0,5	24	2	0,4	27	2	0,4	41	3	0,7	42	3	0,7
Re transplantation électorale	74	7	1,2	72	7	1,2	90	8	1,5	75	6	1,2	69	6	1,1	92	7	1,5
Total	1 050	100	17,3	1 052	100	17,2	1 093	100	17,8	1 161	100	18,9	1 219	100	19,7	1 302	100	21

Tableau 2 Evolution des inscriptions en liste d'attente de greffe de foie selon l'indication et par million d'habitants (Agence de la biomédecine, 2007)

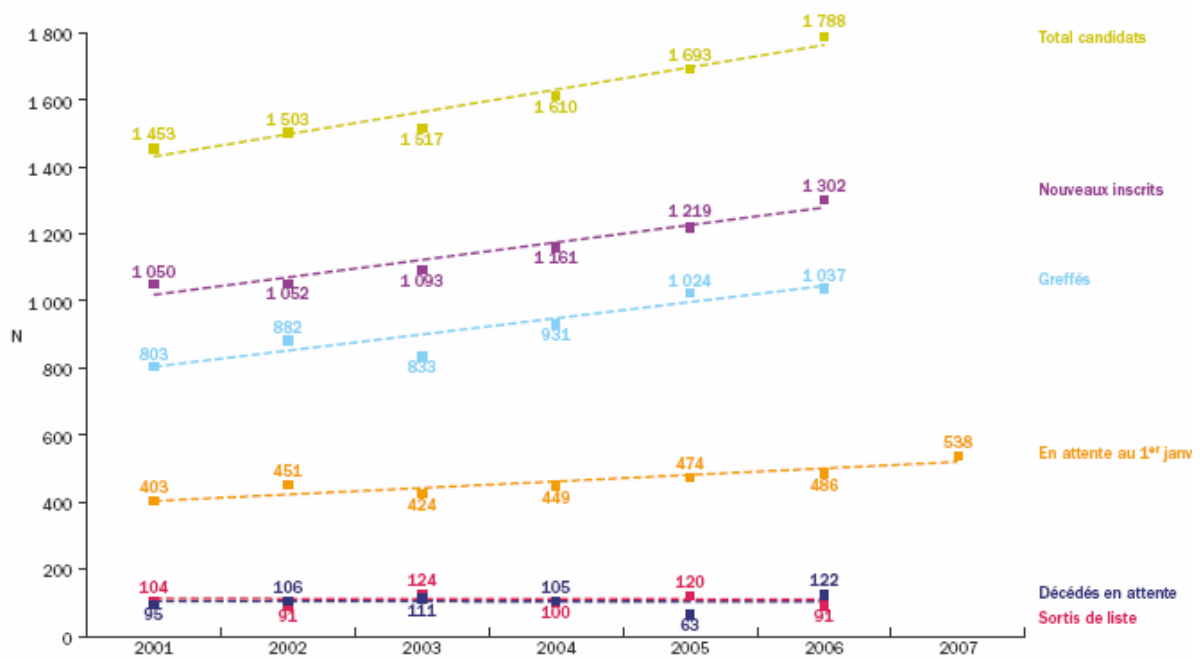


Figure 4 Evolution des inscriptions en liste d'attente de greffe de foie entre 2001 et 2007
(Agence de la biomédecine, 2007)

En raison de la pénurie de greffons, il est important de disposer d'une alternative et de moyens de suppléance hépatique. Des dispositifs extracorporels d'assistance hépatique ont été développés ces dernières années. Ils représentent une option thérapeutique prometteuse pour le traitement des patients souffrant d'insuffisance hépatique sévère (Krisper *et al.*, 2005). Leur objectif est de permettre le rétablissement des activités hépatiques et la régénération du foie dans le meilleur des cas, ou l'attente de greffe. Ils permettent de prendre temporairement en charge une partie des fonctions que le foie n'est plus capable d'assurer (Highleyman, 2004). Ces dispositifs peuvent également être utilisés de façon transitoire en cas de dysfonctionnement du greffon après transplantation hépatique ou lorsqu'une résection hépatique est pratiquée chirurgicalement pour permettre une stabilisation des conditions cliniques du patient (Highlemann, 2004 ; Inderbitzin *et al.*, 2005 ; Koivusalo *et al.*, 2005). Ils sont de deux types : les foies bioartificiels qui utilisent des hépatocytes en culture dans des bioréacteurs afin de fournir à la fois les fonctions de synthèse, d'excrétion et de détoxification et les systèmes purement artificiels dont le principe vise uniquement à assurer la détoxification extracorporelle du sang (Tan, 2004).

D. La suppléance hépatique

Au cours des dernières décennies, de nombreuses méthodes ont été utilisées pour éliminer les toxines du sang, dont les échanges sanguins transfusionnels, la plasmaphérèse et l'hémodialyse. Dans le laboratoire dirigé par Jeffrey Platt (Department of Surgery, The Mayo Fondation, Rochester), une méthode ancienne consistait à faire perfuser un foie porcine entier directement avec le sang du patient. Plus tard, des systèmes totalement artificiels ont été développés, ainsi que des systèmes bioartificiels contenant des cellules hépatiques de lapin, puis de porc et enfin des hépatocytes humains (Highlymann, 2004).

On distingue ainsi deux types de systèmes dévolus à la suppléance hépatique : les systèmes artificiels, dépourvus de cellules et destinés à permettre la détoxification du sang, et les foies bioartificiels qui ajoutent à cette dernière fonction celle de synthèse, offrant ainsi la perspective d'une meilleure efficacité et d'une prise en charge plus globale du problème.

Ces derniers systèmes profitent d'ailleurs actuellement des avancées importantes réalisées en biologie cellulaire et moléculaire et en ingénierie tissulaire (développement des lignées hépatocytaires, stratégies de stabilisation du phénotype hépatocytaire *in vitro*, amélioration du micro-environnement cellulaire dans les bioréacteurs) (Allen *et al.*, 2002).

1. Le foie artificiel

Cette partie traitant les systèmes de suppléance hépatique artificiels s'appuie sur l'article intitulé « The place of adsorption and biochromatography in extracorporeal liver support systems », rédigé par C. Legallais, A. Gautier, M. Dufresne, B. Carpentier et R. Baudoin et publié en 2008 dans le journal *Journal of Chromatography B*, 861, pages 171-176.

Dans cet article, nous rappelons d'abord les exigences que doit remplir un système hépatique artificiel pour pouvoir remplacer un foie défaillant (paragraphe 2) puis le rôle de l'adsorption dans la fonction de détoxification (paragraphe 3). En effet, cette détoxification est assurée par le biais de colonnes d'adsorption plus ou moins spécifiques par échange d'ions et charbon actif. Pour des raisons d'incompatibilité, le sang ne peut être perfusé directement dans ces composants. Différents processus ont donc été proposés pour pouvoir séparer ces toxines à éliminer, des éléments figurés du sang qui eux retournent directement au patient. Ces différents processus s'appuient sur deux phénomènes physiques - la convection et la diffusion - afin de permettre le transfert des toxines à travers une membrane semi-perméable du circuit « sang » au circuit de traitement. Ils peuvent donc être classés en deux grandes catégories

selon l'étape qui précède la phase de traitement par adsorption : séparation de ces toxines par un processus convectif ou diffusif.

Les systèmes combinant la convection et l'adsorption sont notamment les dispositifs Asahi Kasei Medical ou FPSA Prometheus® (paragraphe 4). La fonction de filtration y est assurée par un premier circuit où les cellules sanguines du patient sont séparées à l'aide d'une membrane semi-perméable, de l'eau et d'une partie des solutés à éliminer par un processus convectif. La pression transmembranaire appliquée du compartiment « sang » vers le compartiment « filtrat » permet à la fois d'assurer un débit de filtration et un transfert de solutés. Puis le filtrat passe à travers des colonnes d'adsorption où les toxines sont retenues. Le sang, ainsi purifié, retourne au patient.

D'autres systèmes combinent la diffusion et l'adsorption comme les systèmes Liver Dialysis Unit™, Mars® ou Albumin Dialysis SPAD (paragraphe 5). Dans ces systèmes, une membrane semi-perméable sépare le sang du patient du compartiment dialysat où les toxines sont éliminées par le biais d'une hémodialyse conventionnelle sous l'effet d'un processus diffusif. Ces toxines peuvent également être capturées en rajoutant une composante de fixation lorsque ces dernières ont été dialysées.

La suite de l'article ne doit pas être prise en compte dans cette partie puisqu'il traite les systèmes de suppléance hépatique bioartificiel qui seront décrits plus en détail dans le paragraphe suivant intitulé « D 2. Le foie bioartificiel ».



Review

The place of adsorption and biochromatography in extracorporeal liver support systems[☆]

C. Legallais^{*}, A. Gautier, M. Dufresne, B. Carpentier, R. Baudoïn

Technological University of Compiègne, UMR CNRS 6600 Biomechanics and Biomedical Engineering, BP 20529, 60205 Compiègne Cedex, France

Received 30 March 2007; accepted 23 July 2007

Available online 19 August 2007

Abstract

Artificial and bioartificial liver devices aim at replacing some or all liver functions in the cases of end stage or fulminant disorders. Among all of its function, liver plays a key role in detoxification of substances that are hydrosoluble or bound to albumin. In this paper, the authors first reviewed the requirements for temporary liver support, then the adsorption-based systems that can be found on the market and finally propose new applications of biochromatography using perfusion-based bioartificial systems.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Liver; Bioreactor; Adsorption columns; Encapsulation; Fluidized bed

Contents

1. Introduction	171
2. Requirements for artificial liver support: what are the functions to be replaced?	172
3. The role of adsorption in detoxication	172
4. Convection + adsorption systems	173
4.1. ASAMI KASEI Medical (Tokyo, Japan)	173
4.2. FPSA-Prometheus [®] from Fresenius Medical Care (Bad Homburg, Germany)	173
5. Diffusion + adsorption systems	173
5.1. Liver Dialysis Unit [™] by Hemocleanse Technologies (Lafayette, USA)	173
5.2. MARS [®] from Teraklin (owned by Gambro, Lund, Sweden)	174
5.3. Albumin dialysis SPAD	174
6. Bioartificial systems	174
7. Conclusions	175
References	176

1. Introduction

The liver performs many important metabolic functions and is the only internal organ that has the capacity to regenerate itself with new healthy tissues. Loss of liver cell functions may

result in the disruption of many essential metabolic functions, which could lead to death. At present, liver transplantation is the only efficient treatment for patients suffering from acute or fulminant organ failure [1]. The shortage in specific organ donors has resulted in a high death rate among the potential patients waiting for a graft. Since 20 years, the expanding gap between the number of patients on waiting list and the number of liver transplants has highlighted the requirement for a temporary liver support. Such an artificial organ could be employed either as a bridge to transplantation or as a means for the patient to recover native liver function [2].

[☆] This paper was presented at the Biochromatography and Nanotechnologies Conference, Vellore, Tamil Nadu, India, 12–15 February 2007.

^{*} Corresponding author. Tel.: +33 3 44 23 44 01; fax: +33 3 44 23 79 42.
E-mail address: cecile.legallais@utc.fr (C. Legallais).

As liver performs multiple and complex functions (detoxification, but also transformation and synthesis), artificial organ or bioartificial organ exploiting a synthetic cartridge to host biological components such as cells (hepatocytes in the case of a bioartificial liver) have been investigated. Among all of these potentialities, we only focus here on systems adapting some chromatography principles. Therefore, membrane-based bioartificial livers (BAL) will not be described, but could be found in other reviews [3–6].

One of the major liver functions is detoxification of substances carried by blood, which are perfused through the cellular network in the organ. To replace these functions, three different physical principles are available in extracorporeal devices under different forms. They are presented in Fig. 1 and will be discussed along this paper. It should be noticed that the term “convection”, commonly used, represents indeed molecule transfer due to fluid motion, most properly named “solvent drag” transport.

2. Requirements for artificial liver support: what are the functions to be replaced?

The adult human liver normally weighs between 1.7 kg and 3.0 kg. It is both the second largest organ and the largest gland within the human body. The portal vein brings it venous blood from the spleen, pancreas, small intestine and large intestine, so that the liver can process the nutrients and by-products of food digestion. The liver is among the few internal human organs able of natural regeneration: as little as 25% of remaining liver can regenerate into a whole liver again. The various functions of the liver are carried out by the liver cells and more specifically by hepatocytes. These functions are numerous and partially depicted in Fig. 2.

As examples, the liver produces and excretes bile required for emulsifying fats, performs several roles in carbohydrate metabolism such as gluconeogenesis (synthesis of glucose from certain amino acids, lactate or glycerol), glycogenolysis (break-down of glycogen into glucose) and glycogenesis (formation of

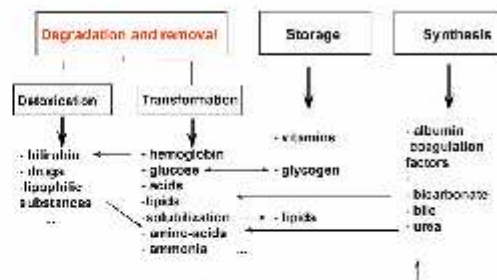


Fig. 2. Classification of major liver functions.

glycogen from glucose). It is responsible for the mainstay of protein metabolism and performs several roles in lipid metabolism. The liver produces albumin, coagulation factors I (fibrinogen), II (prothrombin), V, VII, IX, X and XI, as well as protein C, protein S and antithrombin.

Finally, the liver breaks down hemoglobin, toxic substances and most medicinal products in a process called drug metabolism and converts ammonia to urea.

3. The role of adsorption in detoxication

Artificial liver support systems aim at the extracorporeal removal of water-soluble and protein-bound toxins (albumin being the preferential binding protein) associated with hepatic failure. Albumin contains reversible binding sites for substances such as fatty acids, hormones, enzymes, dyes, trace metals and drugs [7] and therefore, helps for the later kidney clearance of substances that are toxic in the unbound state. These substances that accumulate in liver failure are implicated in the development of hepato-renal syndrome, hepatic encephalopathy, hemodynamic instability, ongoing liver injury and inhibition of liver cell regeneration. It has been proposed that albumin binding sites for these putative toxins become saturated in patients with liver failure, consequent on decreased hepatic clearance, leading to an accumulation of unbound toxic substances and the development of organ dysfunction.

The design of affinity columns is not mandatory for liver support as it could be for other protein-specific diseases (such as familial hypercholesterolemia or immune disorders) [8]. Indeed, the range of substances to be removed is broad and not completely identified. Clinical studies showed that the critical issue of the clinical syndrome in liver failure is the accumulation of toxins not cleared by the failing liver. Based on this hypothesis, the removal of lipophilic, albumin-bound substances, such as bilirubin, bile acids, metabolites of aromatic amino acids, medium-chain fatty acids and cytokines, should be beneficial to the clinical course of a patient in liver failure.

For this purpose, the removal procedures are mainly based on non-specific adsorption on ion-exchangers and activated charcoal. Blood should not perfuse directly such components, due to biocompatibility aspects. Therefore, several processes have been proposed to correctly handle toxins carried by plasma. They

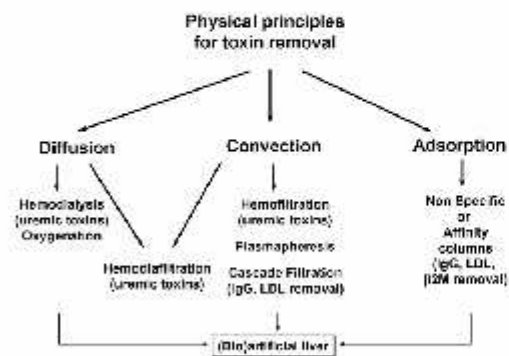


Fig. 1. Classification of the toxin removal methods available in the field of artificial organs.

are described in the following chapters. All of them need a physical barrier between the blood cells and the adsorption system. This physical sieve is always a membrane with adequate properties, through which toxins can be transferred by diffusion or convection.

Two systems are based on classical chromatography processes, i.e. perfusion of a column hosting adsorbents and three others are based on moving adsorbent phase.

4. Convection + adsorption systems

The following processes can be described as selective therapeutic plasmapheresis. In a first step, blood is withdrawn from the patient and separated by cross flow filtration in a hollow fiber membrane cartridge: water and some plasma solutes are transferred through a semi-permeable membrane under a convection process. The transmembrane pressure applied from blood to filtrate compartment ensures flow and mass transfers. Then, the filtrate perfuses the adsorption columns where toxins are retained and is finally mixed with blood cells and other plasma components before returning to the patient (Fig. 3).

4.1. ASAHI KASEI Medical (Tokyo, Japan)

The plasmapheresis step is here performed by a microporous membrane (Plasmaflo™) made of a copolymer of ethylene and vinyl alcohol (PEVA), with a maximum pore size of 0.3 μm. The extracted plasma flows through an activated charcoal column Hemosorba™ and an anion exchange column (copolymer of styrene-divinyl benzene) Plasorba™ that binds bilirubin and bile acids [9]. Each column contains 350 mL of adsorbent. After a partial hepatectomy (surgery removing the diseased part of the liver), this system is recommended as a support for future regeneration.

4.2. FPSA-Prometheus® from Fresenius Medical Care (Bad Homburg, Germany)

Here, the first step consists of blood fractionation by means of a capillary albumin filter (AlbuFlow AF01) presenting a

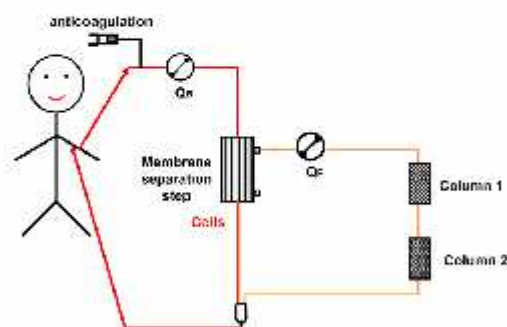


Fig. 3. Generic representation of combined filtration and adsorption columns systems for artificial liver support.

molecular weight cut-off of 300 000 Da. The large pores of the membrane allow albumin-rich plasma to enter the secondary plasma circuit. Albumin-bound toxins are separated from the plasma by binding to the adsorbent beads. Both columns host 350 mL of neutral resin styrene-divinyl benzene copolymer beads. The average particle diameter is approximately 600 μm. The inner porous structure is sponge-like and easily accessible for protein-bound liver toxins. Prometh 01 adsorbs water insoluble compounds, such as bile acids, phenols and aromatic amino acids. Prometh 02 has anion-exchanger properties because it contains positively charged sites and is able to remove negatively charged liver toxins, such as bilirubin. The cleared filtrate returns thus to the blood main stream [10].

To remove water-soluble toxins, an additional classical dialysis step is then placed downstream. The high flux dialysis membrane is used for the diffusive transfer of toxins from the blood to the dialysate side.

The whole extracorporeal circuit is adapted from a Fresenius 4008 dialysis machine. All the clinical results presented up to now are encouraging and prove the capacity of Prometheus to treat certain categories of patients [11].

5. Diffusion + adsorption systems

In all the systems below, substances carried by blood are removed in the "dialysate" phase, which is separated from blood by a semi-permeable membrane. This means toxins have first to cross this barrier by diffusion, before being treated (Fig. 4). Toxins that bind to albumin in the bloodstream and are associated with progressing liver failure have proven refractory to be removed by conventional hemodialysis. Such toxins can, however, be removed by adding a binder to the dialysate that serves to capture the toxin as it is dialyzed across the membrane.

5.1. Liver Dialysis Unit™ by Hemocleanse Technologies (Lafayette, USA)

This system previously named Biologic-DT was first marketed by the company HemoTherapies. This original method combined hemodialysis and adsorption, the adsorbents (powdered activated charcoal and cation-ex changers) being located in

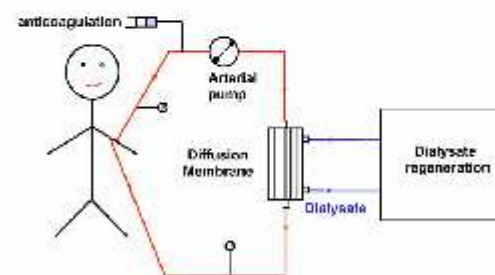


Fig. 4. Generic representation of combined diffusion and adsorption columns systems for artificial liver support.

the dialysate moving phase [12]. The motion is bidirectional and makes the available adsorption area huge: 1.5 L of bead suspension corresponds to 300 000 m². Dialysate content is adjusted so as to prevent unexpected removal of substances such as calcium, sodium due to diffusive effects. This treatment was shown to be efficient in cirrhotic patients [13].

5.2. MARS[®] from Teraklin (owned by Gambro, Lund, Sweden)

MARS primary circuit is based on a specific dialysis using a specially designed membrane named MARS Flux dialyser. The secondary circuit consists in 600 mL of 20% human albumin solution instead of physiological buffer used in classical hemodialysis. Due to the membrane properties, protein-bound toxins and water-soluble substances from the blood side diffuse into the albumin solution [14]. The MARS Flux dialyser presents a surface area of 2.1 m², a membrane thickness of 100 nm and a molecular cut-off of about 50 kDa. The specific membrane surface provides pseudo-binding sites for albumin when the secondary circuit is primed with albumin solution. The albumin molecules on the "dialysate" side of the membrane are in very close proximity to the surface of the membrane in contact with patient's blood. It is assumed that albumin-bound toxins move by physicochemical interactions between the plasma, albumin molecules bound to the dialysis side of the membrane and the circulating albumin solution. This solution is then dialyzed against a standard buffered dialysis solution to remove water-soluble substances by diffusion. The removal of the albumin-bound toxins is achieved by passage through an activated carbon adsorber and an anion-exchanger. The concentration gradient is maintained at the first dialysis step by circulation of the on-line regenerated albumin. A specific monitor has been designed by Teraklin company to handle the secondary circuit and is now commercially available with Gambro dialysis machine.

MARS therapy has been shown to result in a relative clearance of aromatic amino acids and in the substantial removal of albumin-bound toxins such as fatty acids, bile acids, tryptophan and bilirubin [15]. Physiologically important proteins (such as albumin, α 1-glycoprotein, α 1-antitrypsin, α 2-macroglobulin, transferrin and thyroxine-binding globulin) and hormones (such as thyroxine and thyroid-stimulating hormone) are not significantly removed.

5.3. Albumin dialysis SPAD

Single-pass albumin dialysis (SPAD) is a non-commercial simple method of albumin dialysis using standard renal replacement therapy machines without an additional perfusion pump system. The patient's blood flows through a circuit with a high-flux hollow fiber hemodiafilter, identical to that used in the MARS system. The other side of this membrane is perfused with a buffered albumin solution in counterdirectional flow, which is, instead of being regenerated as in the MARS concept, discarded after passing the filter [16].

6. Bioartificial systems

As seen above, the artificial systems are only able to supply detoxication functions of the liver. In some cases, this might not be enough to save patients. An alternative is the design of bioartificial liver. A simplistic approach consists in considering such a device as a bioreactor based on synthetic elements able to offer an adequate environment to the liver cells. This environment would in turn lead to the maintenance of efficient functions of the cells aiming at liver supply, when placed in a bioreactor located in an extracorporeal circuit. The mandatory requirements for acceptable cell viability and functions in a bioartificial liver (BAL) are tentatively listed below, according to a biotechnological point of view:

1. Anchorage to a support or a matrix
2. Effective exchanges with blood or plasma
3. Protection from host immunological response

In addition, the synthetic components of the bioreactors should themselves be biocompatible. Several bioreactor designs have been proposed to fulfill most of the above conditions. They can be classified into three categories [4]: membrane-based devices, direct perfusion systems with cells immobilized on various supports and bead entrapment-based systems. The polymer bead matrix offered anchorage facilities to hepatocytes and its porous structure could act as an immunological barrier.

The beads containing hepatocytes were first developed by Tompkins et al. [17] and Dixit [18] for their direct implantation. Hepatocytes viability was found to be maintained in such a tridimensional structure [19], even after cryopreservation [20]. The beads might even protect the cells from shear stress damage in an extracorporeal bioreactor.

Since cell encapsulation is a widely used tool in biotechnology, several materials have been investigated to fulfill the requirements of a bioartificial liver. Several teams tested the properties of HEMA-MMA copolymer [21], chitosan-dextrose [22]. Calcium alginate is up to now the most popular material [23–25] because of its porosity, its mechanical properties and its biocompatibility. The bead diameter ranged from 400 μ m to 1 mm, allowing for sufficient mass transfer and oxygenation of all hepatocytes.

The inclusion of hepatocytes within a semi-permeable spherical structure usually called "bead" or "capsule" makes this approach close to chromatography. Indeed, a key issue relies on the process itself: how can the plasma correctly perfuse a huge number of beads?

Most of the bioreactors designed for beads perfusion are based on fixed bed configuration, where the beads are densely packed into a column. Reactors designed for small animal trials operated properly [24]. Their major limitation for scaling-up is the perfusion velocity profile into the column: the formation of preferential channels resulted in poor perfusion for a large amount of beads and consequently limited mass transport outside the beads. In addition, high shear stresses on the effectively perfused beads could lead to possible damage on the bead

structure and as an effect to alginate and cells release to the bloodstream.

However, the hepatocytes entrapment into alginate beads still appeared promising since all the other criteria fixed for an operational BAL seemed to be fulfilled. For these reasons, we proposed to exploit the potentiality of hepatocytes entrapped in alginate beads in a more efficient bioreactor.

The use of fluidized bed or expanded bed reactors is widely spread in chemical engineering or in biochromatography when a diphasic mixture is present [26]. In combination with cells entrapped into beads, it has also found several biotechnological applications. Hence, we suggested applying this technology to a large scale extracorporeal BAL as an extent of the previous work of Fremont et al. [23] with a small scale bioreactor in fixed bed configuration, leading to the conception of the fluidized bed bioartificial liver (FBBAL) (Fig. 5) [27]. In vitro, we showed that encapsulation of an immortalized human cell line C3A followed by culture medium perfusion in a FBBAL maintained efficient cell functions for at least 6 h [28]. We now extend this study up to 48 h, which is much longer than a potential single treatment. For ex vivo or in vivo applications, the bioreactor behaviour may be unstable due to the low density difference between the liquid phase (plasma) and the solid phase (beads hosting hepatocytes). Indeed, the porosity of the fluidized bed (ε) depends on the superficial perfusion velocity (u) and on the terminal velocity (u_t) according to Richardson and Zaki semi-empirical formulation [26]:

$$\varepsilon = \left(\frac{u}{u_t} \right)^{1/n}, \quad u_t = \frac{(\rho_f - \rho_s) g d_p^2}{18 \mu_f}$$

where n is a constant depending on the operating conditions, ρ_f the fluid density (kg m^{-3}), ρ_s the solid (bead) density (kg m^{-3}), μ_f the fluid viscosity (Pa s), d_p the bead diameter (m) and g is the gravity constant (m s^{-2}).

To circumvent this potential risk of beads' escape for the fluidized bed column, we propose to make them denser by the inclusion of glass microspheres (diameter from 10 μm to 50 μm). Mixing an adequate number of glass beads per milliliter

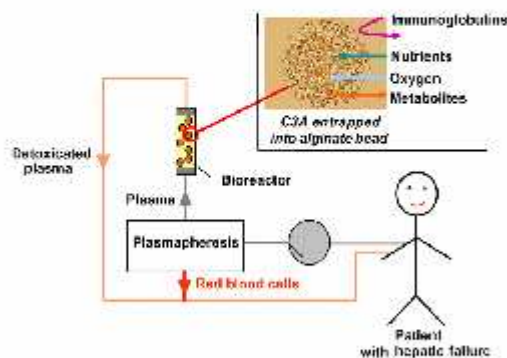


Fig. 5. Schematic description of the whole set up for the fluidized bed bioartificial liver.

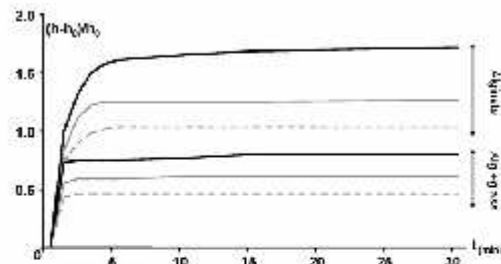


Fig. 6. Expansion of the fluidized bed when perfused with plasma either with empty beads (three top lines) or with beads made denser by inclusion of glass microspheres (three bottom lines) under three perfusion velocities: 0.74 mm s^{-1} (dotted line), 0.90 mm s^{-1} (grey line) and 1.06 mm s^{-1} (dark line).

of alginate allows for the reduction of the bed expansion, as shown on Fig. 6.

Mass transfers between the perfusion fluid and the beads were thus significantly increased, as compared to a static configuration [29]. Each bead followed a motion from the bottom to the top of the bioreactor and then fell down. Preferential flow was thus avoided and convective mass transfer was achieved due to the relative motion of the beads into the perfusion fluid.

In vitro, the results obtained with this type of bioreactor and alginate beads hosting hepatoblastoma C3A cells are very encouraging. The in vivo application requires up to 1L of alginate beads (diameter 1 mm) to supply liver functions. The perfusion plasma flow rate could range 100–400 mL/min. with an expansion ratio of 2. The system developed is now applied by three groups in Europe. For instance, the same technology was adapted for Selden's group in London, with smaller diameter alginate beads. Ex vivo results with pathological plasma seem very encouraging (unpublished data).

7. Conclusions

Up to now, none of the presented system can claim its ability to fully replace all liver functions in an extracorporeal circuit. On the one hand, purely artificial techniques can only cover some detoxification aspects, which is already crucial in many clinical cases to save patients. On the other hand, bioartificial livers did not prove their full efficiency yet, mainly because both regulatory and logistic aspects limit for the moment the inclusion of significant numbers of patients to draw statistically relevant conclusions.

It appears nevertheless clear that the application of adsorbent techniques, perhaps in combination with bioartificial systems, present a potential supply to help the patient wait for a graft or even for tissue regeneration. In the biomedical field, the extension of techniques previously developed for other topics, such as biochromatography for instance, has always proved to be promising. This could be hopefully the case for artificial liver support.

References

- [1] R.W. Chapman, D. Forman, R. Peto, S. Smallwood, *Lancet* (1990) 32.
- [2] S. Cao, C.O. Esquivel, E.B. Keeffe, *Ann. Rev. Med.* 49 (1998) 85.
- [3] N. Arkadopoulos, O. Detry, J. Rozga, A.A. Demetriou, *Int. J. Artif. Organs* 21 (1998) 781.
- [4] C. Legallais, B. David, E. Doré, *J. Membr. Sci.* 181 (2001) 81.
- [5] M. Matsushita, Y. Nosé, *Artif. Organs* 10 (1986) 378.
- [6] S.L. Nyberg, S.P. Misra, *Mayo Clin. Proc.* (1998) 765.
- [7] T.E. Emerson, *Crit. Care Med.* 17 (1989) 690.
- [8] C. Legallais, M.A. Vijayalakshmi, P. Moriniere, in: M.A. Vijayalakshmi (Ed.), *Biochromatography Theory and Practice*, Taylor and Francis, London and New York, 2002, p. 496.
- [9] J. Iseki, K. Toyama, K. Nakagami, M. Takagi, K. Hakamada, N. Ooba, N. Mori, *Hepatology* 42 (1995) 394.
- [10] J. Vieken, H. Christmann, *Ther. Apher. Dial.* 10 (2006) 125.
- [11] A. Santoro, S. Faenza, E. Mancini, E. Ferramosca, F. Grammatico, A. Zucchelli, M.G. Facchini, A.D. Pinna, *Transplant. Proc.* (2006) 1078.
- [12] S.R. Ash, W.R. Knab, D.E. Blake, D.J. Carr, J. Steczko, K.D. Harker, H. Levy, *Ther. Apher.* (2000) 4218.
- [13] E. Bauer, A. Gendo, C. Madl, F. Garo, E. Roth, L. Kramer, *Int. J. Artif. Organs* 25 (2002) 923.
- [14] J. Stange, S. Mitzner, *Int. J. Artif. Organs* 19 (1996) 677.
- [15] S. Klammt, J. Stange, S.R. Mitzner, P. Peszynski, E. Peters, S. Liebe, *Liver* 22 (2002) 30.
- [16] I.M. Sauer, M. Goetz, I. Steffen, G. Walter, D.C. Kehr, R. Schwartlander, Y.J. Hwang, A. Pascher, J.C. Gerlach, P. Neuhans, *Hepatology* 39 (2004) 1408.
- [17] R.G. Tompkins, E.A. Carter, J.D. Carlson, M.L. Yarmush, *Biotechnol. Bioeng.* 31 (1988) 11.
- [18] V. Dixit, M. Arthur, R. Reinhardt, G. Ginnick, *Artif. Organs* 16 (1992) 336.
- [19] Y. Miura, T. Akimoto, N. Yoshikawa, K. Yagi, *Biomater. Artif. Cells Artif. Organs* 18 (1990) 549.
- [20] J. Stange, S. Mitzner, *Int. J. Artif. Organs* 19 (1996) 45.
- [21] G.D. Wells, M.M. Fisher, M.V. Sefton, *Biomaterials* 14 (1993) 615.
- [22] H.W. Mathew, S.O. Salley, W.D. Peterson, D.R. Deshmukh, A. Mukhopadhyay, M.D. Klein, *ASAIO Trans.* 37 (1991) 328.
- [23] B. Fremont, A. Joly, M. Desille, J.F. Desjardins, J.P. Campion, B. Clement, *Cell Biol. Toxicol.* 12 (1996) 325.
- [24] B. Fremont, C. Malandain, C. Guyomard, C. Chesne, A. Guillozo, J.P. Campion, *Cell Transplant.* 2 (1993) 453.
- [25] M. Khalil, A. Shariat-Panahi, R. Tootle, T. Ryder, P. McCloskey, E. Roberts, H. Hodgson, C. Selden, *J. Hepatol.* 34 (2001) 68.
- [26] D. Kunii, O. Levenspiel (Eds.), *Fluidization Engineering*, second ed., Butterworth-Heinemann, Boston, 1991.
- [27] E. Doré, C. Legallais, *Ther. Apher.* 3 (1999) 264.
- [28] B. David, M. Dufresne, M.D. Nagel, C. Legallais, *Biotechnol. Prog.* 20 (2004) 1204.
- [29] B. David, E. Doré, M.Y. Jaffrin, C. Legallais, *Int. J. Artif. Organs* 27 (2004) 284.

Comme nous venons de le voir, les systèmes artificiels montrent des résultats encourageants mais ne sont guère toujours efficaces. En effet, le remplacement de la fonction de détoxification est parfois suffisant pour certains cas cliniques et pour d'autres trop limité. Le foie remplissant de nombreuses fonctions, il s'avère très difficile de permettre la régénération tissulaire ou la suppléance de cet organe pour un patient en attente d'une greffe. L'idée est donc venue de pouvoir retrouver l'ensemble de ces fonctions ou du moins les principales, en faisant appel à des cellules hépatiques incorporées dans un système extracorporel. Ces systèmes font appel à une composante biologique, et sont donc appelés Foie Bioartificiel. Ils seront décrits dans la suite de ce chapitre.

2. Le foie bioartificiel

Cette partie s'appuie sur le chapitre intitulé « Microencapsulation d'hépatocytes pour la suppléance hépatique », rédigé par A. Gautier, B. Carpentier et C. Legallais publié en 2007 dans l'ouvrage intitulé « Microencapsulation – Des sciences aux technologies », édité chez Lavoisier, pages 295-312. Les systèmes de suppléance hépatique artificiels ayant été traités dans le paragraphe précédent, nous aborderons l'article à partir du paragraphe 4 intitulé « Les différentes configurations de foies bioartificiels ».

Ces systèmes obéissent à un cahier des charges précis permettant de favoriser d'une part une bonne viabilité cellulaire et d'autre part une bonne fonctionnalité afin que le traitement soit efficace (paragraphe 4.1). Les cellules doivent être isolées du plasma provenant du patient pour éviter toute réaction immunitaire. Pour assurer cette isolation, une barrière doit être placée permettant à la fois de préserver les cellules des facteurs immunitaires et aussi d'assurer les transferts de solutés comme l'oxygène, les nutriments et les métabolites. La performance d'un tel système réside également sur le choix du type cellulaire à incorporer (paragraphe 4.2). A l'heure actuelle, les cellules les plus prometteuses pourraient être les cellules souches adultes ou embryonnaires qui ont la capacité de se différencier en hépatocytes. En effet, ces cellules montrent des caractéristiques intéressantes pour l'application à un foie bioartificiel mais sont toujours au stade de la recherche. Dans la suite de cet article, nous énumérons les différents éléments qui composent ce type de système de suppléance hépatique. Parmi eux, nous pouvons trouver une plasmaphérèse, permettant de séparer les éléments figurés du sang des toxines présentes dans le plasma, un oxygénateur qui assure l'oxygénation des cellules hépatiques et le bioréacteur qui héberge les hépatocytes. Une colonne d'adsorption peut être insérée pour éliminer les toxines éventuellement présentes.

Les bioréacteurs peuvent être classés en quatre catégories selon leur configuration : les systèmes à fibres creuses (ELAD, Hepatassist, MELS, OXY-HFB ou LLS-HALSS), ceux combinant fibres creuses et matrices perfusées (BLSS, RFB-BAL, AMC-BAL, LIVERx2000 ou LIVERaid) et ceux avec une culture en monocouche (FMB-BAL). Les caractéristiques de chacun de ces systèmes sont citées dans cet article. Puis les systèmes basés sur la microencapsulation sont abordés et détaillés en différentes parties : le cahier des charges, le type de billes ou de capsules, les différentes techniques utilisées et les différents matériaux sont recensés. Parmi ces systèmes, nous énumérons le UCLA-BAL, le AHS-BAL et le système de Shirata *et al.* et enfin le système extracorporel nommé FBBAL développé dans notre laboratoire.

The book cover features a dark blue background with a gradient of light from the top left. Numerous glowing spheres of various sizes and colors (blue, green, purple, red) are scattered across the cover, some appearing to be in clusters. The title 'Microencapsulation' is prominently displayed in a white, glowing, cloud-like shape.

Microencapsulation

Des sciences aux technologies

Thierry Vandamme
Denis Poncelet
Pascale Subra-Paternault
coordonnateurs

Editions
TEC
& **DOC**

Lavoisier

Microencapsulation d'hépatocytes pour le développement d'un système de suppléance hépatique

Aude Gautier
aude.gautier@utc.fr

Benoît Carpentier
benoit.carpentier@utc.fr

Cécile Legallais
cecile.legallais@utc.fr

Université de technologie de Compiègne (UTC)
UMR CNRS 6600 – Biomécanique et Génie Biomédical
BP 20529
60205 Compiègne Cedex
France

1. Introduction

Devant la pénurie de greffons hépatiques et en raison de la gravité des pathologies du foie, il apparaît primordial de disposer dans l'urgence d'un système permettant une suppléance extracorporelle transitoire. Le foie remplissant de multiples fonctions au sein de l'organisme, aucun système purement artificiel n'a montré de résultats probants jusqu'à présent. Il semble donc nécessaire d'inclure des cellules hépatiques protégées par une membrane dans un bioréacteur. Ces systèmes sont appelés « foie bioartificiel », et profitent des récents développements en ingénierie tissulaire. Pour isoler les cellules du système immunitaire, T.M.S Chang a proposé l'utilisation de la microencapsulation dans les années 60. Le bien-fondé de cette technique repose sur la maîtrise de paramètres essentiels tels que la biocompatibilité, la stabilité chimique et mécanique du matériau, la perméabilité de la membrane, garantissant ainsi le maintien des fonctions cellulaires hépatiques et l'absence de réactions immunitaires. Dans ce chapitre, nous rappelons tout d'abord les fonctions du foie et les pathologies liées à son dysfonctionnement, puis décrivons différentes méthodes d'encapsulation d'hépatocytes, pour nous concentrer enfin sur les systèmes exploitant la microencapsulation et permettant de répondre au cahier des charges établi précédemment.

2. Fonctions et pathologies du foie

2.1 Les rôles du foie dans l'organisme

Le foie humain est un organe pesant environ 1,5 kg, vascularisé à 80 % par la veine porte qui lui apporte le sang provenant de la rate, de l'estomac, du pancréas et de l'intestin. Cette perfusion lui permet de contrôler tout l'apport alimentaire, et d'exercer de nombreuses fonctions dans l'organisme.

Les hépatocytes constituent les deux tiers de sa population cellulaire. Ils jouent un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie, grâce à leur capacité de métaboliser les nutriments (glucides, lipides et protéides) afin de les stocker et de les redistribuer à l'organisme. On peut ainsi classer les fonctions du foie en trois catégories :

- détoxification : par exemple, destruction des globules rouges en fin de vie, transformation de l'hémoglobine libre en bilirubine conjuguée, élimination des médicaments, dégradation des acides aminés, des lipides,....
- régulation / stockage : vitamines, des lipides, maintien de la glycémie par transformation de glucose en glycogène, ...
- synthèse : albumine, facteurs de la coagulation, lipoprotéines, acides aminés, sels biliaires, urée, ...

Il possède de plus une capacité de régénération et d'autorégulation de sa taille. Cependant, toute pathologie aura des conséquences graves pour le patient.

2.2 Les atteintes hépatiques

Du fait de sa position clé, le foie peut être soumis à l'attaque de virus ou d'agents toxiques (hépatites (A, B, non-A non-B), auto-anticorps). Ces atteintes conduisent à terme à une cirrhose, et dans les cas les plus graves à une nécrose massive du foie. L'intoxication par une surdose de médicaments peut amener une insuffisance hépatique aiguë, qu'il faudra traiter dans l'urgence.

Un mauvais fonctionnement des hépatocytes résulte en une accumulation dans le sang de toxines, qui vont affecter le fonctionnement d'autres organes (reins, cerveau). Le cerveau, notamment, est alors touché par l'apparition d'une encéphalopathie, suivi d'un coma hépatique accompagné de lésions cérébrales irréversibles. Plus grave encore est le cas de l'hépatite fulminante, survenant chez un sujet au foie antérieurement sain, et dont le taux de mortalité est de 90 %. Dans ce cas, l'évolution est très rapide (24 heures), mais les lésions peuvent être réversibles. Il apparaît dans ces cas précis que les traitements doivent survenir très rapidement et très efficacement après la détection de la maladie.

3. Traitements et moyens de suppléance actuels

On se concentre ici sur les cas les plus graves, pour lesquels la greffe apparaît à l'heure actuelle comme le seul traitement. Cependant, le recours à une greffe présente un certain nombre d'inconvénients et de limites. Parmi celles-ci, la pénurie de greffons constatée à l'heure actuelle : en 2005, en France, sur 1600 personnes inscrites sur liste d'attente, seules 1000 furent transplantées d'après l'Etablissement Français des Greffes. Cet écart se traduit par un délai relativement long entre l'inscription sur la liste et la transplantation, et par une centaine de décès avant greffe. Ce problème pourra éventuellement être résolu si on parvient à maîtriser la xénogreffe (organe de porc ou de babouin) ou en employant une nouvelle technique reposant sur une transplantation partielle (partage des greffons). De plus, toute greffe est une opération chirurgicale risquée, et nécessite un traitement immunosuppresseur lourd. Enfin, dans un certain nombre de cas, la greffe ne sera pas possible étant donnée la rapidité de l'évolution de la maladie.

Pour pallier ces inconvénients, des systèmes de suppléance transitoire sont envisagés, permettant au patient d'attendre, soit une greffe (et donc un greffon compatible), soit la régénération de son propre foie, une fois les agents toxiques éliminés. Dans ce but, un certain nombre de dispositifs, purement artificiels ou bioartificiels, ont été développés au cours des dernières années.

Les foies artificiels font appel à des moyens mécaniques et chimiques, assurant la détoxification par des transferts de matière ou par l'adsorption des composants à éliminer. Les techniques dites « classiques » possèdent un certain nombre de limites :

- L'hémodialyse ou l'hémofiltration ne sont pas efficaces pour éliminer la bilirubine ou les autres toxines liées à l'albumine plasmatique ;
- Les échanges plasmatiques nécessitent de recourir à des quantités importantes de fluide de substitution et ne sont pas spécifiques ;
- L'hémo perfusion sur charbons actifs n'est absolument pas sélective et engendre, du fait de la bioincompatibilité du matériau, des perturbations au niveau des plaquettes.

On s'oriente donc plutôt à l'heure actuelle vers des systèmes combinant plusieurs techniques. Les dispositifs présentés sont commercialisés ou en phase d'essais cliniques (tableau 1), mais ne visent à remplacer que les fonctions de détoxication.

Tableau 1 - Bilan des foies artificiels testés cliniquement

Fabricant promoteur	Nom	Principe	Équipement	Essais cliniques	Références
Teraklin (Rostock, Allemagne)	Mars®	Diffusion + adsorption	Moniteur Membrane spécifique Dialysat régénéré par colonne charbon actif et échangeur d'ions	Phase I/II en Europe Investigation seulement aux États-Unis	Klammt <i>et al.</i> 2002 [1]
Hemocleanse (Indiana, États-Unis)	Liver Dialysis Unit™	Diffusion + adsorption	Moniteur Circuit secondaire avec charbon actif	Etude multicentrique FDA	Ash <i>et al.</i> 2000 [2]
Asahi Medical (Tokyo, Japon)	Colonnes : Hemosorba™ et Plasorba™	Adsorption	Moniteur de plasmaphérèse + 2 colonnes d'adsorption (1) pour bilirubine (2) charbon actif	Non répertorié	Iseki <i>et al.</i> 1995 [3]
Fresenius Medical Care (Bad Homburg, Allemagne)	FPSA-Prometheus®	Filtration + adsorption	Moniteur d'hémodialyse adapté Filtre de fractionnement de plasma ; 2 colonnes d'adsorption + hémodialyse	Essais cliniques préliminaires	Kramer <i>et al.</i> 2002 [4]

4. Les différentes configurations de foies bioartificiels

En raison de l'étendue et de la complexité des fonctions remplies par le foie, il paraît nécessaire de proposer des systèmes de suppléance faisant directement appel aux hépatocytes. Les systèmes utilisant des cellules hépatiques immobilisées sur un support permettent de remplacer les fonctions de détoxication, de synthèse et métaboliques du foie et revêtent pour cette raison un intérêt majeur. La conception d'un tel organe bioartificiel est très complexe et doit répondre à un cahier des charges précis.

4.1 Cahier des charges pour l'immobilisation des hépatocytes

Un certain nombre de contraintes sont à respecter pour favoriser la survie et la bonne fonctionnalité des cellules. Celles-ci doivent être isolées de l'environnement externe et immobilisées sur un support favorable. Cet environnement tridimensionnel (matrice) doit permettre aux cellules de retrouver une morphologie et une organisation physiologiques afin qu'elles expriment toutes leurs fonctions et de manière à obtenir une viabilité optimale. Le matériau poreux constitue, de plus, une barrière de perméabilité définie entre le sang ou le plasma du patient et les hépatocytes et assure ainsi l'immuno-protection des cellules. Il s'agit d'interdire le contact des hépatocytes avec les globules blancs et les immunoglobulines (poids moléculaire d'environ 150 KDa). En revanche, les molécules plus petites doivent pouvoir

traverser la barrière comme par exemple l'albumine sécrétée par les hépatocytes, l'hémoglobine qui doit être transformée, ainsi que les différentes toxines. Une bonne oxygénation des cellules doit également être assurée.

4.2 Types cellulaires

Dans la littérature, de nombreux types cellulaires ont été utilisés pour suppléer les fonctions hépatiques [5]. Les hépatocytes peuvent être primaires - non modifiés après extraction - ou de lignée, d'origine animale ou humaine. Les cellules de lignée, qui ont été transformées génétiquement, sont immortalisées et peuvent se diviser à l'infini (du moins en théorie). Cependant, ces cellules ne possèdent pas l'intégralité des fonctions hépatiques. L'avantage de ce type cellulaire réside dans sa simplicité de culture et d'obtention. A l'inverse, les cellules primaires sont plus difficiles à cultiver. On voit désormais aussi apparaître les potentialités de cellules souches adultes ou embryonnaires.

3.3 Bioréacteurs

La figure 1 montre un schéma global des éléments que l'on peut trouver dans un dispositif extracorporel visant à la suppléance hépatique. On notera la présence éventuelle d'un oxygénateur et d'une colonne de charbon actif ou d'adsorption non spécifique qui peut être utile à l'élimination de certaines toxines.

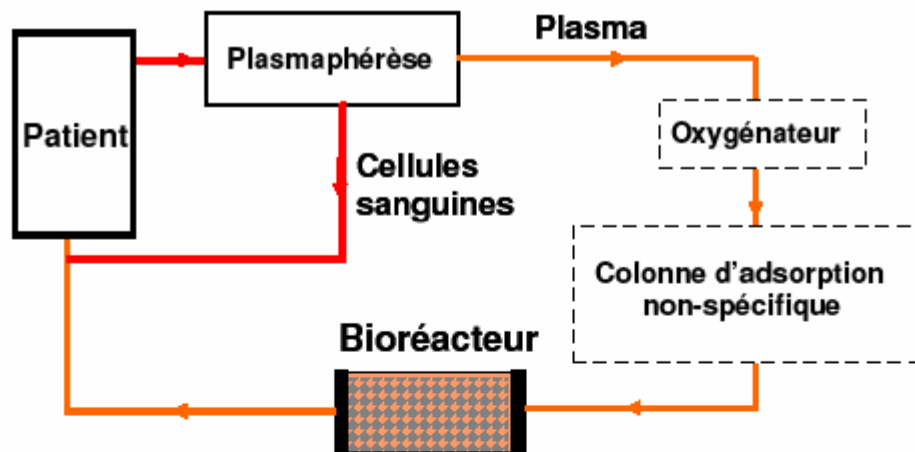


Figure 1 - Éléments constitutifs d'un foie bioartificiel

La quantité de cellules nécessaire à la suppléance d'un patient en insuffisance hépatique est estimée à au moins 10^{10} . La préservation au cours du temps de la viabilité et de la fonctionnalité des cellules est un important challenge lors du développement d'un foie bioartificiel.

Les bioréacteurs peuvent être classés dans quatre catégories principales (Figure. 2) : les systèmes à fibres creuses, les cultures monocouches, les matrices perfusées et les systèmes basés sur l'encapsulation. Chaque type de design a ses avantages et ses inconvénients. Un « bon » bioréacteur doit intégrer les fonctionnalités suivantes : les transferts de matière

doivent être efficaces et bidirectionnels, le bioréacteur doit pouvoir être fabriqué dans des proportions permettant une bonne efficacité thérapeutique (« redimensionnement ») et être propice au maintien de la viabilité, du phénotype et de la fonctionnalité des cellules [6].

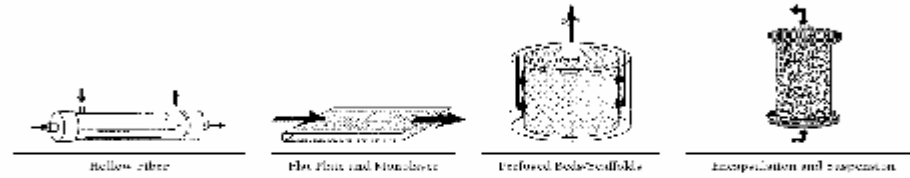


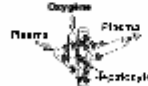

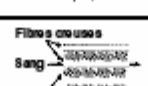
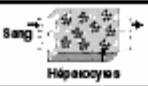
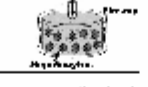


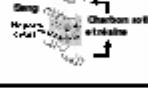



Figure 2 - Principaux types de designs de bioréacteurs, d'après [6]

Le tableau 2 (adapté de [7]) présente les caractéristiques des principaux foies bioartificiels basés sur l'utilisation de fibres creuses, de matrices perfusées ou de cultures en monocouche au stade d'étude pré-clinique ou clinique. Les foies bioartificiels basés sur la microencapsulation sont traités dans le paragraphe 4.

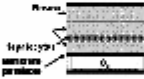
Tableau 2 - Synthèse des différentes géométries de foie bioartificiel décrites dans la littérature

• Concept Fibres Creuses			
Foie bioartificiel	Schéma de principe	Organisation cellulaire	Milieu perfusé
ELAD (Amphioxus Cell Technologies, Etats-Unis)		Agrégats	Sang
Hepatassist (Circe Biomedical, Etats-Unis)		Microsphères tapissées d'hépatocytes	Plasma
MELS (Charité Berlin, Allemagne)		Sphéroïdes	Plasma
Oxy-HFB (Université Eberhard Karls, Allemagne)		Tapis cellulaire autour des fibres	Plasma
LLS-HALSS (Université de Kyushu, Japon)		Agrégats	Sang
• Concept Fibres Creuses Matrices Perfusées			
BLSS (Excorp Medical Inc., Etats-Unis)		Amas inclus dans un gel de collagène	Sang
RFB-BAL (Université de Ferrara, Italie)		Agrégats	Plasma
AMC-BAL (Université d'Amsterdam, Pays-Bas)		Petits agrégats	Plasma
LIVERx2000 (Algenix Inc., Etats-Unis)		Hépatocytes piégés dans un cylindre de collagène à l'intérieur des fibres creuses	Sang
LIVERaid (Arbios System Inc., Etats-Unis)		Agrégats	Sang

• Concept Matrices perfusées

PUF-HALSS (Université de Kyushu, Japon)	 <p>Mousse de polyuréthane Sphères d'hépatocytes</p>	Sphères d'hépatocytes dans une mousse en polyuréthane	Plasma
---	---	--	--------

• Concept Cultures Monocouches

FMB-BAL (Université Eberhard Karls, Allemagne)	 <p>Monocouche d'hépatocytes</p>	Monocouche d'hépatocytes	Plasma
---	---	--------------------------	--------

De nombreuses équipes utilisent les potentialités des fibres creuses pour atteindre les objectifs du cahier des charges. Les cellules sont placées entre les fibres, dans l'espace extracapillaire, et sont soit en contact direct avec la membrane composant la fibre (e.g. système ELAD [8], système Oxy-HFB [9]) soit attachées sur des microtransporteurs (*microcarriers*) ou des microsphères (Système HepatAssist [10]). Parfois les cellules sont incorporées dans un gel entourant les fibres (BLSS [11], LIVERaid [12]) ou coulées à l'intérieur de celles-ci (LIVERx2000). Le MELS développé par Gerlach et coll. possède plusieurs types de fibres creuses, certaines permettant les échanges gazeux (apport d'oxygène et élimination du CO₂) [13]. Dans l'espace extracapillaire, les cellules forment des agrégats de taille variable.

Les foies bioartificiels développés par l'université de Ferrara (RFB-BAL) [14], Excorp. Medical Inc. (BLSS) [11], et l'université d'Amsterdam (AMC-BAL) [15] sont basés sur l'utilisation de matrices poreuses perfusées. Les deux derniers utilisent conjointement des fibres creuses pour la circulation du sang (BLSS) ou les échanges gazeux (AMC-BAL) et se situent donc à la frontière entre deux types de designs. Les hépatocytes sont inclus dans la matrice et sont présents sous forme d'agrégats.

Peu d'équipes utilisent les membranes planes. Nous citons l'exemple du FMB-BAL développé par l'université Eberhard Karls [16].

Les matrices permettant l'ensemencement des cellules peuvent être synthétiques à l'instar des mousses en polyuréthane utilisées par l'université de Kyushu [17] ou naturelles comme la matrice du BLSS faite de collagène, ou à base d'alginate...

Certaines équipes utilisent l'hémo perfusion directe, d'autres perfusent le plasma après plasmaphérèse (séparation du plasma des éléments figurés).

La microencapsulation d'hépatocytes est un moyen efficace de répondre aux critères définis dans le cahier des charges. En effet, le rapport surface/volume est élevé. La diffusion peut être contrôlée en jouant sur la porosité du gel matriciel. Cette application de la microencapsulation est traitée plus en détail dans le paragraphe suivant.

5. Les foies bioartificiels basés sur la microencapsulation

5.1 La microencapsulation

5.1.1 Cahier des charges de la microencapsulation

De nombreux types cellulaires, procaryotes et eucaryotes, ont été encapsulés pour des applications dans les biotechnologies et l'agroalimentaire. (cf. chapitre 2 "Les développements et les applications industrielles des microcapsules").

L'encapsulation de cellules eucaryotes est particulière et doit répondre à un cahier des charges aux exigences draconiennes. Les cellules pancréatiques ont été largement étudiées dans ce domaine. La membrane doit être imperméable aux anticorps, protégeant ainsi au maximum les cellules d'une destruction par lyse. Les nutriments et l'oxygène doivent pouvoir quant à eux diffuser librement dans les billes afin de permettre aux hépatocytes d'assurer leurs fonctions. Les substances produites ou transformées par les hépatocytes suivront le chemin inverse et seront libérées dans le plasma. La figure 3 présente le principe de ces transferts en prenant comme exemple les billes d'alginate.

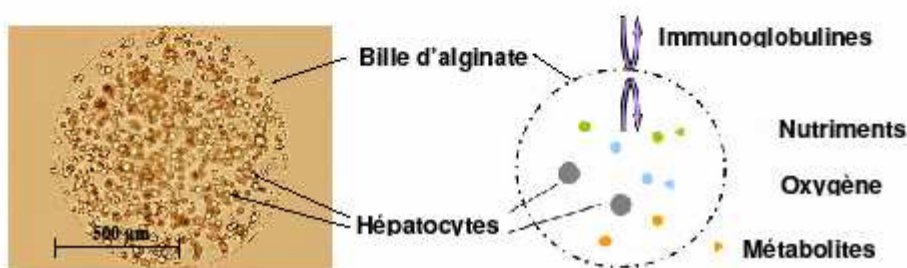


Figure 3 - Schéma de principe présentant les transferts de matière au niveau de la microbille

La viabilité et la biocompatibilité sont des critères essentiels guidant le choix du matériau et de la méthode d'encapsulation. Parmi ces méthodes, l'extrusion semble être la technique la plus douce, engendrant une faible mortalité cellulaire. L'émulsification, parfois employée, a pour défaut principal d'entraîner la formation de billes non-homogènes [18].

La résistance mécanique et la stabilité chimique sont deux autres paramètres influençant l'efficacité et l'innocuité des cellules après encapsulation. Il est possible par exemple de réaliser des tests de compression, d'étudier l'éventuel gonflement [19] ainsi que la morphologie des billes ou des capsules isolées. Les transferts de masse doivent être optimums afin de permettre des échanges efficaces entre les cellules et le liquide de perfusion (plasma ou sang du patient) à travers la membrane.

5.2 Types de billes ou de capsules

Les définitions et différences entre billes et capsules sont présentées au Chapitre 1 « Introduction aux différentes techniques de microencapsulation ». Dans le cadre des recherches menées dans le domaine de la microencapsulation d'hépatocytes, les microcapsules et les microbilles peuvent être fabriquées à partir de différents matériaux : alginate, collagène ou un mélange de différents polymères. La bille en elle-même est souvent réalisée à partir d'alginate. Pour obtenir une microcapsule, il suffit alors d'ajouter une membrane de type poly-L-lysine et de dé-gélifier l'alginate qui se trouve à l'intérieur de celle-ci.

5.2.1 Les principaux procédés de microencapsulation

L'extrusion est une technique de choix pour l'encapsulation d'hépatocytes offrant la possibilité de contrôler le diamètre des billes formées, à la fois par le diamètre externe de l'aiguille et le débit alimentant le circuit de production.

Pour avoir accès à une production de microcapsules ou de microbilles homogènes à l'échelle micrométrique, il est nécessaire d'améliorer le principe de base par addition d'une force supplémentaire à la gravité. Cette force additionnelle peut être un flux d'air, une force électrostatique ou une force vibratoire. Pour plus de détails, le lecteur pourra se rapporter au chapitre 3 intitulé « Les méthodes de microencapsulation de A à Z (ou presque) ». Le tableau 3 présente les différentes techniques mises en œuvre pour l'encapsulation d'hépatocytes.

Tableau 3 - Différentes techniques pour la microencapsulation d'hépatocytes

Principe d'encapsulation par extrusion	Références	Matériau de la Bille (B) / Capsule (C)	Type de cellules	Diamètre des billes (µm)
Extrusion simple ou non-explicitée	Canaple <i>et al.</i> (Suisse) [20]	C : alginate + cellulose sulphate + Matrigel® + poly(méthylène co guanidine) hydrochloride (PMCG)	Hépatocytes de souris isolés	Non mentionné
	Murtas <i>et al.</i> (Italie) [21]	B : alginate	Hépatocytes de rat isolés/HepG2	1600-2000
	Quek <i>et al.</i> (Singapour) [22]	C : copolymère polyelectrolyte + collagène modifié	Hépatocytes de rat isolés	900
	Hwang <i>et al.</i> (Corée) [23]	B : alginate	Hépatocytes de porc isolés	300-500
	Dixit <i>et al.</i> (Etats-Unis) [24]	B : alginate + poly-L-lysine	Hépatocytes de rats isolés	300-700
Extrusion simple/Force électrostatique	Zhou <i>et al.</i> (Singapour) [25]	C : collagène	Hépatocytes de rat isolés	400-500
Force électrostatique (NISCO)	Maguire <i>et al.</i> (Etats-Unis) [26]	C : alginate + poly-L-lysine	Hépatocytes issus de cellules souches embryonnaires	500
Flux d'air coaxial	David <i>et al.</i> (France) [27]	B : alginate	C3A	600-1000
	Gao <i>et al.</i> (Chine) [28,29]	C : alginate poly-L-lysine	Hépatocytes de rat isolés	300-500
	Seo <i>et al.</i> (Corée) [30]	C : alginate/alginate + xyloglucane poly-L-Lysine	Hépatocytes de souris isolés	350
	Ringel <i>et al.</i> (Allemagne) [31]	B : alginate	Hépatocytes de rat isolés	Non mentionné
	Desille <i>et al.</i> (France) [32]	B : alginate	Hépatocytes de porc isolés	1000
Onde vibratoire (INOTECH)	Haque <i>et al.</i> (Canada) [33]	C : alginate + chitosan + poly-L-lysine + polyéthylène glycol	HepG2	420-480
	Selden <i>et al.</i> (Royaume-Uni) [34,35]	B : alginate	HepG2/HHY41	400

La méthode la plus fréquemment utilisée pour encapsuler les cellules hépatiques est l'extrusion à flux d'air coaxial. Cette méthode est peu onéreuse et très simple à mettre en œuvre. Elle permet un bon contrôle du diamètre des billes. Son défaut principal est la difficulté de produire des billes de très faible diamètre, sans générer de résidus amorphes. De plus, le temps de microencapsulation est assez long.

L'encapsulation avec force électrostatique permet de diminuer le diamètre des billes (jusqu'à 100 μm). Cette technique est assez sophistiquée et requiert un travail important de calibration pour obtenir la taille de billes souhaitée en raison du nombre de paramètres influents. La technique par vibrations permet la formation d'une quantité importante de billes dans un temps restreint. Cependant, elle est difficile à appliquer et est très coûteuse.

L'alginate est le matériau de référence car il est biocompatible, facile à gélifier dans un bain de réticulation à base d'ions di- ou trivalents [19]. Le cation le plus utilisé pour la gélification est le Ca^{2+} , bien que d'autres ions chargés positivement (Br^{2+} , Ba^{2+} , Al^{3+}) aient été cités dans la littérature. Ces ions interagissent avec la fonction carboxyle (COO^-) des acides D-mannuronique et L-guluronique constitutifs de l'acide alginique, entraînant la formation d'un réseau tridimensionnel.

D'après le tableau 3, deux grandes familles de cellules se distinguent, les cellules isolées primaires (hépatocytes de porcs, de souris ou de rats) et les cellules de lignée. Les cellules primaires humaines sont très difficiles à obtenir en raison de la pénurie de donneurs. C'est pourquoi les équipes se tournent vers des moyens alternatifs comme les cellules primaires animales et les lignées cellulaires. Parmi ces lignées, les HepG2 (cellules d'hépatoblastome humain) et les C3A sont les plus couramment utilisées. Les cellules utilisées par notre laboratoire sont des C3A, des cellules issues d'une lignée cancéreuse humaine et dérivée des HepG2. Le phénotype de ces cellules est proche de celui des hépatocytes présents dans le foie humain. Les C3A sont capables d'assurer bon nombre des fonctions métaboliques physiologiques. En outre, elles synthétisent l'albumine, la transferrine, le fibrinogène et les facteurs du complexe prothrombinique (II, V, VII, IX, X).

Les cellules souches apparaissent comme une solution d'avenir en raison de la meilleure compréhension des phénomènes de différenciation [26].

Les billes ou capsules produites par les différentes équipes vont de 300 à 2000 μm . Le diamètre des billes est un paramètre important au niveau des transferts de masse. En théorie, pour améliorer les transferts de matière, il faut diminuer la taille des billes afin d'augmenter la surface d'échange et réduire la distance de diffusion. Cependant, l'élaboration d'un protocole d'encapsulation adéquat est complexe à réaliser et la gélification difficile à contrôler.




5.3 Bioréacteurs utilisant des microbilles ou microcapsules

Différents bioréacteurs hébergeant des cellules microencapsulées ont été proposés. Ce concept permet de mettre en contact deux phases, l'une solide (les billes ou capsules), l'autre liquide (sang ou plasma). La majorité des systèmes est à lit fixe - les billes ou capsules sont immobilisées - ou à lit fluidisé, auquel cas le fluide permet la mise en mouvement des billes ou capsules et l'augmentation des transferts de masse. Une exception est à noter : dans les études menées par Shiraha et coll. [18], l'utilisation de fibres creuses dans un module de plasmaphérèse est combinée à l'encapsulation, les billes étant placées dans le compartiment extracapillaire.

Les foies bioartificiels à lit fixe utilisent une vitesse de perfusion faible pour éviter la mise en mouvement des billes ou les immobilisent par un moyen quelconque dans le bioréacteur. Concernant le lit fluidisé, lorsque les billes sont perfusées par le fluide, elles sont mises en suspension et circulent en boucle avec une ascension au centre et une descente le

long des parois du bioréacteur [36]. Cette technique permet un contact optimal et un bon échange entre la phase solide et la phase liquide du mélange biphasique et permet également d'associer échanges diffusifs et convectifs [37]. Il est possible d'utiliser des modèles empiriques pour décrire le comportement du lit fluidisé. Plusieurs ont été proposés comme ceux de Foscolo, Hirata, Ganguly, et de Richardson et Zaki [38,39,40,41].

- Foie bioartificial basé sur la microencapsulation

FBBAL Lit fluidisé (Université de Technologie de Compiègne, France)		Hépatocytes encapsulés dans des billes d'alginate de calcium	Plasma
UCLA-BAL Lit tassé (Université de Californie, Los Angeles, Etats-Unis)		Hépatocytes encapsulés dans des billes d'alginate de calcium tapissées de poly-L-lysine	Sang
AHS-BAL (Université de Dongguk, Corée)		Hépatocytes encapsulés sous formes de sphéroïdes	Plasma

5.3.1 Le UCLA-BAL (Dixit et coll.)

Le foie bioartificiel à lit tassé développé par Dixit et Gitnick utilise l'hémo perfusion directe d'hépatocytes porcins encapsulés au sein de membranes semi-perméables composées d'alginate de calcium et de poly-L-lysine. Les capsules sont immobilisées et le sang circule entre elles. A l'intérieur de ces capsules, les cellules peuvent interagir librement.

L'encapsulation permet dans ce cas de protéger les hépatocytes des éléments figurés du sang (et notamment les leucocytes) et des anticorps circulants, isolant ainsi les cellules sur le plan immunologique. Le lit tassé est perfusé avec le sang artériel du patient, lequel est ensuite redirigé vers la circulation veineuse [42].

Cette équipe a également montré chez le rongeur qu'il était possible d'implanter les microcapsules directement en intra-péritonéal et que cette implantation avait une influence bénéfique (sur le taux de bilirubine notamment) pendant quatre à six semaines. Ce délai écoulé, une importante perte de fonction est observée [43].

5.3.2 Le AHS-BAL

Le système AHS-BAL (alginate-entrapped hepatocyte spheroid) développé par Park et Lee, est basé sur le même principe. Avant l'encapsulation, les hépatocytes d'origine porcine sont cultivés en suspension pendant 20 heures afin d'obtenir des agrégats sphériques (sphéroïdes).

Les agrégats sont ensuite immobilisés dans les billes d'alginate de calcium [7].

5.3.3 Le système développé par Shiraha et coll.

Le système conçu par Shiraha et coll. possède l'originalité de combiner l'utilisation d'un module de plasmaphérèse à fibres creuses (bioréacteur) et de l'encapsulation. Des cellules

hépatiques de rat ou des HepG2 sont encapsulés sous forme de sphéroïdes multicellulaires dans des billes d'hydrogel d'agarose [18].

Les microbilles d'agarose sont ensuite placées dans l'espace extracapillaire du module à fibres creuses et le compartiment extracapillaire fermé. Le plasma est alors perfusé à l'intérieur des fibres. Le bioréacteur est placé dans une boucle comprenant une pompe péristaltique, un système d'oxygénation et des capteurs sensibles à l'oxygène et au pH. Les auteurs ont montré la correction du déséquilibre entre les concentrations en acides aminés branchés et aromatiques lorsque du sérum d'une personne souffrant d'insuffisance hépatique est perfusé.

5.3.4 Le FBBAL (Fluidized Bed BioArtificial Liver, Université de Technologie de Compiègne)

Dans le cas du FBBAL, le sang du patient est filtré par plasmaphérèse afin de séparer les éléments figurés du sang du plasma. Le plasma chargé en toxines est ensuite dirigé dans le bioréacteur où se trouvent les hépatocytes encapsulés. Un plasma plus pur s'écoule à la sortie du bioréacteur, de même que les produits synthétisés ou métabolisés par les cellules. Les éléments figurés issus de la plasmaphérèse sont ensuite mélangés à nouveau avec le plasma détoxiqué et réinjectés au patient.

Comme nous l'avons vu précédemment, il est possible de décrire le comportement du lit de billes en utilisant des modèles empiriques issus de la littérature. Ceux-ci permettent également le redimensionnement du système par détermination de la hauteur optimale du bioréacteur en fonction de la taille des billes, de la vitesse de fluidisation, du volume de bille ... Lors de nos recherches menées au Laboratoire de Biomécanique et Génie Biomédical (UMR CNRS 6600, Université de Compiègne), une très bonne adéquation entre les données expérimentales et le modèle empirique de Richardson et Zaki a été notée et ce modèle a donc été privilégié sur les autres cités précédemment [36]. Il est expliqué ci-après :

Les billes ont une densité supérieure à celle de l'eau et sont donc immergées. Lorsqu'elles sont soumises à un écoulement ascendant, les billes sont mises en mouvement. Leur comportement dépend de la valeur de la vitesse terminale de chute. Différents régimes peuvent exister en fluidisation. Le type de régime rencontré dépend du nombre de Reynolds particulaire à la vitesse terminale de chute (Re_t). Le régime est considéré laminaire lorsque le Re_t est inférieur à 0,2, intermédiaire lorsqu'il est compris entre 0,2 et 500 et turbulent lorsque sa valeur dépasse 500.

Le Re_t peut être obtenu à partir du nombre d'Archimède (Ar) :

$$Ar = [d_b^3 \times g \times \rho_f (\rho_b - \rho_f)] / \mu_f^2,$$

Avec : d_b le diamètre de la bille ; g la gravité ; ρ_f la masse volumique du fluide (1000 kg/m^3) ; ρ_b la masse volumique de la bille (1020 kg/m^3) ; μ_f la viscosité du fluide ($1,005 \cdot 10^{-3} \text{ Pas}$)

D'après la loi empirique de Hartman et coll. et pour des particules sphériques, on a :

$$\text{Log } Re_t = - 1,2738 + 1.04185 \log Ar - 0.060409 (\log Ar)^2 + 0.0020226 (\log Ar)^3$$

Soit, $Re_t = 10^{\log Re_t}$

A l'aide de ces relations, nous pouvons calculer le Re_t des billes. Nous pouvons déterminer la vitesse terminale de chute théorique u_t à l'aide de la formule suivante :

$$u_t = [\mu_f \times Re_t] / [\rho_f \times d_b]$$

Grâce à Richardson et Zaki, nous pouvons déterminer la porosité (ϵ_{RZ}) du lit de billes :

$$\epsilon_{RZ} = [u/ut]^{1/n}$$

avec u la vitesse superficielle du fluide et n un paramètre dépendant du diamètre de la bille, du diamètre du bioréacteur et de Re_t :

$$n = 4,4 + [(18 \times d_b)/D] \times Re_t^{-0,1} \text{ (pour } 1 < Re_t < 200)$$

A partir de là, nous avons accès au rapport entre la hauteur finale du lit et la hauteur initiale H_f/H_0 :

$$H_f/H_0 = (1 - \epsilon_0)/(1 - \epsilon_{RZ}) \text{ avec } \epsilon_0 \text{ la porosité du lit tassé.}$$

Notre équipe a évalué les transferts de masse bidirectionnels (absorption et relargage) au sein de billes d'alginate de 1 mm dans des conditions statiques et dynamiques (fluidisation des billes dans un bioréacteur) [37]. Cette étude a mis en exergue le rôle crucial de la fluidisation sur la vitesse des transferts et a donc montré l'intérêt de ce type de fluidisation pour cette application qu'est la suppléance hépatique. De l'alginate de sodium à 2,2% est extrudé dans une solution de $CaCl_2$ et laissé polymériser durant 15 minutes. Une modélisation mathématique similaire à celle utilisée par Lewinska et coll. [44] est utilisée afin de déterminer les coefficients de transfert. Plusieurs marqueurs sont utilisés pour apprécier les transferts en solution saline et dans du plasma : la vitamine B12 (1355 Da), le cytochrome C (12,4 kDa), l'ovalbumine (45 kDa) et l'albumine bovine (67 kDa).

En statique et avec la vitamine B12, l'équilibre est atteint après environ 2 heures contre 10 minutes en condition dynamique. Avec le plasma, l'équilibre est un peu retardé mais toujours atteint en moins de 20 minutes en condition dynamique. L'effet de la fluidisation (bonne répartition des billes d'alginate sur la hauteur du bioréacteur) est beaucoup plus important que le débit utilisé.

La mobilisation des billes au sein du bioréacteur augmente clairement les cinétiques de transfert de masse mais ne modifie pas la quantité de soluté transférée. Les coefficients de diffusion sont 20 fois supérieurs en condition dynamique ($K_{dyn} = 5.06 \cdot 10^{-7}$ m/s dans la solution saline) prouvant ainsi l'utilité d'un tel système.

Les effets de la fluidisation et du milieu de perfusion utilisé sur le comportement mécanique des billes d'alginate de 1 mm (alginate de faible viscosité à 2,2%) ont aussi été évalués au sein de notre laboratoire [45]. Des tests de compression ont été réalisés afin de déterminer le module de Hertz. La perfusion et la mobilisation des billes dans le bioréacteur pendant 6 heures n'altèrent pas les billes. Bien qu'elles soient légèrement plus déformables après fluidisation, les différences ne sont pas significatives au point de craindre une dégradation et la libération des cellules dans le circuit.

Des études ont également été réalisées par Desille et coll. [32] avec ce type de configuration. Des cellules hépatiques porcines sont encapsulées au sein de billes d'alginate, elles-même fluidisées dans un bioréacteur. Les études menées par ces auteurs ont permis de mettre en évidence une amélioration de l'encéphalopathie sur un modèle porcin (insuffisance

hépatique aiguë). Une diminution de la pression intracrânienne en raison d'une réduction de l'œdème cérébral est également constatée chez les animaux traités.

De même, en utilisant un bioréacteur à lit fluidisé contenant des hépatocytes porcins encapsulés dans des billes d'alginate, Hwang et coll. ont observé un arrêt de l'augmentation de la concentration d'ammoniac dans le sérum ainsi que de la pression intracrânienne [23].

Ce type de bioréacteur pourrait donc être utilisé avantageusement par d'autres équipes encapsulant des hépatocytes dans des billes ou dans des capsules. Dans ce cadre, un premier travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe de C. Selden à Londres [46].

6. Conclusion

Le foie est un organe dont l'implication est majeure dans le maintien de l'homéostasie en raison du nombre et de l'importance des fonctions métaboliques qu'il possède. Les hépatites aiguës voire fulminantes et les décompensations aiguës d'insuffisances chroniques sont susceptibles de provoquer une perte fonctionnelle pouvant remettre en cause le pronostic vital du patient. En raison du manque de greffons et du nombre de personnes en attente de transplantation, des systèmes transitoires extracorporels de suppléance sont mis au point afin de permettre l'attente de la greffe ou le rétablissement des fonctions hépatiques.

Les systèmes de détoxification purement artificiels ayant montré leurs limites dans la pratique, l'idée d'un foie bioartificiel utilisant la fonctionnalité de cellules hépatiques dans un bioréacteur a alors germé. Dans ce contexte là, la microencapsulation des cellules paraît très attrayante. En effet, ce procédé permet d'une part d'isoler les cellules du système immunitaire du patient tout en maintenant des échanges bidirectionnels optimums, et d'autre part de fournir aux cellules un environnement tridimensionnel favorable. Si l'on compare ce type de design aux autres configurations étudiées à l'heure actuelle, on notera de nombreux avantages et parmi ceux-ci, la simplicité de l'étape de redimensionnement, l'importance de la surface d'échange - d'autant plus importante que la taille des billes ou des capsules diminue -, et la possibilité de fluidiser les billes afin d'augmenter l'efficacité des transferts.

De surcroît, le développement de la cryoconservation que l'on maîtrise très bien à l'heure actuelle profitera grandement à cette application de l'encapsulation qu'est le développement de foies bioartificiels, notamment en permettant un délai d'utilisation court du système lors de la survenue de la pathologie hépatique.

6. Références bibliographiques

- [1] S. Klammt, J. Stange, S.R. Mitzner, P. Peszynski, E. Peters, S. Liebe, Extracorporeal liver support by recirculating albumin dialysis: analysing the effect of the first clinically used generation of the MARSystem. *Liver*, 22 Suppl 2 : 30-4, 2002.
- [2] S.R. Ash, W.R. Knab, D.E. Blake, D.J. Carr, J. Steczko, K.D. Harker, H. Levy, Push-pull sorbent-based pheresis and hemodiabsorption in treatment of hepatic failure preliminary results of a clinical trial with the BioLogic-DTPF System. *Therapeutic Apheresis*, 4218-228, 2000.
- [3] J. Iseki, K. Touyama, K. Nakagami, M. Takagi, K. Hakamada, N. Ooba, N. Mori, Plasma adsorption to charcoal and ion-exchange resin for treating postoperative hepatic failure. *Hepatology*, 42 (4) : 394-398, 1995.
- [4] L. Kramer, E. Bauer, A. Gendo, C. Madl, A. Gangl, Influence of hydroxy ethyl starch infusion on serum bilirubin levels in cirrhotic patients treated with artificial liver support. *Int J Artif Organs*, 25 (10) : 918-22, 2002.
- [5] J. Stange, S. Mitzner, Cell sources for bioartificial liver support. *Int.J.Artif.Organs*, 19 (1) : 14-17, 1996.
- [6] J.W. Allen, S.N. Bhatia, Improving the next generation of bioartificial liver devices. *Cell and Developmental Biology*, 13, 447-454, 2002.
- [7] J.-K. Park, D.-H. Lee, Bioartificial Liver Systems: Current Status and Future Perspective. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99 (4), 311–319, 2005.
- [8] R.D. Hughes, R. Williams, Use of bioartificial and artificial liver support devices. *Semin Liver Dis*, 16 (4) : 435-44, 1996.
- [9] I. Jasmund, A. Langsch, R. Simmoteit, A. Bader, Cultivation of primary porcine hepatocytes in an OXY-HFB for use as a bioartificial liver device. *Biotechnol Prog*, 18 (4) :839-46, 2002.
- [10] C. Mullon, Z. Pitkin, The HepatAssist bioartificial liver support system: clinical study and pig hepatocyte process. *Expert Opin Investig Drugs*, 8 (3) : 229-35, 1999.
- [11] J.F. Patzer, G.V. Mazanigos, R. Lopez, Preclinical evaluation of the Excorp Medical, Inc, Bioartificial Liver Support System. *J Am Coll Surg*, 195 (3) : 299-310, 2002.
- [12] J. Rozga, Liver support technology : an update. *Xenotransplantation*, 13 (5) : 380-9, 2006.
- [13] J.C Gerlach, Bioreactors for extracorporeal liver support. *Cell Transplant*,15 Suppl 1 : S91-103, 2006.

- [14] E. Morsiani, P. Pazzi, A.C. Puviani, M. Brogli, L. Valieri, P. Gorini, P. Scoletta, E. Marangoni, R. Ragazzi, G. Azzena, E. Frazzoli, D. Di Luca, E. Cassai, G. Lombardi, A. Cavallari, S. Faenza, A. Pasetto, M. Girardis, E. Jovine, A.D. Pinna, Early experiences with a porcine hepatocyte-based bioartificial liver in acute hepatic failure patients. *Int J Artif Organs*, 25 (3) : 192-202, 2002.
- [15] M.P. van de Kerkhove, P.P. Poyck, T. Deurholt, R. Hoekstra, R.A. Chamuleau, T.M. van Gulik, Liver support therapy: an overview of the AMC-bioartificial liver research. *Dig Surg*, 22 (4) : 254-64, 2005.
- [16] N.R. Fruhauf, K.J. Oldhafer, M. Holtje, G.M. Kaiser, J.H. Fruhauf, G.A. Stavrou, A. Bader, C.E. Broelsch, A bioartificial liver support system using primary hepatocytes: a preclinical study in a new porcine hepatectomy model. *Surgery*, 136 (1) : 47-56, 2004.
- [17] H. Mizumoto, K. Funatsu, Liver regeneration using a hybrid artificial liver support system. *Artif Organs*, 28 (1) : 53-7, 2004.
- [18] H. Shiraha, N. Koide, H. Hada, K. Ujike, M. Nakamura, T. Shinji, S. Gotoh, T. Tsuji, Improvement of serum amino acid profile in hepatic failure with the bioartificial liver using multicellular hepatocyte spheroids. *Biotechnology and Bioengineering*, 50 : 416-421, 1996
- [19] S. K. Bajpai, S. Sharma, Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca^{2+} and Ba^{2+} ions. *Reactive and Functional Polymers*, 59 : 129-140, 2004.
- [20] Canaple, L., Nurdin, N., Angelova, N., Saugy, D., Hunkeler, D., Desvergne, B. Maintenance of primary murine hepatocyte functions in multi component polymer capsules – in vitro cryopreservation studies. *Journal of Hepatology*, 34 : 11-18, 2001.
- [21] S. Murtas, G. Capuani, M. Dentini, C. Manetti, G. Masci, M. Massimi, A. Miccheli, V. Crescenzi, Alginate beads as immobilization matrix for hepatocytes perfused in a bioreactor : a physico-chemical characterization. *J. Biomater. Sci. Polymer. Edn.*, 16 (7) 829-846, 2005.
- [22] C.H. Quek, J. Li, T. Sun, M.L.H. Chan, H.Q. Mao, L.M. Gan, K.W. Leon, H. YU, Photo-crosslinkable microcapsules formed by polyelectrolyte copolymer and modified collagen for rat hepatocyte encapsulation. *Biomaterials*, 25 : 3531-3540, 2004.
- [23] Y.J. Hwang, Y.I. Kim, J.G. Lee, J.W. Lee, J.W. Kim, J.M. Chung, Development of bioartificial liver system using a fluidized bed bioreactor. *Transplantation Proceedings*, 32 : 2349-2351, 2000.
- [24] V. Dixit, M. Arthur, R. Reinhardt, G. Gitnick, Improved function of microencapsulated hepatocytes in a hybrid bioartificial liver support system. *Artificial Organs*, 16 (4) : 336-341, 1992.
- [25] Y. Zhou, T. Sun, M. Chan, J. Zhang, Z. Han, X. Wang, Y. Toh, J.P. Chen, H. Yu, Scalable encapsulation of hepatocytes by electrostatic spraying. *Journal of Biotechnology*, 117 : 99-109, 2005.

- [26] T. Maguire, E. Novik, R. Schloss, M. Yarmush, *Alginate-PLL Microencapsulation : effect of the differentiation of embryonic stem cells into hepatocytes*. Wiley InterScience, 2005.
- [27] B. David, M. Dufresne, M.-D. Nagel, C. Legallais, *In vitro assessment of encapsulated C3A hepatocytes functions in a fluidised bed bioreactor*. *Biotechnol Prog*, 20, 1204-1212, 2004.
- [28] Y. Gao, J. Xu, B. Sun, H.C. Jiang, *Microencapsulated hepatocytes and islets as in vivo bioartificial liver support system*. *World Journal of Gastroenterology*, 10 (14) : 2067-2071, 2004.
- [29] Y. Gao, H.C. Jiang, J. Xu, S.H. Pan, Y.D. Li, *Microencapsulating hepatocytes*. *Transplantation Proceedings*, 37 : 4589-4593, 2005.
- [30] S.J. Seo, T. Akaike, Y.J. Choi, M. Shirakawa, I.K. Kang, C.S. Cho, *Alginate microcapsules prepared with xyloglucan as a synthetic extracellular matrix for hepatocyte attachment*. *Biomaterials*, 26 : 3607-3615, 2005.
- [31] M. Ringel, M.A. Von Mach, R. Santos, P.J. Feilen, M. Brulport, M. Hermes, A.W. Bauer, W. Schormann, B. Tanner, M.R. Schön, F. Oesch, J.G. Hengstler, *Hepatocytes cultured in alginate microspheres : an optimized technique to study enzyme induction*. *Toxicology*, 206 : 153-167, 2005.
- [32] M. Desille, B. Frémond, S. Mahler, Y. Mallédant, P. Seguin, A. Bouix, Y. Lebreton, J. Desbois, J.P. Campion, B. Clément, *Improvement of the neurological status of pigs with acute liver failure by hepatocytes immobilized in alginate gel beads inoculated in an extracorporeal bioartificial liver*. *Transplantation Proceedings*, 33 : 1932-1934, 2001.
- [33] T. Haque, H. Chen, W. Ouyang, C. Martoni, B. Lawuyi, A. Urbanska, S. Prakash, *Investigation of a new microcapsule membrane combining alginate, chitosan, polyethylene glycol, poly-L-lysine for cell transplantation applications*. *Regenerative medicine*, 28 (6) : 641-637, 2005.
- [34] C. Selden, M. Khalil, H. Hodgson, *Three dimensional culture upregulates extracellular matrix protein expression in human liver cell lines – a step towards mimicking the liver in vivo ?* *The International Journal of Artificial Organs*, 23 (11) : 774-781, 2000.
- [35] S.M. Coward, C. Selden, A. Mantalaris, H.J.F. Hodgson, *Proliferation rates of HepG2 cells encapsulated in alginate are increased in a microgravity environment compared with static cultures*. *Artificial Organs*, 29 (2) : 152-158, 2004.
- [36] C. Legallais, E. Doré, P. Paullier, *Design of a Fluidized Bed Bioartificial Liver*. *Artificial Organs*, 24 (7) : 519-525, 2000.
- [37] B. David, E. Doré, M. Y. Jaffrin, C. Legallais, *Mass transfer in a fluidized bed bioreactor using alginate beads for a future bioartificial liver*. *International Journal of Artificial Organs*, 27 (4) : 284-93, 2004.

- [38] P.U. Foscolo, L.G. Gibilaro, S.P. Waldram, A unified model for particulate expansion of fluidised beds and flow in fixed porous media. *Chem Eng Sci* 38 (8), 1251-1260, 1983.
- [39] A. Hirata, F.B. Bulos, Predicting bed voidage in solid-liquid fluidization. *J Chem Eng Japan* 23 (5) : 599-604, 1990.
- [40] U.P. Ganguly, Direct method for the prediction of expanded bed height in liquid-solid fluidization. *Can J Chem Eng* 58 : 559-563, 1980.
- [41] J.F. Richardson, W.N. Zaki, Sedimentation and fluidization. *Trans Inst Chem Eng* 32 : 35, 1954.
- [42] V. Dixit, G. Gitnick, Artificial liver : State of the art, *Scand J Gastroenterol*, 31 Suppl 220 : 101-14, 1996.
- [43] V. Dixit, M. Arthur, R. Reinhardt, G. Gitnick, Improved Function of Microencapsulated Hepatocytes in a Hybrid Bioartificial Liver Support System, *Artificial Organs*, 16 (4) : 336-341, 1992.
- [44] D. Lewinska, S. Rosinski, D. Hunkeler, D. Poncelet, A. Werynski, Mass transfer coefficient in characterization of gel beads and microcapsules. *Journal of Membrane science*, 209 : 533-540, 2002.
- [45] B. David, L. Barbe, C. Legallais, D. Barthès-Biesel, Mechanical properties of alginate beads hosting hepatocytes in a fluidized bed bioreactor. *International Journal for Artificial organs*, 2006.
- [46] S.M. Coward, C. Legallais, B. David, M. Thomas, F. Tofteng, F. Larsen, H.J. Hodgson, C. Selden, Alginate-Encapsulated HepG2 Cells in a Pilot-Scale Fluidised Bed Bioreactor Maintain Performance in Human Liver Failure Plasma Making Them Suitable for Use in a Bioartificial Liver. *Artif. Organs*, 2006 (sous presse).

E. Synthèse

Nous avons vu que le foie est un organe dont l'implication est majeure dans le maintien de l'homéostasie en raison du nombre et de l'importance des fonctions métaboliques qu'il possède. Les hépatites aiguës voire fulminantes et les décompensations aiguës d'insuffisances chroniques sont susceptibles de provoquer une perte fonctionnelle pouvant remettre en cause le pronostic vital du patient. En raison du manque de greffons et du nombre de personnes en attente de transplantation, des systèmes transitoires extracorporels de suppléance doivent être mis au point afin de permettre l'attente de la greffe ou le rétablissement des fonctions hépatiques.

Les systèmes de détoxification purement artificiels ayant montré leurs limites dans la pratique clinique, un foie bioartificiel utilisant la fonctionnalité de cellules hépatiques dans un bioréacteur apparaît comme une alternative prometteuse. Les différentes équipes impliquées à l'heure actuelle dans ces travaux de recherche développent des approches variées, hébergeant les cellules :

- dans ou à l'extérieur des fibres creuses
- dans des matrices poreuses appelées « scaffolds »
- dans des billes ou capsules

Dans ce contexte, la microencapsulation des cellules paraît très attrayante. En effet, ce procédé permet d'une part d'isoler les cellules du système immunitaire du patient tout en maintenant des échanges bidirectionnels, et d'autre part de fournir aux cellules un environnement tridimensionnel favorable. Si l'on compare ce type de design aux autres configurations étudiées à l'heure actuelle, on notera de nombreux avantages et parmi ceux-ci, la simplicité de l'étape de changement d'échelle (« scaling up » ou « scaling down »), l'importance de la surface d'échange - d'autant plus importante que la taille des billes ou des capsules diminue -, et la possibilité de fluidiser les billes afin d'augmenter l'efficacité des transferts.

De surcroît, le développement de la cryoconservation profitera grandement à cette application de l'encapsulation qu'est le développement de foies bioartificiels, notamment en permettant un délai d'utilisation court du système lors de la survenue de la pathologie hépatique.

Cependant, il est à l'heure actuelle impossible de comparer différents systèmes car chaque équipe aborde le problème à sa « façon » en utilisant différents types cellulaires, différents biomatériaux, différentes structures...

F. Mise en place du projet

Notre laboratoire travaille depuis 8 ans à la mise au point d'un foie bioartificiel. Nous avons déjà évalué l'encapsulation d'hépatocytes C3A au sein de billes d'alginate, ces billes étant soumises à un mouvement de lit fluidisé dans un bioréacteur adapté (Doré, 1999). Nous avons mis en place un modèle *in vitro* se rapprochant des conditions cliniques d'utilisation (David, 2002). Nous souhaitons maintenant conforter notre expérience dans ce domaine en comparant différents systèmes, et en nous attachant plus particulièrement aux mécanismes d'écoulement et de transferts de masse au sein de ces systèmes. En effet, notre approche de type « bioingénierie » part de l'hypothèse que les fonctionnements peu efficaces de certains bioréacteurs proviennent de mauvaises conditions d'utilisation, et de la non compréhension des transferts s'y produisant. L'étude proposée est donc originale dans le contexte actuel de développement d'organes bioartificiels basés sur l'ingénierie tissulaire. En particulier, nous proposons de comparer les fonctionnalités de mêmes cellules (C3A) dans différents bioréacteurs :

- le lit fluidisé, en cherchant à optimiser la composition et la taille des billes d'alginate
- le microbioréacteur à fibres creuses représentant les systèmes développés par certaines équipes concurrentes, en étudiant l'impact du seuil de coupure des membranes et des modes de transfert employés (diffusif/convectif)
- le bioréacteur de type « air lift », utilisant aussi des billes d'alginate

Dans chaque système, on cherchera à caractériser les écoulements et les transferts de matière (nutriments, oxygène et métabolites), à la fois de façon expérimentale et théorique, en mettant en place des modèles mathématiques. Les études expérimentales ont été réalisées en 2 parties :

- étude des écoulements et des transferts diffusifs et convectifs en l'absence de cellules, avec un marqueur de poids moléculaire bien défini (vitamine B12)
- culture de cellules C3A dans les différents types de bioréacteurs, et caractérisation des transferts de certains métabolites consommés, sécrétés ou synthétisés par les hépatocytes, tels que l'ammoniaque, le lactate, le glucose, l'albumine et l'alpha-foetoprotéine

Notre objectif final est d'améliorer les conditions opératoires d'utilisation des cellules, et d'optimiser le type de bioréacteur le plus prometteur. Une partie des travaux a été réalisée dans le cadre du programme POLONIUM 2005-2008 avec l'Institut de Biocybernétique de Varsovie (équipe du Professeur Werynski,) et avec le service d'hépatologie du Royal Hospital de Londres (équipe du Professeur Hodgson et du Docteur Selden).

CHAPITRE II. LE BIOREACTEUR A LIT FLUIDISE UTILISANT L'ENCAPSULATION

A. Introduction

Cette partie s'attache à la caractérisation du bioréacteur à lit fluidisé. Nous cherchons en particulier à optimiser certains paramètres qui favorisent les transferts de masse. Dans le laboratoire, Emmanuel Doré a été le premier doctorant à travailler sur ce type de bioréacteur au foie bioartificiel, en s'attachant à la conception « mécanique » et la faisabilité de cette géométrie (Doré, 1999). Puis Bertrand David a mis en place et validé le modèle *in vitro* avec des hépatocytes de la lignée C3A, par l'étude des propriétés mécaniques, diffusives et métaboliques du foie bioartificiel à lit fluidisé (David, 2002).

A l'issue de ces travaux, des optimisations se sont avérées nécessaires pour améliorer l'efficacité d'un tel système en vue d'une application future *in vivo*. Elles concernent :

- a) le type d'alginate nécessaire pour encapsuler les cellules hépatiques.

Dans le domaine de l'ingénierie tissulaire, et collaborant avec l'équipe Biomatériaux-Biocompatibilité de l'UMR 6600 dirigée par le Professeur Nagel, nous sommes sensibilisés aux caractéristiques du biomatériau pouvant avoir une incidence sur la viabilité, la morphologie et les fonctionnalités cellulaires. Dans la littérature, différents types d'alginate sont utilisés selon leur degré de pureté, leurs caractéristiques chimiques : viscosité, rapports M/G, longueur des chaînes monomériques, et leur niveau de stérilité (Orive *et al.*, 2004 et 2006). E. Doré et B. David ont toujours utilisé dans leurs travaux l'alginate de faible viscosité avec une concentration de 2,2% provenant des *Macrocystis pyrifera* (Dore *et al.*, 1999 ; David *et al.*, 2004 et 2006). L'équipe de Clare Selden avec laquelle nous collaborons, utilise l'alginate de même provenance mais de moyenne viscosité (Khalil *et al.*, 2001 et Coward *et al.*, 2005). Il reste aussi d'autres sources disponibles commercialement, mais moins pertinentes en terme de coût, ou de disponibilité.

- b) la taille des billes d'alginate.

Dans les études précédentes, nous n'avions pas eu l'occasion de prendre en compte ce paramètre. Intuitivement, un diamètre plus petit devrait favoriser les échanges de métabolites et nutriments ainsi que l'oxygénation des cellules. Cependant, dans la bibliographie, aucune donnée n'est présente sur le diamètre optimal des billes à utiliser dans un système de foie

bioartificiel à lit fluidisé reposant sur l'encapsulation. Si l'on s'en réfère au tableau 3 intitulé « Différentes techniques pour la microencapsulation d'hépatocytes » du chapitre d'ouvrage sur la Microencapsulation présenté dans la partie bibliographique, les diamètres des billes fabriquées varient de 300 à 2000 μm , ce qui rend impossible la comparaison des résultats obtenus.

c) la technique d'encapsulation des cellules hépatiques.

Pour obtenir le système le plus performant dès le début de la fluidisation au sein du bioréacteur, nous nous sommes demandés si notre système d'encapsulation basé sur l'extrusion avec un flux d'air coaxial était le plus pertinent pour encapsuler ce type cellulaire. Pour répondre à cette question, nous nous sommes donc tournés vers une équipe de recherche compétente dans le domaine de la microencapsulation, à savoir l'équipe du Professeur Werynski de l'Institut de Biocybernétique de Varsovie.

Pour répondre à toutes ces interrogations, différentes campagnes d'expériences ont été menées en parallèle d'approches par modélisation des phénomènes physiques et biologiques. Nous présentons ci-après trois parties qui permettent de traiter tout d'abord de façon expérimentale, les points 1, 2 et 3. Puis nous abordons la modélisation des transferts et du comportement cellulaire, en rapport avec les points 1 et 2.

B. Optimisation de l'encapsulation et caractérisation des transferts de masse

1. Impact du type d'alginate et du diamètre des billes sur les transferts de masse et les activités métaboliques des cellules C3A encapsulées en vue d'une application à un foie bioartificiel

Cette partie de mes travaux de recherche est présentée sous la forme d'un article intitulé « Impact of alginate type and bead diameter on mass transfers and metabolic activities of encapsulated C3A cells for bioartificial liver applications », soumis au journal *Biomaterials* en 2008 et rédigé par A. Gautier, B. Carpentier, M. Dufresne, Q. Vu Dinh, P. Paullier, C. Legallais. J'ai pu à cette occasion travailler avec deux étudiants en Master 2 (B. Carpentier co-encadré avec C. Legallais) et Q. Vu Dinh (pour lequel j'ai assuré l'ensemble de l'encadrement, dans le contexte de ma thèse). Cet article a pour but de répondre aux points 1 et 2 cités dans le paragraphe précédent. Le type d'alginate et/ou le diamètre des billes sont-ils responsables de transfert de matière ou de comportements cellulaires différents ? A travers cet article, nous essayons de déceler une différence significative de ces paramètres en modifiant le diamètre des billes et le type d'alginate. L'étude bibliographique montre la pertinence de l'utilisation de l'alginate mais aussi l'absence de conclusion que l'on peut tirer par rapport à un choix « optimal » concernant sa composition. Dans la section « Materials and methods », sont décrites les différentes étapes : fabrication des billes, caractérisation des transferts de masse en absence et présence de cellules à l'aide de solutés de poids moléculaires définis (ammoniac, glucose, vitamine B12, albumine et alpha-foetoprotéine). Afin de chercher à améliorer les transferts de masse, deux viscosités d'alginate (faible et moyenne) provenant de *Macrocystis pyrifera* ont été testées et deux diamètres de billes (600 et 1000 μm) sont finalement étudiés sur 48 heures. Les résultats portent tout d'abord sur l'optimisation des paramètres opératoires pour la production de différents diamètres de bille avec le flux d'air coaxial. Puis, on caractérise les transferts de masse avec des billes vides. Enfin, on s'intéresse à la viabilité en début et fin d'expérience, ainsi qu'aux fonctionnalités des C3A en bioréacteur (consommation de glucose et synthèse d'ammoniac, d'albumine, d'alpha-foetoprotéine). Nous avons ainsi pu montrer que l'alginate de faible viscosité, sous une concentration de 2,2% permet d'atteindre nos objectifs en terme de qualité de billes (sphéricité, homogénéité du

diamètre, absence de résidus). En revanche, nous n'avons pas observé de gain significatif en terme de transferts de matière en réduisant la taille des billes, et donc le trajet de diffusion. Nous supposons que ce résultat contraire à notre attente initiale provient d'une différence de réticulation de l'alginate. Il conviendrait d'optimiser soit le temps de gélification des billes dans le bain de CaCl_2 , soit la concentration de Ca^{2+} pour essayer d'obtenir une structure moins dense, tout en cherchant à conserver les propriétés mécaniques nécessaires au bon déroulement de la perfusion.

Impact of alginate type and bead diameter on mass transfers and metabolic activities of encapsulated C3A cells for bioartificial liver applications

A. Gautier, B. Carpentier, M. Dufresne, Q. Vu Dinh , P. Paullier, C. Legallais

University of Technology of Compiègne ,UMR CNRS 6600, Laboratory of Biomechanics and Bioengineering, , Compiègne, France

Abstract

Liver assist devices have been developed in the last few decades to support patients with liver failure on the road to recovery or transplantation. Fluidized bed bioartificial livers – where liver cells are encapsulated within alginate beads – appear to be a valuable alternative to hollow fiber devices for improving mass transfers and enhancing treatment efficacy. This approach nevertheless deserves optimization in terms of bead production. The aim of this study was to investigate the impact of alginate type and bead diameter on mass transfers within beads and on the functions of encapsulated C3A cells.

After assessing the effect of the encapsulation process on bead quality, we investigated cell viability and metabolic activities (ammonia, albumin and α -fetoprotein synthesis, glucose consumption). They were successfully maintained over 48 hours within fluidized bed bioreactors, independently of alginate type and bead diameter. Mass transfers were not significantly influenced by the latter parameters. Finally, suggestions are made for improving the entrapment process as a means of enhancing the treatment efficiency of the fluidized bed bioartificial liver.

Keywords

Alginate, Microencapsulation, Hepatocyte, Cell activity, Tissue engineering, Bioartificial liver

a. Introduction

As the liver has various, fundamental metabolic activities, it is a central and vital organ. Acute and acute-on-chronic types of liver failure can result in life-threatening complications caused by decreased detoxification, storage and synthesis functions. Losses in liver functions may directly impact a patient's prognosis and short term survival. In these cases, liver transplantation is the only efficient treatment. The European Liver Transplant Registry references more than 2000 patients on the waiting list. This number increases by 10% per year, as does the number of deaths of patients waiting for a transplant. Extracorporeal liver assist devices have therefore been developed and evaluated in the last few decades to support and bridge critically ill patients on their road to either recovery or transplantation.

These liver assist devices are of two types: artificial and bioartificial livers [1]. Whereas artificial livers use mechanical and chemical components only to remove toxins, bioartificial livers combine artificial components and liver cells confined within bioreactors, ideally to restore all liver functions. For this particular application, numerous requirements must be satisfied in order to maintain, support and favor cell survival and functionality. Cells must be isolated from the external environment and immobilized within a favorable and biocompatible tri-dimensional scaffold. Cell morphology and organization must be as physiological as possible so that the cells can express most of their metabolic activities. Furthermore, the porous biomaterial should act as a semi-permeable barrier between the patient's blood or plasma and the liver cells. Small and medium molecules should be able to cross the barrier. Naturally, proper cell oxygenation is also always a prerequisite.

Different types and configurations of bioartificial livers are currently being investigated, most of them relying on semi-permeable hollow fiber modules [2]. Another option is to employ bioreactors derived from powder technology such as fluidized bed systems. These devices – where liver cells are entrapped within biocompatible spheroids such as beads or capsules – provide a suitable and valuable option for improving nutrient and oxygen transfers, favoring the intake and transformation of lethal toxins, as well as the release of essential proteins (e.g. albumin, coagulation factors, growth factors, specific binding proteins, ...) from the cell-containing beads to the fluid (Fig. 1).

Alginate is an unbranched natural copolymer composed of β -D-mannuronate (M) and α -L-guluronate (G), linked together by 1,4 bonds [3,4]. Due to its relative stability, biocompatibility, adjustable porosity and simplicity of use, alginate is thus a biomaterial of

choice when it comes to entrapping cells [3,5-9], cell therapy or to being used in medical devices [6,9-13]. Some of these studies were conducted with hepatocytes that were either encapsulated within alginate beads [13-17] or capsules [12,18,19], or seeded within alginate scaffolds [8,20]. More specifically, human hepatocyte cell lines entrapped inside alginate with high mannuronic acid content showed better secretion of albumin at 4 and 8 days of culture, compared to those entrapped in guluronic-rich alginate [21].

As a complement to the first feasibility studies [5,15], fluidized bed BAL (FBBAL) – based on alginate beads – merited optimization to ensure high levels of solute exchange to improve their efficiency and reduce treatment duration. Lessening bead size seemed worthwhile as a means of enhancing mass transfer. The decrease in bead diameter intuitively led to a reduction in diffusion distances as well as an increase in bead sample surface-to-volume ratio. The hypothesis nevertheless needed to be investigated, as well as the impact of alginate type and density on BAL functions.

The aim of this study was to compare mass transfer efficiency and the functionality of encapsulated C3A cells for various types of alginate and bead diameters. The alginates used were all composed of 69% mannuronate and 31% guluronate, a ratio that favors diffusion and promotes the transfer of substances [22]. David *et al.* also showed that this composition was satisfactory for safely entrapping cells in the surrounding fluid [23].

Before carrying out the biological studies, it was necessary to optimize the encapsulation process so as to produce well-formed alginate beads. Mass transfer efficacy was first determined using vitamin B12, a neutral low molecular weight marker that does not adsorb on alginate gels [22].

For future bioartificial liver applications, the feasibility of culturing liver cells (C3A cell line) within several types of alginate beads during an extended 48-hour period of time was also investigated for proof of adaptability to the three-dimensional environment. Morphology, viability and the metabolic activities of the liver cells were assessed throughout culture.

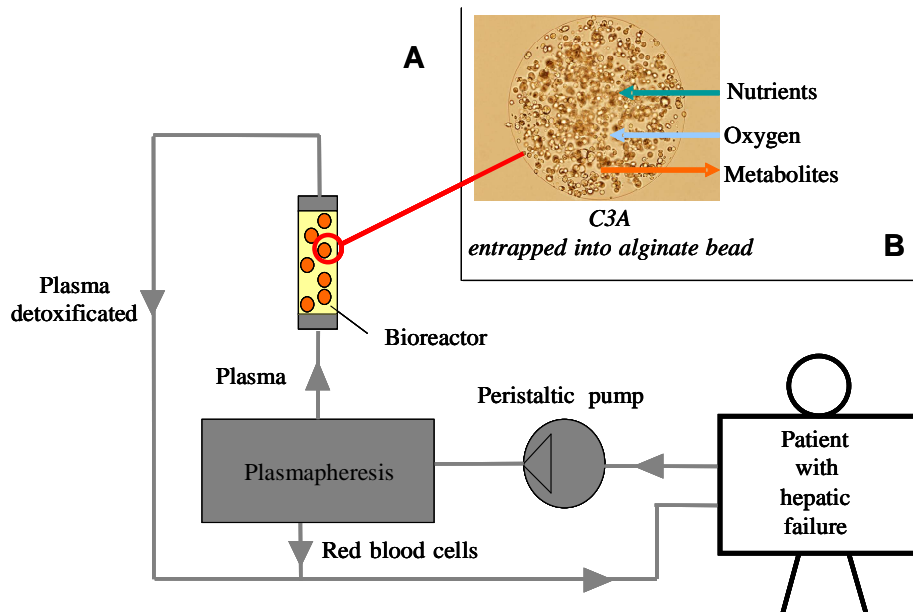


Figure 1 Principle of the fluidized bed bioartificial liver for liver support (A).

Patient's blood is withdrawn and separated into plasma and blood cells. Plasma is perfused through a fluidized bed bioreactor hosting hepatocytes in order to be detoxified. Plasma and blood cells are mixed again and returned to the patient. Transfers of nutrient, oxygen and metabolites through the alginate bead structure (B).

b. Materials and methods

A) Alginate bead production and C3A microencapsulation

1) Biochemical composition of alginate solutions

Two types of alginate from *Macrocystis pyrifera* (brown algae) were used: low viscosity (A0682, Sigma-Aldrich, France) and medium viscosity (A2033, Sigma-Aldrich, France). Their composition depends on both the mean molecular weight of the M and G monomers and alginate concentration. Low viscosity (LV) alginate sol was composed of monomeric chains whose molecular weight ranged from 12,000 to 80,000 Da, whereas medium viscosity alginate sol contained 80,000 to 120,000 Da chains. Table 1 summarizes the biochemical composition of the alginate solutions evaluated in this study.

To prepare these solutions, the alginate powder was dissolved in a sterile saline solution (154 mM NaCl solution buffered with 10 mM Hepes, pH 7.4). The mixture was subsequently filtered using a 0.2 μ m membrane leading to sterile alginate sol.

Type of alginate	Viscosity (cps, at 2% in water and 25°C)	M/G ratio	Chain length (Dalton)	Concentration (w/v ratio)
Low viscosity alginate 1% (LV 1%)	257	69/31	12,000 to 80,000	1 %
Low viscosity alginate 2% (LV 2%)	257	69/31	12,000 to 80,000	2 %
Low viscosity alginate 2.2% (LV 2.2%)	257	69/31	12,000 to 80,000	2.2 %
Medium viscosity alginate 1.5% (MV 1.5%)	3960	69/31	80,000 to 120,000	1.5 %

Table 1 Biochemical constitution of investigated alginate solutions

2) Preparation of cell-containing alginate suspensions

a) Cell subculture

C3A human hepatocellular carcinoma cells provided by the American Type Culture Collection (ATCC, reference CRL 10-741) were used to complete the study. C3A cells were cultivated in standard T75 Falcon culture flasks (Merk Eurolab, Strasbourg, France) in 15ml of complete culture medium: Minimum Essential Medium Earles salts (MEM) supplemented with 0.2% L-glutamine (200 mM), 0.5% penicillin-streptomycin (10,000 units/ml and 10,000 µg/ml, respectively), 1% nonessential amino acids (10 mM), 1% HEPES buffer solution (1M), 1% sodium pyruvate (100 mM) and 10% fetal calf serum, from Gibco (Cergy Pontoise, France). Cell numbers per flask ranged from 25 to 30 million at 80-90% confluence. The culture medium was replaced every 2 to 3 days. Cultures and subcultures were carried out as recommended by the ATCC in a 37°C and 5% CO₂ incubator.

b) Suspension of cells within alginate sol

C3A-containing alginate sols were prepared in a sterile environment. After trypsinization, 50 million C3A cells were isolated, and mixed with either 0.22g low viscosity or 0.15g medium viscosity alginate powder dissolved in a final volume of 10 ml of sterile saline solution. Cell density in the suspension was $5 \cdot 10^6$ cells per ml of alginate sol.

3) Alginate sol extrusion

Alginate beads were produced by means of an extrusion method using a homemade system (Fig. 2). 10 ml of a cell-free or cell-containing alginate solution (cell suspension) were extruded through the lumen of a needle using a roller pump (Ismatec IPC Type ISM934 VA.01). Overall, the extrusion stage lasted 6 min. Droplet diameter was controlled by applying a coaxial air flow. A mounting piece was specially designed to guide the air flow along the needle axis. Air flow intensity was adjusted using a flow meter (Sho-rate Emerson Electric S.A., France). Once formed, the alginate droplets fell into a calcium chloride gelation bath (154 mM NaCl, 10 mM HEPES, 115 mM CaCl₂) wherein they were immersed and reticulated for 15 minutes. Afterwards, the beads were rinsed twice with sterile saline solution. The cell-free beads were then stored in the same solution before use, whereas the

cell-containing beads were submitted to an additional step of rinsing with 70 ml of culture medium and finally placed in a culture vessel in which 15 ml of culture medium was added for transitory storage before the fluidization experiment. All steps were carried out in sterile conditions for C3A encapsulation.

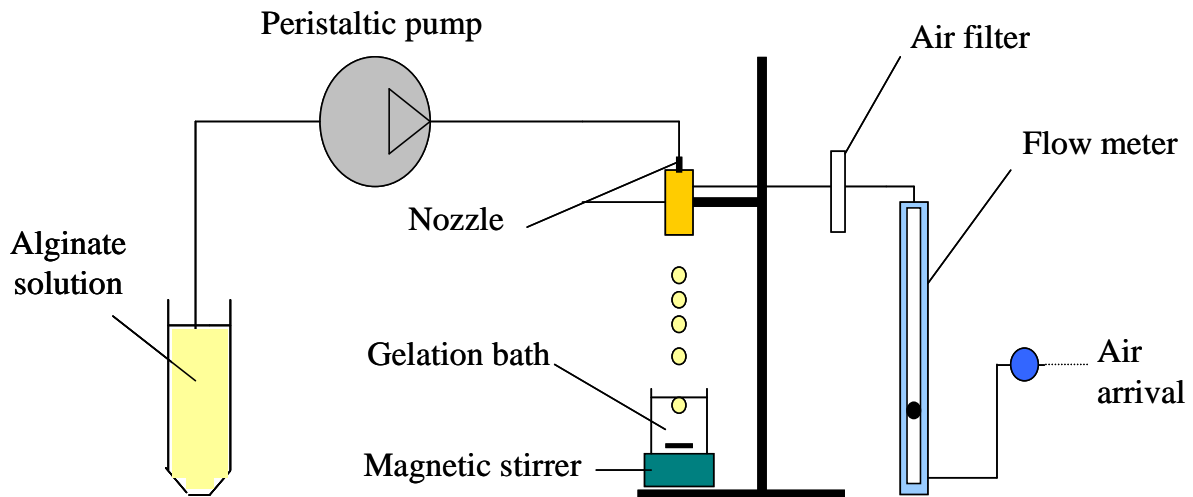


Figure 2 Scheme of the encapsulation setup.

The air flow can be adjusted to control droplet diameter during extrusion.

B) Dynamic culture of encapsulated C3A cells

1) Fluidized bed bioreactor

A macro-scale bioreactor was designed in our laboratory using Solid Works software. It was subsequently manufactured by Medicolab (Templemars, France), in glass so as to be autoclavable. The bioreactor is composed of a hollow column made of glass (1.35 cm internal diameter; 17 cm height) sealed with two water-tight perforated caps at its lower and upper limits through which penetrate the inlet and outlet channels respectively. The concept has been detailed thoroughly in a previous work [24,25].

2) Dynamic cell culture

Dynamic perfusion of the encapsulated cells was performed inside a closed-loop circuit incorporating the above-described bioreactor (Fig. 3). The fluidized bed bioreactor was connected to a perfusion loop by means of silicone tubing (1.3 mm internal diameter).

Following cell encapsulation, cell-housing alginate beads were placed inside the bioreactor via the upper port. The final volume of culture medium in the circuit was 42 ml. Cell-containing alginate beads were fluidized at 6 and 10 ml/min for 600 and 1000 μm beads respectively. Optimal fluidization of the bed of beads was thereby generated. The whole circuit excepting the pump was placed in an incubator at 37°C and 5% CO_2 and operated continuously for 48 hours.

Conventional static cultures within T75 vessels were performed as a reference for cell behavior.

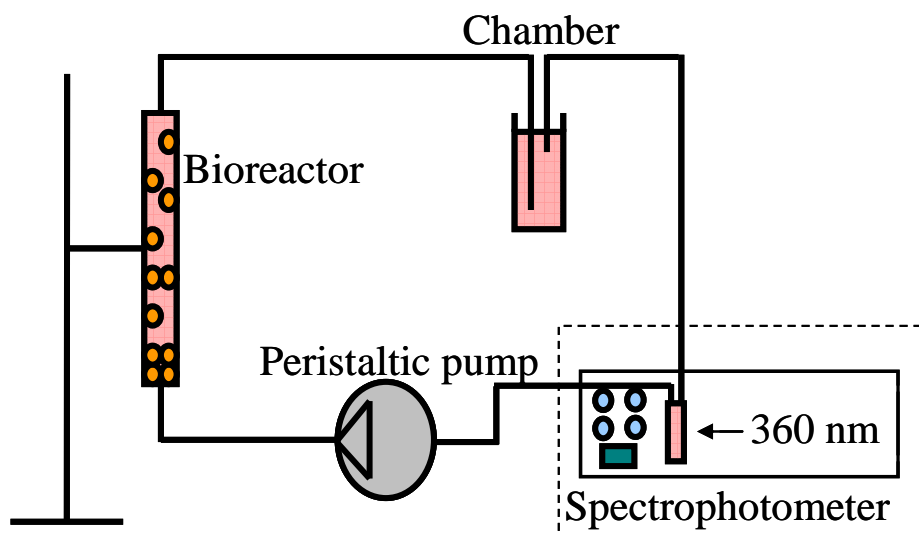


Figure 3 Experimental setup for dynamic assessment of mass transfer or dynamic culture of C3A cells within the fluidized bed bioreactor. The part limited by the dotted frame is only necessary for mass transfer experiments without cells. When dynamic culture is conducted, the whole set up except the pump is placed inside an incubator at 37°C and 5% CO_2 .

C) Mass transfer study within cell-free beads

Vitamin B12 was used as a middle molecular weight marker (1355 Da) to assess mass transfer phenomena within alginate beads devoid of cells. Mass transfer experiments were carried out either in static conditions within a spectrophotometric cell (Fig. 4) or in dynamic conditions within a fluidized bed bioreactor (Fig. 3). Vitamin B12 concentration decreased in the supernatant until a plateau was reached.

All the experiments were completed using vitamin B12-containing saline solutions (154 mM NaCl, 100 mg/L vitamin B12). Measurements were made in triplicate using a spectrophotometer at 360 nm.

1) Static conditions

A packed bed of beads - 7 mm high – was settled at the bottom of the spectrophotometric cell (Fig. 4). Packed bed porosity – the ratio between the liquid content of the bed of beads and its volume – was determined experimentally using larger samples of beads for accuracy reasons. Liquid content was thus estimated to be close to 40%. The NaCl solution was wholly removed immediately before the transfer experiment and replaced by 2.4 ml of vitamin B12 solution. Vitamin B12 absorbance was monitored for 6 hours. Measurements were carried out every 10 minutes for the first hour and every 30 minutes until the equilibrium was reached.

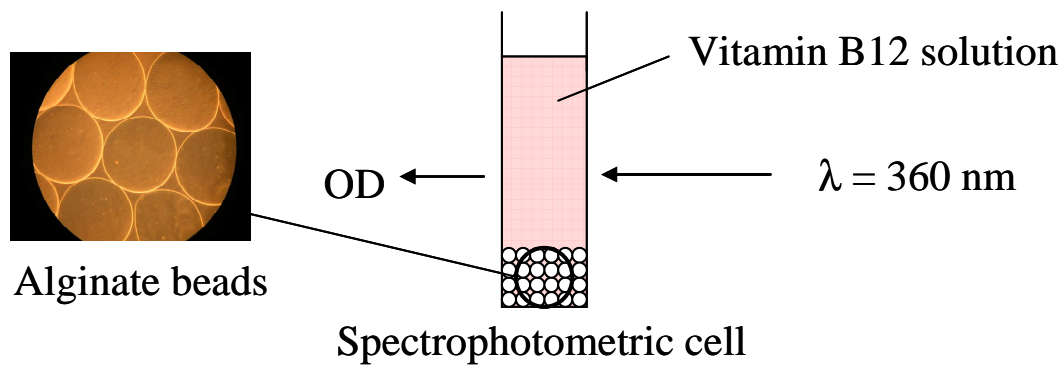


Figure 4 Setup for mass transfer assessment in static conditions. Beads are settled at the bottom of a spectrophotometric chamber. The optical density is measured at 360 nm. The beam crosses the chamber above bead level.

2) Dynamic conditions

Beads obtained from the extrusion of a 10 ml alginate solution were placed within the bioreactor column. The vitamin B12 solution was perfused through the column at a flow rate depending on bead diameter. The alginate beads were fluidized at the same flow rates as those used for the dynamic cell culture (cf. 2.2). The bioreactor was connected to a perfusion loop by means of silicone tubing (internal diameter = 1.3 mm). The circuit was composed of the bioreactor column, a peristaltic pump, a quartz spectrophotometric circulation cell and a chamber making satellite fraction entrapment possible (Fig. 3). The overall supernatant volume was 26 ml. Vitamin B12 absorbance was measured every 30 seconds for the first 10 minutes and every minute during the last 20 minutes. At 30 minutes, the equilibrium was reached in all cases.

3) Model for mass transfer

The model used to determine the mass transfer coefficient K has been fully described in a previous work [5]. Several hypotheses have been proposed for the model to be successfully solved: no adsorption of vitamin B12 on the alginate or the inner surfaces; vitamin B12 homogeneously distributed within the fluid (C_f) and bead accessible volume (C_b); pure diffusive transfers described by Fick's law. These hypotheses lead to eq. [1]:

$$\frac{\partial(V_f C_f)}{\partial t} = -\frac{\partial(V_a C_b)}{\partial t} = -KA(C_f - C_b) \quad [1]$$

with: K, mass transfer coefficient

A, exchange surface of beads

V_f , volume of fluid

V_a , accessible volume in the bead

D) Cell viability and functionality assessment

1) Viability assay

On static culture, cell counting was performed using Mallassez's chambers, and cell viability assessed using the Trypan Blue exclusion test.

Immediately after encapsulation and following fluidization, cell viability inside the beads was determined directly by means of fluorescence microscopy. Orange acridine and propidium iodide fluorescent dyes were used respectively to stain viable and dead cells. These dyes were able to penetrate the cell-housing beads making it possible to visualize living and dead cells respectively.

2) Biochemical assays

The biochemical assays were performed on samples taken from the supernatant.

Ammonia and glucose concentrations were determined with a biochemical automatus (Konelab 20, Thermo, Cergy-Pontoise, France) using kits from Randox (Mauguio, France) and Thermo (Cergy-Pontoise, France), respectively. The determination of ammonia concentration was based on this reaction: ammonia combines with α -ketoglutarate and

NADPH in the presence of glutamate dehydrogenase (GLDH) to yield glutamate and NADP⁺. To measure the concentration of glucose, this method uses glucose oxidase (GOD) and a modified trinder color reaction, catalyzed by the enzyme peroxidase (POD). Albumin content was assessed by means of a sandwich ELISA method. Goat anti-human albumin IgG antibodies were purchased from Cappel (MP Biomedicals, Solon, Ohio).

Alpha-fetoprotein levels were evaluated using a biochemical automatus (Modular Analytics E170, Roche, Meylan, France) plus a kit from Roche (Meylan, France). This analysis followed a “sandwich” method analysis consisting of a first incubation with an antigen which had been sandwiched between a specific monoclonal antibody marked with biotin and a specific monoclonal antibody marked with ruthenium. For the next incubation, streptavidine particles were added to the reaction. The immunological complex fixed to the solid phase by means of a streptavidine-biotin liaison.

E) Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the Kruskal-Wallis non-parametric test in order to compare the differences between groups. Differences were considered to be significant when $p < 0.05$ and are identified by *. The results are expressed as mean \pm standard error of the mean.

c. Results

F) Control and optimization of alginate bead production process

As explained previously, bead diameter was varied in order to investigate whether its reduction resulted in improved mass transfers through decreased diffusion length and increased surface-to-volume ratio. Bead production first had to be optimized to maintain bead quality independent of bead diameter and to reduce waste fractions (Fig. 5).

Bead diameter was adjusted with the coaxial air flow rate. Diameters ranging from 2000 to less than 600 μm can be obtained.

A rather linear relationship was obtained: the higher the air flow rate, the lower the bead diameter (Fig. 5B). The number of satellites – shapeless alginate fragments – increased with an air flow rate above 3700 ml/min, regardless of the type and concentration of the alginate sol. The last two parameters had very little effect on bead diameter.

Nevertheless, as shown in Fig. 5A, bead quality, bead shape and satellite fraction content were directly related to them. The sphericity of the beads shaped using a relatively low concentration of alginate was poorer than that of beads produced using twice that concentration. Many satellites were observed among bead samples generated from low concentration alginate.

Based on our results, LV 2.2% and MV 1.5% appeared to be the most promising formulations. They were appropriate for producing both 1000 μm and 600 μm beads. Fig. 5C shows bead diameter dispersion for 1000 μm and 600 μm beads produced from LV 2.2%. Although an increase in dispersion was noticeable with decreasing bead diameter, the diameter dispersion of 600 μm beads was still acceptable.

As a result of the above-mentioned limitations, 600 μm and 1000 μm were the minimal and maximal diameters chosen to satisfy the quality requirements (bead integrity and sphericity, reduced satellite fraction).

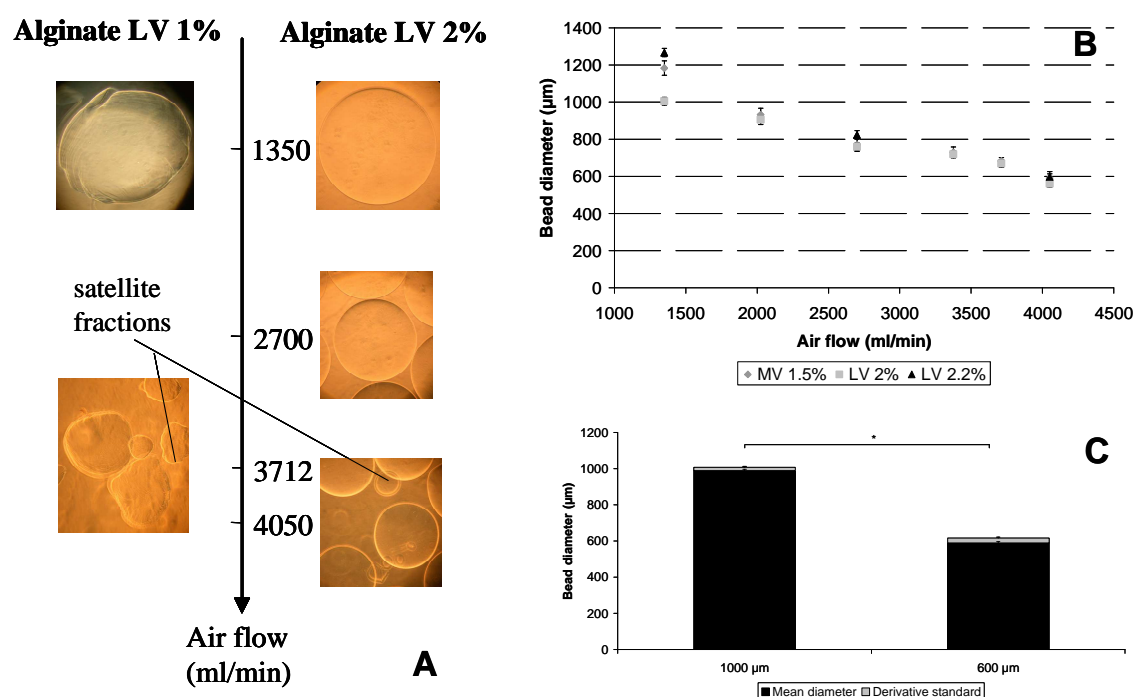


Figure 5 Optimization of bead production.

(A) Impact of alginate concentration and air flow on bead sphericity and satellite fraction content. (B) Effect of air flow on bead diameter. (C) Diameter dispersion as a function of bead size for LV 2.2%.

G) Mass transfer efficiency

The decrease in vitamin B12 concentration over time in the tank illustrated its migration from the solution to the bead's internal accessible volume. The transfer stopped as soon as both

concentrations equilibrated. Mass transfers were hindered in the alginate beads because of scaffold porosity.

Fig. 6 shows typical mass transfer curves obtained (A) in static conditions and (B) in dynamic conditions for 600 μm -LV 2.2%, 1000 μm -LV 2.2 % and 1000 μm -MV 1.5% beads.

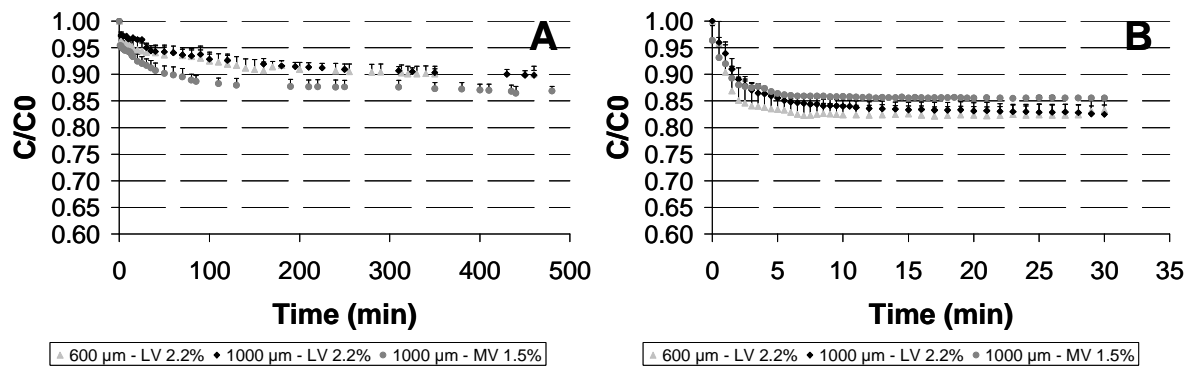


Figure 6 Vitamin B12 absorption curve (A) in static and (B) in dynamic conditions for beads 1000 μm produced with LV 2.2%.

The addition of perfusion led to a dramatic decrease in the delay before equilibrium. In dynamic conditions, the equilibrium was effectively attained 10 minutes after the initiation of perfusion whereas 6 hours were required in static conditions.

Using the mathematical model previously described, K could be successfully determined for the two selected types of alginate (LV 2.2% and MV 1.5%), for 600 and 1000 μm beads respectively. Coefficient K directly reflects mass transfer efficiency (Tables 2 and 3).

Type of alginate	LV 2.2%		MV 1.5%	
Bead diameter (μm)	600	1000	600	1000
K (10^{-7} m/s)	0.083 ± 0.017	0.164 ± 0.040	0.149 ± 0.067	0.235 ± 0.075

Table 2 Mass transfer coefficient K in static conditions as a function of bead diameter and alginate type.

Type of alginate	LV 2.2%		MV 1.5%	
Bead diameter (μm)	600	1000	600	1000
K (10^{-7} m/s)	3.718 ± 1.132	6.346 ± 1.664	2.563 ± 0.119	6.662 ± 0.152

Table 3 Mass transfer coefficient K in dynamic conditions as a function of bead diameter and alginate type.

In static conditions, vitamin B12 transfer was hindered more with LV 2.2% alginate than with MV 1.5%. This static trial thus helped in the analysis of pure diffusion transfer. Bead porosity seemed to be tighter in the high density alginate. When convection was added (dynamic trials), this discrimination disappeared.

In dynamic conditions, K coefficients were 50 and 20 to 30 times higher for 1000 and 600 μm beads, respectively, than in static conditions. This trend was independent of the type of alginate. In all cases, mass transfers were much more efficient under dynamic (Table 3) than under static conditions (Table 2) because of the combination of diffusion and convection phenomena. This phenomenon has already been described by David *et al.* for a single type of bead [5].

A decrease in bead diameter unexpectedly led to a reduction in mass transfer coefficients. This trend was moderated when the available exchange surface area A was taken into account: $K \times A$ (KA) values were found to be identical for both diameters (Fig. 7). This decrease was balanced by the rise in surface area leading to identical KA values for both bead diameters. Larger KA were nevertheless expected for 600 μm beads due to reduced diffusion length. The absence of difference could be due to the higher reticulation achieved for the 600 μm beads which stayed as long as the 1000 μm beads in the gelation bath. This effect will be analyzed further in the next section, where encapsulated cell behavior was investigated during the fluidization process.

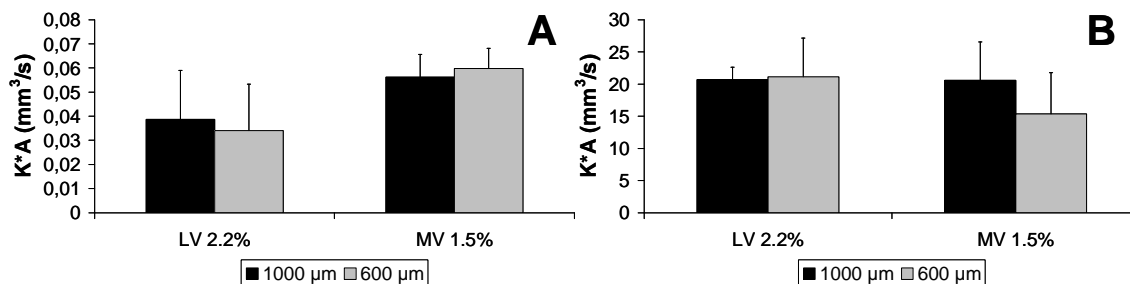


Figure 7 Mass transfer coefficient K times available surface area A in static (A) and dynamic (B) conditions.

H) C3A cell culture and functionality

Three types of beads were studied for the cell experiment in the FBBAL: 1000 μm -MV 1.5%, 1000 μm -LV 2.2 % and 600 μm -LV 2.2%.

I) Cell viability

Figs 8 and 9 show microscope pictures of the beads for cell viability before and after the fluidization process, respectively. After the whole encapsulation process, mortality ranged from 15 to 25% leading to an initial number of cells of 37.5 to 42.5 million. The stress generated by air extrusion partially damaged the cells and specific attention should be paid to controlling the production process.

After the perfusion process, cell viabilities within beads were $85 \pm 2\%$, $83 \pm 7\%$, $94 \pm 1\%$ for 1000 μm -MV 1.5%, 1000 μm -LV 2.2 % and 600 μm -LV 2.2%, respectively.

For all types of alginate beads, cell mortality was higher before fluidization compared to that observed at the 24 hour and 48 hour time points. The fluidization process did not alter cell viability. Between the beginning and the end of the fluidization process, no cell proliferation was observed in any type of alginate bead. This phenomenon was probably due to the cells being confined inside the alginate bead matrix and the short duration of the experiment.

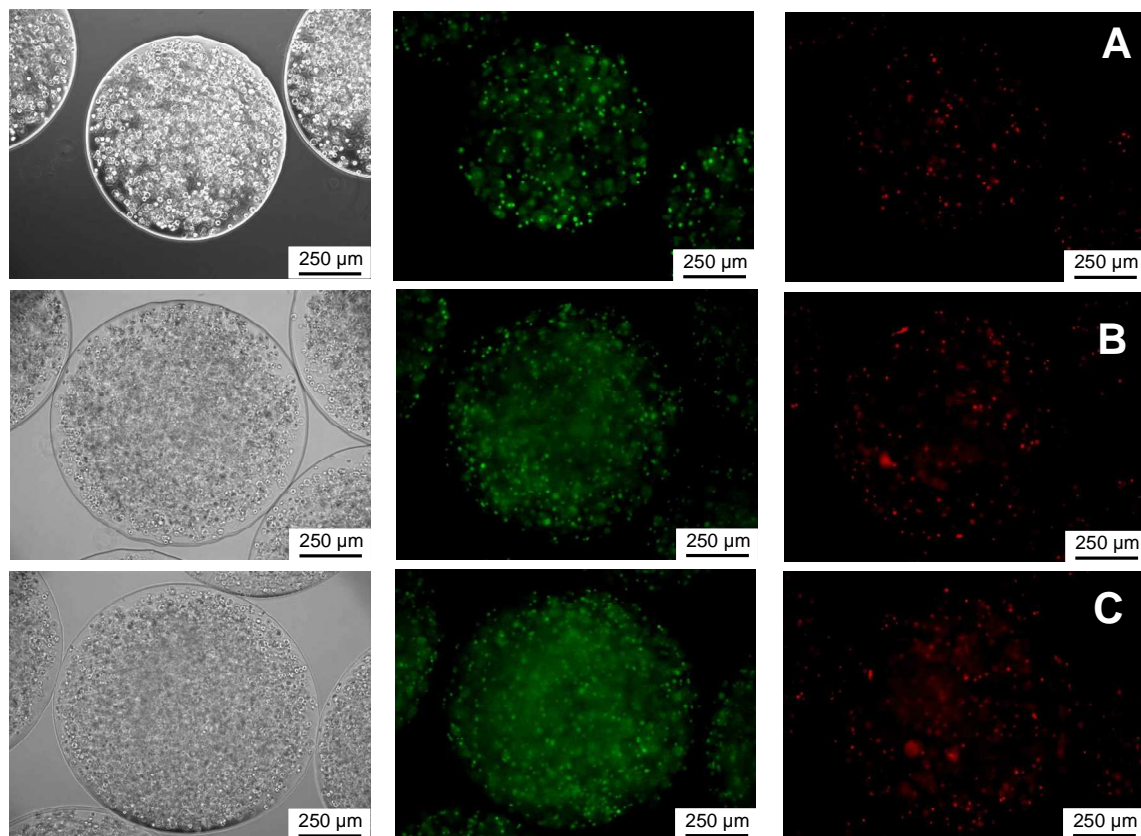


Figure 8 Phase and fluorescence microscopy images of C3A-hosting beads before fluidization. (A) 600 μm - LV 2.2%. (B) 1000 μm - LV 2.2%. (C) 1000 μm - MV 1.5%. Living cells are stained in green with orange acridine whereas dead cells in red using propidium iodide.

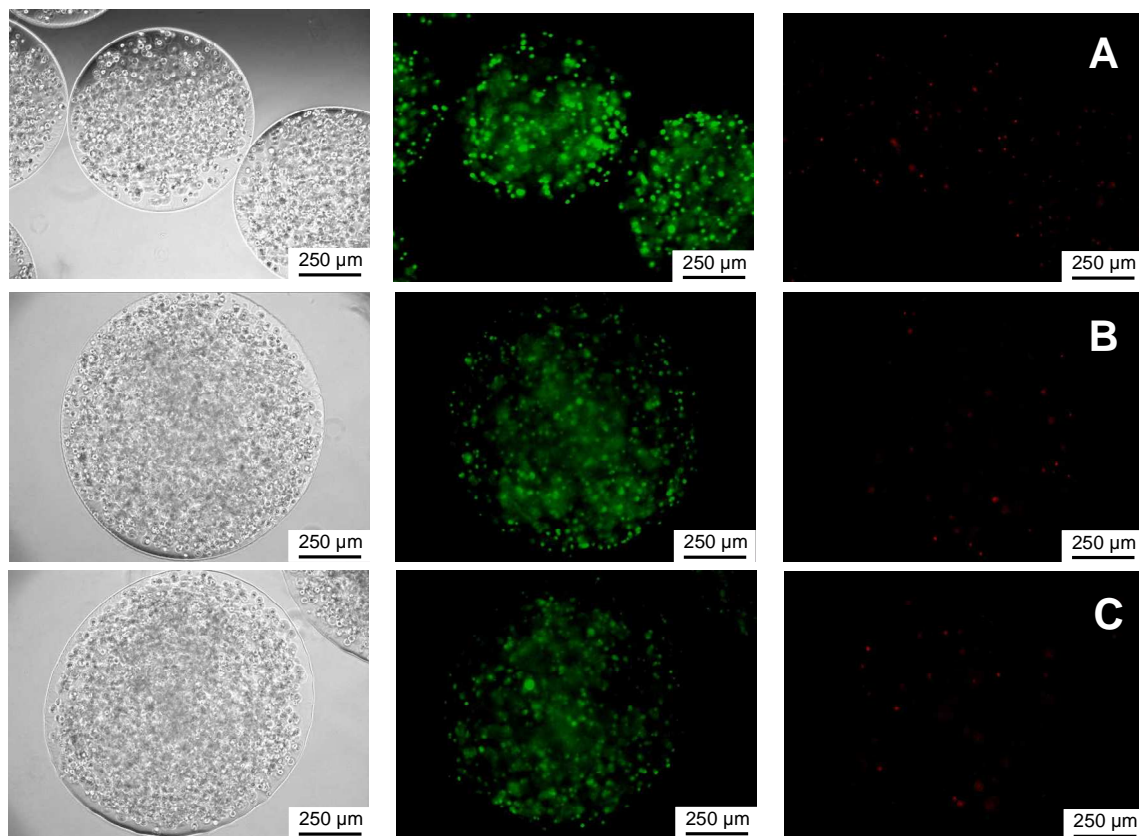


Figure 9 Phase and fluorescence microscopy images of C3A-hosting beads after fluidization. (A) 600 μm - LV 2.2%. (B) 1000 μm - LV 2.2%. (C) 1000 μm - MV 1.5%. Living cells are stained in green with orange acridine whereas dead cells in red using propidium iodide.

2) Effect of alginate type on cell functions in the FBBAL

First, we investigated the effect of alginate type - MV 1.5% and LV 2.2% - on cell metabolism in 1000 μm beads (Fig. 10). Cell functions were indirectly assessed by four parameters - glucose, ammonia, albumin and AFP concentrations - which were monitored in the supernatant. The curves show the amount consumed or released within 24 hours and in relation to the number of viable cells at the end of perfusion. Each experiment was repeated 6 times. The results in the flask were also reported as a control of cell activity under conventional culture conditions.

Glucose consumption (Fig. 10A) was not statistically different for cells cultured in MV 1.5% ($302.80 \pm 55.22 \mu\text{g}/24\text{h}/\text{million cells}$), in LV 2.2% ($422.21 \pm 114.91 \mu\text{g}/24\text{h}/\text{million cells}$) or in a flask ($350.53 \pm 84.41 \mu\text{g}/24\text{h}/\text{million cells}$). It can thus be considered to be independent of culture conditions. Glucose transfer was not hindered by the alginate scaffold.

In the case of ammonia (Fig. 10B), the amounts released were similar in MV 1.5% ($0.44 \pm 0.09 \mu\text{mol}/24\text{h}/\text{million cells}$), in LV 2.2% ($0.42 \pm 0.08 \mu\text{mol}/24\text{h}/\text{million cells}$) and in the

flask ($0.36 \pm 0.07 \mu\text{mol}/24\text{h}/\text{million cells}$). Due to its low molecular weight, ammonia solute could easily cross the alginate membrane and be found in the supernatant, as it was in the flask.

Albumin release (Fig. 10C) was comparable for both types of bead, but the amounts found in the supernatant were significantly reduced compared to classical culture ($602.42 \pm 226.72 \text{ ng}/24\text{h}/\text{million cells}$ for MV 1.5% and $1140.34 \pm 727.76 \text{ ng}/24\text{h}/\text{million cells}$ for LV 2.2%, *versus* $4450.18 \pm 1166.16 \text{ ng}/24\text{h}/\text{million cells}$ in the flask).

This difference was also observed for AFP (Fig. 10D). AFP releases were significantly lower for MV 1.5% alginate beads ($556.70 \pm 299.36 \text{ ng}/24\text{h}/\text{million cells}$) and LV 2.2% ($622.02 \pm 246.15 \text{ ng}/24\text{h}/\text{million cells}$) compared to the flask ($1914.84 \pm 964.02 \text{ ng}/24\text{h}/\text{million cells}$).

In summary, the results concerning glucose consumption, ammonia, albumin and AFP releases were not statistically different between either type of alginate. Alginate LV 2.2% was therefore selected for the second part of the study as bead production using it is of better quality and is also easier.

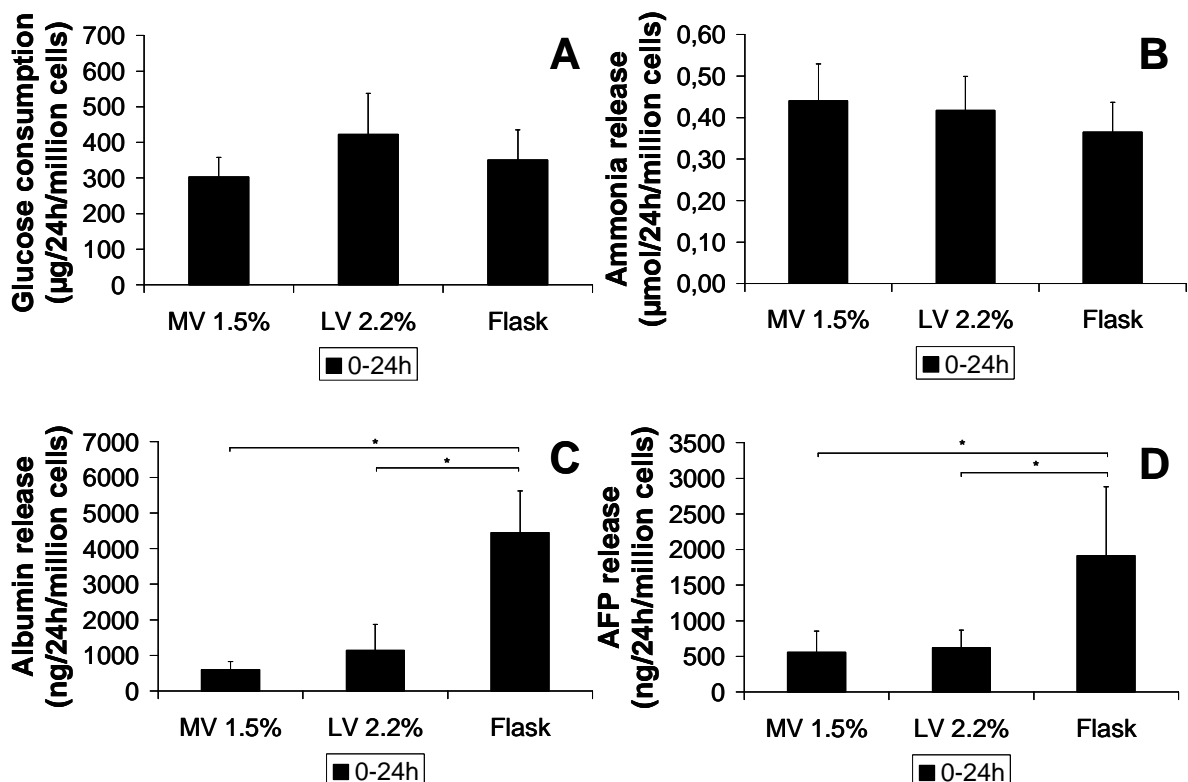


Figure 10 Impact of alginate type on C3A cell metabolism and functionality. (A) Glucose consumption. (B) Ammonia, (C) albumin and (D) AFP releases.

3) Effect of bead diameter on cell functions in the FBBAL

We then studied the impact of bead diameter - 600 and 1000 μm - on cell metabolism in alginate LV 2.2% (Fig. 11). The experiments were prolonged to 48-hour perfusion.

Between 0-24 hours of fluidization, glucose consumption (Fig. 11A) was not significantly different for cells cultured in 600 μm beads ($501.88 \pm 38.68 \mu\text{g}/24\text{h}/\text{million cells}$) or in 1000 μm beads ($422.21 \pm 114.91 \mu\text{g}/24\text{h}/\text{million cells}$). Between 24-48 hours of perfusion, glucose consumption significantly decreased in the same proportion for both types of bead. This could reflect modifications in metabolism. It should be noted that glucose concentration was very low in the supernatant after 24 hours of perfusion, which could lead to an alteration in cell metabolism ($2.77 \pm 0.40 \text{ mmol/l}$ for 600 μm beads and $2.92 \pm 0.51 \text{ mmol/l}$ for 1000 μm beads).

The release of ammonia (Fig. 11B) between 0-24 hours of fluidization, was not statistically different for 600 μm beads ($0.40 \pm 0.12 \mu\text{mol}/24\text{h}/\text{million cells}$) and 1000 μm beads ($0.42 \pm 0.08 \mu\text{mol}/24\text{h}/\text{million cells}$). Between 24-48 hours of perfusion, ammonia release decreased for both types of bead, probably because of the deficit in glucose.

For high molecular weight solutes, the results did not follow the same trend. Figs 11C and 11D revealed that albumin and AFP releases from the beads to the medium were still occurring after 48 hours. This could be explained by a delayed release of these proteins – because of the porous structure of the alginate beads – although there might already have been an impact on synthesis. It was all the more obvious for AFP: a higher amount was liberated on day 2 while synthesis ought to be lower than during the first 24-hour period (Fig. 11D).

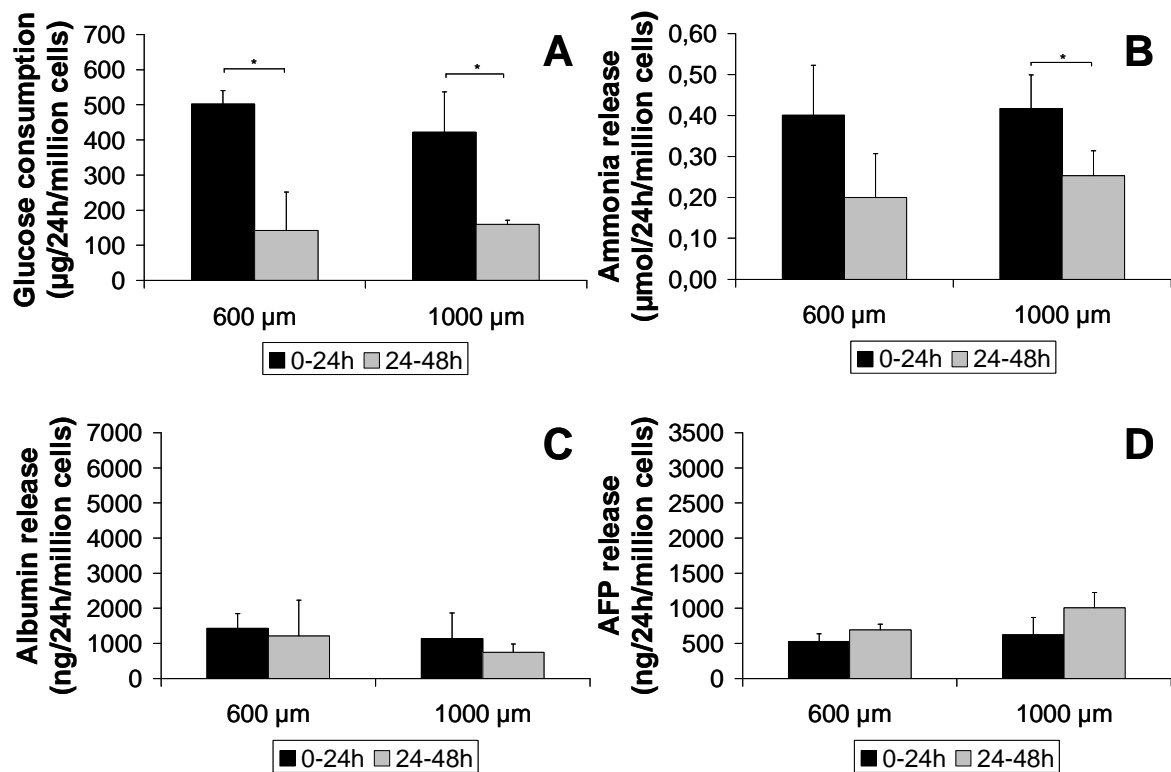


Figure 11 Impact of bead diameter on C3A cell metabolism and functionality using LV 2.2%. (A) Glucose consumption. (B) Ammonia, (C) albumin and (D) AFP releases.

d. Discussion

Dynamic culture in a fluidized bed bioreactor appears to be a valuable technique for maintaining cell viability and functions for at least 48h, if sufficient quantities of glucose are provided.

It is clear that the molecular weight of the solutes has a direct impact on their ability to migrate through the porous structure of the gel. Low to middle molecular weight solutes, such as glucose, ammonia or vitamin B12, can easily cross the alginate membrane, regardless of the type of alginate (LV or MV). Their sieving coefficient is almost 1. For larger molecules such as albumin and AFP, transfers are more difficult and delayed, but still take place, indicating that the bead cut off is greater than the size of albumin (60,000 Da). Other studies performed by Clement *et al.* have already shown that the bead structure was impermeable to immunoglobulins [26,27]. These results therefore completely satisfy the requirements for future BAL applications.

According to Zmora *et al.*, pore architecture in 3-D alginate scaffolds plays a critical role in hepatocyte organization inside a functioning tissue [8]. Consequently, hepatocyte microencapsulation was investigated with two types of alginate (LV or MV) and with

different diameters (final choices: 600 or 1000 μm), taking into consideration the fact that alginate structure may have an environmental impact on cell viability, morphology and metabolism. Under the conditions of the study, these effects were not observed. Beads with a diameter of 1000 μm produced from LV 2.2% had many advantages: good quality, high resistance, easy to produce. For future BAL applications, bead diameter 1000 μm and alginate type LV 2.2% are therefore recommended in comparison with LV 2.2% beads with a diameter of 600 μm and MV 1.5% beads with a diameter of 1000 μm .

In the present experiments, cells were not found to proliferate inside any type of alginate beads after the 48 hours of the experiment. Murtas *et al.* also demonstrated the absence of hepatocyte proliferation with two types of alginate from *Laminaria hyperborea* (content: 68% of guluronic acid (G)) and *Macrocystis pyrifera* (content: 44% of G, medium viscosity) at 2% concentration over a short period [28]. However, we qualitatively observed C3A proliferation inside alginate beads under static conditions over a longer period of time (after 7 and 14 days of culture) [17]. Khalil *et al.* and Coward *et al.* also showed that HepG2 cells proliferate in 400 μm beads made of a lower alginate concentration (1%) for 10-20 days [21,29]. These different results suggest that cell proliferation can be obtained, provided that alginate concentration is not too high and that a sufficient delay is given. For future BAL applications, two different approaches to cell encapsulation could thus be considered: 1) start with a low number of cells and let them grow inside an appropriate culture device; 2) prepare a larger amount of cells in advance, and directly encapsulate the number requested.

Finally, our first hypothesis that diameter reduction would result in accelerated transfer was not confirmed, for any type of solute in either empty or loaded beads. Martinsen *et al.* showed that two factors have an impact on the volume reduction of the beads after the gelation process: 1) the concentration in CaCl_2 (the higher the concentration, the more significant the volume reduction); 2) the gelation time (the percentage of volume reduction of the alginate beads increased with incubation time) [30]. In our case, the CaCl_2 concentration as well as the gelation time were set for the 1000 μm beads used in our previous studies. Under these conditions, the 600 μm alginate bead matrix may have been too compact and the transfers minimized. In future studies, these two parameters could be adjusted, keeping in mind that the reduction of CaCl_2 concentration or gelation time could lead to higher bead porosity and better permeability, as expected, but also to a lack of mechanical stability or to the absence of core gelation.

Biochemical modifications might also be considered to improve the interaction between the cells and the alginate biomaterial [31,32]. Of the options, RGD sequences could be grafted on

to the material to favor cell adhesion and metabolism. With an RGD amino acid sequence immobilized on polyethersulfone membranes, De Bartolo *et al.* show the benefits in terms of the adhesion, proliferation and albumin synthesis of primary human hepatocytes [33].

e. Conclusion

The extrusion method with co-axial air flow was successfully adjusted to produce beads 600 and 1000 μm in diameter from different types of alginate - low and medium viscosity - ensuring their integrity and their sphericity, and above all without the presence of satellite fractions.

Encapsulated cells were able to survive in the alginate network and maintained their metabolic activity for a relatively long period. C3A metabolic activities were found to be close for both types of alginate and both bead diameters. This study showed that bead diameter and alginate type do not seem to influence mass transfer efficiency for either empty beads or C3A-entrapping beads. Although this was expected because of the decrease in diffusion distances, the lessening in bead diameter did not lead to improvement in mass transfers.

The gelation phase of the beads during the encapsulation process can nevertheless be optimized to increase bead porosity and favor mass transfer. Beads with a diameter of 1000 μm offer a reliable entrapment process for hepatocytes that are to be used in a fluidized bed bioartificial liver.

f. Acknowledgement

The authors would like to thank Dr. Delavenne for his kind assistance, as well as Dr. Sanchez (Compiègne Hospital) whose precious help in analyzing the AFP marker was greatly appreciated. They would also like to thank P. Georgin, M. Gouet and G. Le Pape for developing the statistical analysis tools accessible on AnaStats.fr. Thanks are also given to Kirsty Snaith for reading and correcting the English.

g. References

- [1] Legallais C, Gautier A, Dufresne M, Carpentier B, Baudoin R. The place of adsorption and biochromatography in extracorporeal liver support systems. *Journal of Chromatography B* 2008;861:171-76.
- [2] Legallais C, David B, Dore E. Bioartificial livers (BAL): current technological aspects and future developments. *Journal of Membrane Science* 2001;181:81-95.
- [3] Garbayo I, Leon R, Vilchez C. Diffusion characteristics of nitrate and glycerol in alginate. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2002;25:1-9.
- [4] Bajpai SK, Sharma S. Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca^{2+} and Ba^{2+} ions. *Reactive and Functional Polymers* 2004;59:129-40.
- [5] David B, Doré E, Jaffrin MY, Legallais C. Mass transfer in a fluidized bed bioreactor using alginate beads for a future bioartificial liver. *International Journal of Artificial Organs* 2004;27:284-93.
- [6] Wikstrom J, Elomaa M, Syvajarvi H, Kuokkanen J, Yliperttula M, Honkakoski P, et al. Alginate-based microencapsulation of retinal pigment epithelial cell line for cell therapy. *Biomaterials* 2008;29:869-76.
- [7] Zimmermann H, Wehlisch F, Baier C, Westhoff M, Reuss R, Zimmermann D, et al. Physical and biological properties of barium cross-linked alginate membranes. *Biomaterials* 2007;28:1327-45.
- [8] Zmora S, Glicklis R, Cohen S. Tailoring the pore architecture in 3-D alginate scaffolds by controlling the freezing regime during fabrication. *Biomaterials* 2002;23:4087-94.
- [9] De Vos P, Faas MM, Strand B, Calafiore R. Alginate-based microcapsules for immunoisolation of pancreatic islets. *Biomaterials* 2006;27:5603-17.

- [10] Orive G, Tam SK, Pedraz JL, Halle JP. Biocompatibility of alginate-poly-l-lysine microcapsules for cell therapy. *Biomaterials* 2006;27:3691-00.
- [11] Ueyama Y, Ishikawa K, Mano T, Koyama T, Nagatsuka H, Suzuki K, et al. Usefulness as guided bone regeneration membrane of the alginate membrane. *Biomaterials* 2002;23:2027-33.
- [12] Orive G, Hernandez RM, Rodriguez Gascon A, Calafiore R, Chang TM, De Vos P, et al. History, challenges and perspectives of cell microencapsulation. *Trends in Biotechnology* 2004;22:87-92.
- [13] Gao Y, Jiang HC, Xu J, Pan SH, Li YD. Microencapsulating hepatocytes. *Transplantation Proceedings* 2005;37:4589-93.
- [14] Selden C, Shariat A, McCloskey P, Ryder T, Roberts E, Hodgson H. Three-dimensional in vitro cell culture leads to a marked upregulation of cell function in human hepatocyte cell lines-an important tool for the development of a bioartificial liver machine. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 1999;875:353-63.
- [15] David B, Dufresne M, Nagel MD, Legallais C. In vitro assessment of encapsulated C3A hepatocytes functions in a fluidised bed bioreactor. *Biotechnol Prog* 2004;20:1204-12.
- [16] Kinasiewicz A, Gautier A, Lewinska D, Bukowski J, Legallais C, Werynski A. Culture of C3A Cells in Alginate Beads for Fluidized Bed Bioartificial Liver. *Transplantation Proceedings* 2007;39:2911-13.
- [17] Kinasiewicz A, Gautier A, Lewinska D, Smietanka A, Legallais C, Werynski A. Three-dimensional growth of human hepatoma C3A cells within alginate beads for fluidized bioartificial liver. *The International Journal of Artificial Organs* 2008;31:340-47.
- [18] Canaple L, Nurdin N, Angelova N, Saugy D, Hunkeler D, Desvergne B. Maintenance of primary murine hepatocyte functions in multi component polymer capsules – in vitro cryopreservation studies. *Journal of Hepatology* 2001;34:11-18.

- [19] Haque T, Chen H, Ouyang W, Martoni C, Lawuyi B, Urbanska A, et al. Investigation of a new microcapsule membrane combining alginate, chitosan, polyethylene glycol, poly-L-lysine for cell transplantation applications. *Regenerative medicine* 2005;28:631-37.
- [20] Seo SJ, Kim IY, Choi YJ, Akaike T, Cho, CS. Enhanced liver functions of hepatocytes cocultured with NIH 3T3 in the alginate/galactosylated chitosan scaffold. *Biomaterials* 2006;27:1487-95.
- [21] Khalil M, Shariat-Panahi A, Tootle R, Ryder T, McCloskey P, Roberts E, et al. Human hepatocyte cell lines proliferating as cohesive spheroid colonies in alginate markedly upregulate both synthetic and detoxificatory liver function. *Journal of Hepatology* 2001;34:68-77.
- [22] Lewinska D, Rosinski S, Hunkeler D, Poncelet D, Werynski A. Mass transfer coefficient in characterization of gel beads and microcapsules. *Journal of Membrane Science* 2002;209:533-40.
- [23] David B, Barbe L, Barthes-Biesel D, Legallais C. Mechanical properties of alginate beads hosting hepatocytes in a fluidized bed bioreactor. *International Journal for Artificial organs* 2006;29:756-63.
- [24] Dore E, Legallais C. A new concept of bioartificial liver based on a fluidized bed bioreactor. *Ther. Apher.* 1999;3:264-67.
- [25] Legallais C, Dore E, Paullier P. Design of a Fluidized Bed Bioartificial Liver. *Artificial Organs* 2000;24:519-25.
- [26] Clement B, Desille M, Fremond B, Champion JP, Guguen-Guillouzo C, Bourel M. Hepatocytes en therapie cellulaire. *Transfusion Clinique et Biologique* 1998;5:80-87.
- [27] Fremond B, Joly A, Desille M, Desjardins JF, Champion JP, Clement B. Cell-based therapy of acute liver failure: the extracorporeal bioartificial liver. *Cell Biol. Toxicol.* 1996;12:325-329.

- [28] Murtas S, Capuani G, Dentini M, Manetti C, Masci G, Massimi M, et al. Alginate beads as immobilization matrix for hepatocytes perfused in a bioreactor : a physico-chemical characterization. *J. Biomater. Sci. Polymer. Edn.* 2005;16:829-46.
- [29] Coward SM, Selden C, Mantalaris A, Hodgson HJ. Proliferation rates of HepG2 cells encapsulated in alginate are increased in a microgravity environment compared with static cultures. *Artificial Organs* 2005;29:152-58.
- [30] Martinsen A, Skjak-Braek G, Smidsrod O. Alginate as immobilization material: I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. *Biotechnology and Bioengineering* 1989;33:79-89.
- [31] Yang j, Goto M, Ise H, Cho CS, Akaike T. Galactosylated alginate as a scaffold for hepatocytes entrapment. *Biomaterials* 2002;23:471-79.
- [32] Quek CH, Li J, Sun T, Chan MLH, Mao HQ, Gan LM, et al. Photo-crosslinkable microcapsules formed by polyelectrolyte copolymer and modified collagen for rat hepatocyte. *Biomaterials* 2004;25:3531-40.
- [33] De Bartolo L, Morelli S, Lopez LC, Giorno L, Campana C, Salerno S, et al. Biotransformation and liver-specific functions of human hepatocytes in culture on RGD-immobilized plasma-processed membranes. *Biomaterials* 2005;26:4432-41.

2. Effet d'une nouvelle technique d'encapsulation basée sur un champ électrostatique

a. Introduction

Nous avons vu précédemment que la production de billes d'alginate par la technique d'extrusion par jet d'air coaxial, simple à mettre en œuvre, est toutefois délicate à contrôler. L'équipe du Professeur Werynski de l'Institut de Biocybernétique et d'Ingénierie Biomédicale (IBIB) en Pologne est reconnue internationalement pour ses travaux sur l'encapsulation (Lewinska *et al.*, 2002 et 2005). Nous avons donc commencé une collaboration en 2005 avec cette équipe afin de réaliser notre projet : tester une nouvelle méthode d'encapsulation des hépatocytes. En effet, ce laboratoire de recherche possède un système d'encapsulation basé sur un champ électrostatique. Le projet consiste à comparer nos deux méthodes d'encapsulation afin de déterminer la plus prometteuse en vue de notre application finale. Lors d'échanges bilatéraux, nous avons pu : 1) avec le Docteur D. Lewinska, travailler à la mise au point de l'encapsulation des C3A, 2) avec le Docteur A. Kinasiewicz, implémenter notre technologie de bioréacteur à lit fluidisé en Pologne. Ces études ont été en partie soutenues par un projet Polonium financé par le Ministère des Affaires Etrangères, puis par un programme PAN-CNRS (2007-2009). Ci-après, nous décrivons tout d'abord la méthode employée à l'IBIB, puis nous abordons une première étude de faisabilité décrivant les résultats obtenus avec les C3A. En fin nous présentons les résultats obtenus avec des cultures sur du long terme.

b. Matériels et méthodes

Dans un premier temps, nous avons voulu évaluer la faisabilité et la pertinence de cette technique basée sur le champ électrostatique. Nous avons utilisé le type cellulaire habituel C3A et le même type d'alginate à 2,2%. Les cellules C3A ont donc été encapsulées grâce à ce système basé sur une différence de potentiel (U) permettant ainsi de former les billes d'alginate. Un champ électrostatique est créé par la différence de potentiel entre l'aiguille qui se trouve au bout de la seringue chargée positivement et le bain de gélification chargé négativement (figure 12). Plus la différence de potentiel est importante, plus les billes sont

attirées rapidement dans le bain de gélification et plus leur diamètre est faible. Dans le système développé à l'UTC, c'est le flux d'air coaxial qui crée une force de poussée détachant la goutte de l'extrémité de la buse (figure 13).

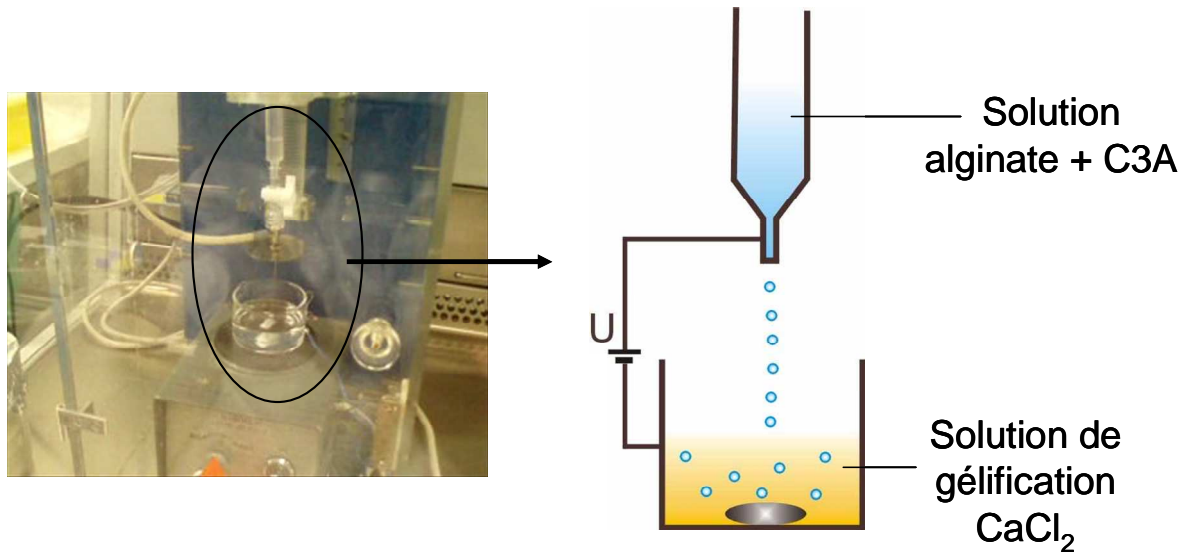


Figure 12 Système d'encapsulation développé à l'IBIB basé sur un champ électrostatique. Photo du dispositif (à gauche) et schéma détaillé du concept (à droite).

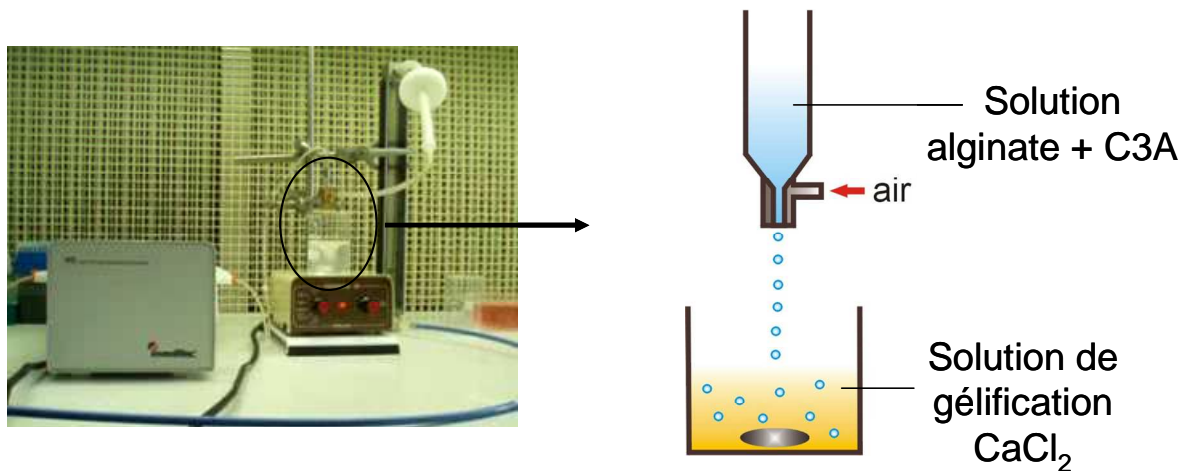


Figure 13 Système d'encapsulation développé à l'UTC basé sur une extrusion à flux d'air coaxial. Photo du dispositif (à gauche) et schéma détaillé du concept (à droite).

c. Etude de faisabilité : mise au point de la technique et résultats préliminaires

Cette étude a fait l'objet d'une publication en 2007 dans le journal *Transplantation Proceedings* (Kinasiewicz *et al.*, 2007). Cette technique montre des résultats encourageants

aussi bien au niveau de la viabilité cellulaire qu'au niveau de la consistance, de l'intégrité et de la stabilité des billes d'alginate. Nous avons donc voulu prolonger l'étude en cultivant ces cellules hébergées au sein de ces billes en bioréacteur à lit fluidisé pour observer leur comportement au long terme. La synthèse d'albumine a été évaluée après 24 heures et sept jours, en bioréacteur à lit fluidisé et en culture conventionnelle (flasque), prouvant que les cellules n'ont pas été endommagées et que leur métabolisme, en particulier la synthèse d'albumine, n'a pas été altéré lors de l'encapsulation. Si nous comparons cette fonctionnalité cellulaire entre les cellules encapsulées par la méthode électrostatique et la méthode par extrusion à flux d'air coaxial, les résultats sont très proches : Dans le chapitre II, paragraphe b,C,2), la quantité d'albumine relarguée par les cellules encapsulées par la méthode dite « extrusion à flux d'air coaxial » dans l'alginate de faible viscosité (LV) après 24 heures de fluidisation est de $1140,34 \pm 727,76$ ng/24h/million de cellules (ce qui équivaut à $47,51 \pm 29,93$ ng/h/million de cellules). Dans cet article, la quantité d'albumine relarguée par les cellules encapsulées par la méthode dite « électrostatique » après 24 heures de fluidisation s'élève à $72,9 \pm 31,4$ ng/h/million de cellules. La viabilité cellulaire et le métabolisme des C3A ont été étudiés sur 7 jours de fluidisation au sein du bioréacteur confirmant la faisabilité et la pertinence de cette nouvelle technique. Nous avons de plus montré une activité beaucoup plus intense à 7 jours par rapport aux premières 24 heures, déjà observée par exemple par l'équipe du Docteur Selden avec un autre type de billes de diamètre 400 μm et un autre type cellulaire, Hep G2 (Coward *et al.*, 2005 et Khalil *et al.*, 2001).

Nous avons donc par la suite souhaité poursuivre ces investigations dans ce sens (partie c).



Culture of C3A Cells In Alginate Beads for Fluidized Bed Bioartificial Liver

A. Kinasiewicz, A. Gautier, D. Lewinska, J. Bukowski, C. Legallais, and A. Weryński

ABSTRACT

Extracorporeal bioartificial liver has been designed to sustain the detoxification and synthetic function of the failed liver in patients suffering from acute liver failure until the time of liver allotransplantation or regeneration of their own. A fluidized bed, bioartificial liver improves the mass transfer velocity between the medium and the hepatocytes. Detoxification functions of the liver could be replaced by completely artificial systems, but the synthetic functions of hepatocytes may be obtained only by metabolically active cells. The aim of our study was to investigate the influence of C3A cell culture in alginate beads on synthetic function in a fluidized bed, bioartificial liver. Cells in alginate beads were prepared using an electrostatic droplet generator of our own design using low-viscosity alginate. Beads were cultured for 24 hours then 7 days in static conditions and then 24 hours of fluidization in the bioreactor to assess albumin production. We observed significantly increased albumin production by C3A cells entrapped in alginate beads during static culture. Fluidization increased albumin production compared with static culture. Fluidization performed after 7 days of static culture resulted in a significant increase in albumin synthesis. In conclusion, static culture of alginate beads hosting hepatic cells facilitates restoration of cell function.

DETOXIFICATION functions of a failed liver may be replaced by completely artificial extracorporeal systems, but the synthetic functions may be achieved only by metabolically active cells. Extracorporeal bioartificial liver devices have been designed using various types of hepatic cells, including primary human hepatocytes, porcine cells, and cell lines derived from human stem cells or hepatomas. Hepatic cell function strongly depends on the culture conditions. Design of a device should promote the three-dimensional environment characteristic of a normal liver. Alginate is a natural polymer that is well tolerated by various cell types, especially pancreatic islet microcapsules, but also for hepatocytes. Furthermore, beads made of this hydrogel allow cells to grow three dimensionally, which is exceptionally important for hepatic cells.¹ One of the approaches to a bioartificial liver is a fluidized bed bioreactor with alginate beads hosting the hepatic cells.² Fluidization of alginate beads enhances mass transfer between the beads and the perfusion medium. We sought to improve the synthetic functions during static culture of human hepatoma C3A cells entrapped in alginate beads for using in a fluidized bed bioartificial liver.

MATERIALS AND METHODS

Human hepatoma C3A cell line (ATCC, LGC Promochem, Middlessex, UK) was cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, antibiotics, and HEPES (all from Gibco, Grand Island, NY). After trypsinization, cells were counted and mixed with low-viscosity sodium alginate solution (2.2% w/v, Sigma, St. Louis, Mo) prepared in 0.9% NaCl solution using 5×10^6 cells/mL alginate. Using an electrostatic droplet generator,³ formed beads were gelled in a calcium chloride bath (115 mmol in 0.9% NaCl). After 15 minutes, beads washed with standard culture medium (DMEM) were placed in the incubator (5% CO₂ at 37°C).

From the Institute of Biocybernetics and Biomedical Engineering, Polish Academy of Sciences, (A.K., D.L., J.B., A.W.) Warsaw, Poland and the Université de Technologie de Compiègne, CNRS UMR 6600, Biomechanics and Biomedical Engineering, (A.G., C.L.) Compiègne, France.

This work was carried under the auspices of Polish-French cooperation project—Polonium, COST 865 Action, and supported in part by State Research Grant No 3T11E 001 28.

Address reprint requests to Dr A. Kinasiewicz, Institute of Biocybernetics and Biomedical Engineering, Polish Academy of Sciences, Trojdena 4, 02-109 Warsaw, Poland. E-mail: kinas@ibb.waw.pl

© 2007 by Elsevier Inc. All rights reserved.
360 Park Avenue South, New York, NY 10010-1710

0041-1345/07/\$—see front matter
doi:10.1016/j.transproceed.2007.08.082

Transplantation Proceedings, 39, 2911–2913 (2007)

2911

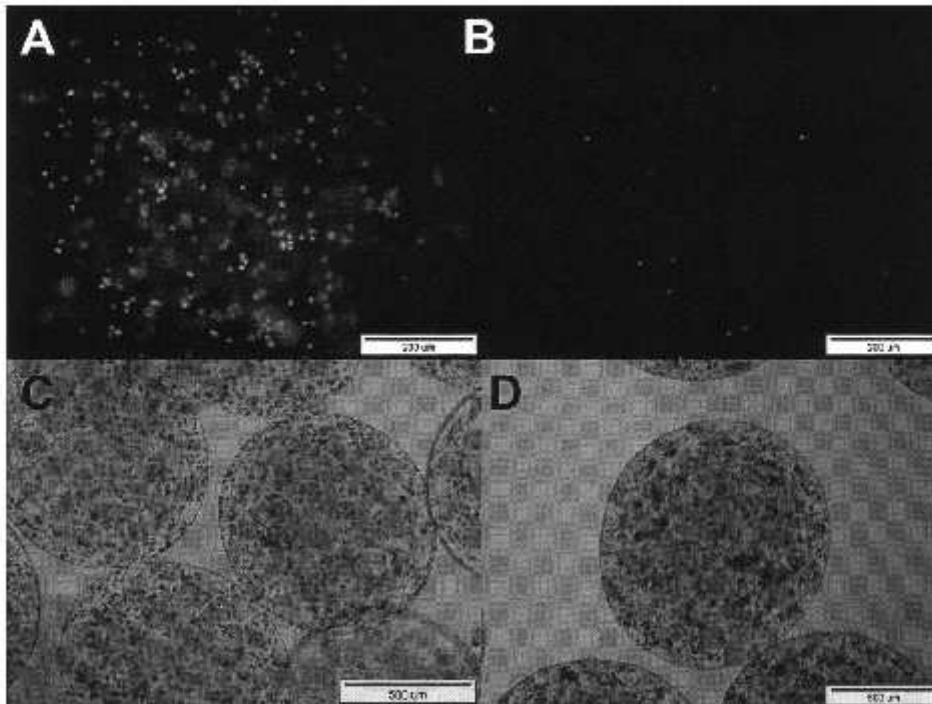


Fig 1. Algininate beads hosting human C3A cells. A. Acridine orange stained live cells. B. The same bead with dead cells stained using propidium iodide. C. Algininate beads after preparation. D. Algininate beads hosting cells after 7 days of static culture with multicellular aggregates formed after cell proliferation.

The average diameter of beads and variation coefficient (VC) were calculated from pictures taken under an inverted Olympus IX 71 microscope using Cell P software. To measure cell viability, the cell suspension or freshly washed beads were incubated with acridine orange (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and propidium iodide (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$; both from Sigma). After washing, immobilized cells were counted on pictures taken under the microscope. Freshly prepared beads hosting cells were incubated in culture vessels (Corning, Lowell, Mass) in DMEM. During static incubation, the medium was changed every 2 or 3 days. For fluidization experiments, beads hosting cells were cultured for 24 hours and 7 days. One milliliter of beads (5×10^6 C3A cells) placed in a vertical bioreactor (6 cm long, 0.89 cm in diameter) was perfused to suspend beads in fluidized state with DMEM medium for 24 hours at a flow rate of 3 mL/min. After fluidization samples of the medium were frozen until assayed for albumin (ELISA kit, Bethyl, Montgomery, Tex).

RESULTS

Homogenous algininate beads successfully produced using electrostatic droplet generator showed a mean diameter of $896 \pm 53 \mu\text{m}$ (VC = 6%). Viability of hepatic cells in the

beads did not significantly differ before and after the bead formation process (both > 90%); Fig 1(A, B). No increase in bead diameter was observed after fluidization ($909 \pm 40 \mu\text{m}$; VC = 4%). As shown in Fig 2, we observed a significant increase in albumin concentrations in days following the

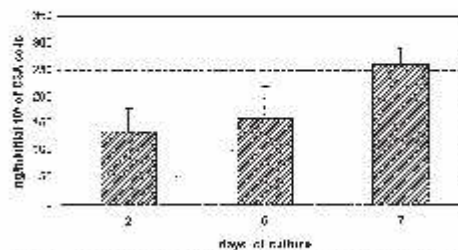


Fig 2. Albumin production by C3A cells entrapped in algininate beads in 7 days static culture. Media were changed every 48 and 72 hours.

Table 1. Comparison of Albumin Production by Human Hepatoma C3A Cells Entrapped in Alginate Beads in Static Incubation Compared With Fluidized Bed Bioartificial Liver Experiment

	Fluidized Bioreactor	Static Incubation
Albumin production after 24 hours of cultivation (ng/h per initial 10^6 of cells)	72.9 ± 31.4*	63.8 ± 9.8**
Albumin production after 7 days of cultivation (ng/h per initial 10^6 of cells)	743.3 ± 181.5***	250.8 ± 58.5***

* $P < .01$; ** $P < .05$.

culture. This observation indicated that hepatic cells proliferated with increased metabolic function over time. After 24 hours of culture, production of albumin in the bioreactor reached 72.9 ± 31.4 (ng/h per initial 10^6 of cells) not significantly differing from the static culture (Table 1). After 7 days of culture, the microscopic pictures suggested an increase in cell number and formation of three-dimensional cell aggregates (Fig 1), which was consistent with the increase in albumin production (Fig 2). Both fluidization bioreactor and static incubation performed after 7 days of culture showed a significant increase in albumin production compared with the previous experiments 24 hours after bead formation (Table 1).

DISCUSSION

The electrostatic method of cell entrapment in alginate beads is safe (Fig 1A, B) and reproducible. C3A cells proliferated in low-viscosity alginate, indicating a lack of toxic effect on the cells. Beads produced from low-viscosity sodium alginate, seemed to be stable in culture conditions. As shown by Khalil et al⁴, cultivation upregulates synthetic and detoxification functions of hepatic HepG2 cells. Hu-

man hepatoma C3A cells entrapped in alginate gel were able to produce albumin, which is the main serum protein synthesized by the liver. Albumin production was used as measure of the synthetic functions of the cells. In comparison with static culture, albumin production was greater for fluidized than for static conditions (Table 1), especially after 1 week of culture. Fluidization, which improves mass transfer of nutrients and oxygen to the cells inside the beads, also facilitates elimination of excreted products. These circumstances increase the metabolic state of the cells and promote synthetic functions of C3A cells, as examined by albumin production in this study. No significant differences were observed in bead diameter during fluidized experiments and long-term static culture. Hepatic cells require a certain time to restore their metabolic capacity. Three-dimensional culture affects hepatic cell metabolism,^{1,4} bead cultivation for 7 days promotes three-dimensional interactions significantly improving cell metabolism (Fig 2). In conclusion, we have suggested that culture of hepatic cells for at least 7 days is necessary to improve their function, especially in alginate beads. Fluidization allowed better nutrition and oxygen supply for cells inside the beads resulting in increased synthetic functions.

REFERENCES

1. Hanada S, Kayano H, Jiang J, et al: Enhanced in vitro maturation of subcultured fetal human hepatocytes in three dimensional culture using poly-L-lactic acid scaffolds in the presence of oncostatin M. *Int J Artif Organs* 26:943, 2003
2. Dore E, Legallain C: A new concept of bioartificial liver based on a fluidized bed bioreactor. *Ther Apher* 3:264, 1999
3. Lewinska D, Rosinski S, Werynski A: Influence of process conditions during impulsed electrostatic droplet formation on size distribution of hydrogel beads. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 32:41, 2004
4. Khalil M, Shariat-Panahi A, Tootle R, et al: Human hepatocyte cell lines proliferating as cohesive spheroid colonies in alginate markedly upregulate both synthetic and detoxification liver function. *J Hepatol* 34:68, 2001

d. Culture des C3A en billes d'alginate sur du long-terme

Jusqu'à présent, nous n'avons maintenu les cellules encapsulées en culture que sur du court terme - 6 heures (David *et al.*, 2004) - ou du moyen terme - 48 heures (Gautier *et al.*, 2008) -. En effet, notre optique était d'avoir des cellules fonctionnelles pour le temps de la suppléance (séances assez courtes en général de 6 heures, Watanabe *et al.*, 1997).

Nous nous sommes cependant aperçus qu'après un certain délai d'adaptation, les cellules prolifèrent en formant des structures tridimensionnelles au sein des billes d'alginate. Lors d'un séjour du Docteur Kinasiewicz dans notre laboratoire (soutenu par une bourse STSM du COST 865), j'ai donc pu travailler avec lui sur cet aspect. A l'UTC, nous avons étudié la prolifération cellulaire en testant différents types d'alginate (faible et moyenne viscosités) et en produisant les billes avec notre méthode d'encapsulation (extrusion à flux d'air coaxial). Puis le Docteur Kinasiewicz a reproduit les expériences en Pologne en utilisant la méthode à champ électrostatique. L'ensemble de l'étude a été publié en 2008 (Kinasiewicz *et al.*, 2008) et est présenté en annexe. Ci-après, je présente les résultats auxquels j'ai contribué à l'UTC : on observe deux comportements distincts de la part des cellules au 7^{ème} jour de culture. Elles ont tendance à proliférer sous forme d'agrégats sphériques dans l'alginate de faible viscosité à haute concentration (2,2%) alors que dans l'alginate de moyenne viscosité à plus faible concentration (1,5%), elles forment des tunnels orientés de la périphérie au centre de la bille (figure 14).

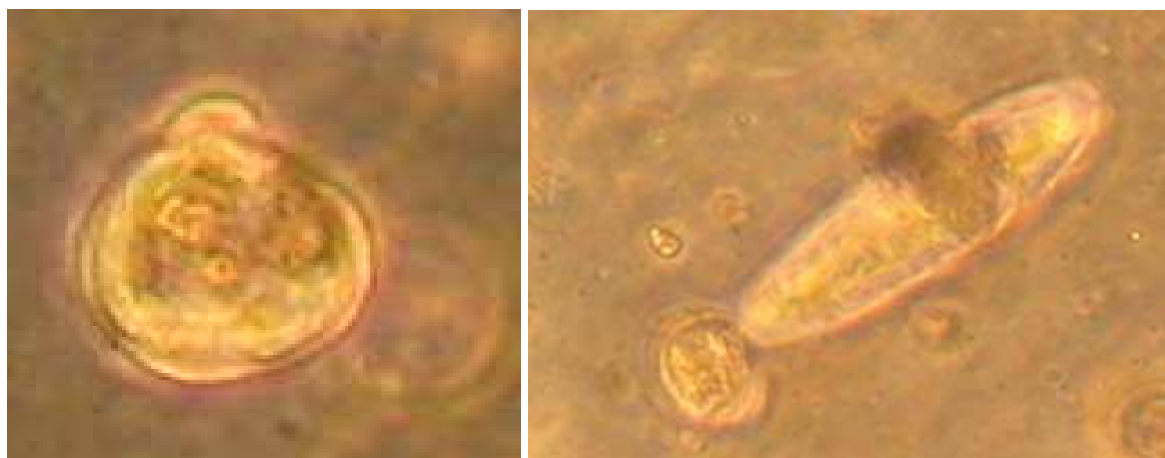


Figure 14 C3A sous forme d'agrégats sphériques dans l'alginate de faible viscosité (à gauche) et sous forme de tunnel dans l'alginate de moyenne viscosité (à droite). Grossissement $\times 400$.

Cet aspect s'accroît jusqu'au 14^{ème} jour de culture. Nous avons observé ces agrégats sphériques et longitudinaux à l'ESEM (Environmental Scanning Electron Microscope), après avoir dégelé les billes d'alginate prouvant bien que les cellules s'organisent en une structure (intrinsèque) différente selon le type d'alginate (figure 15).

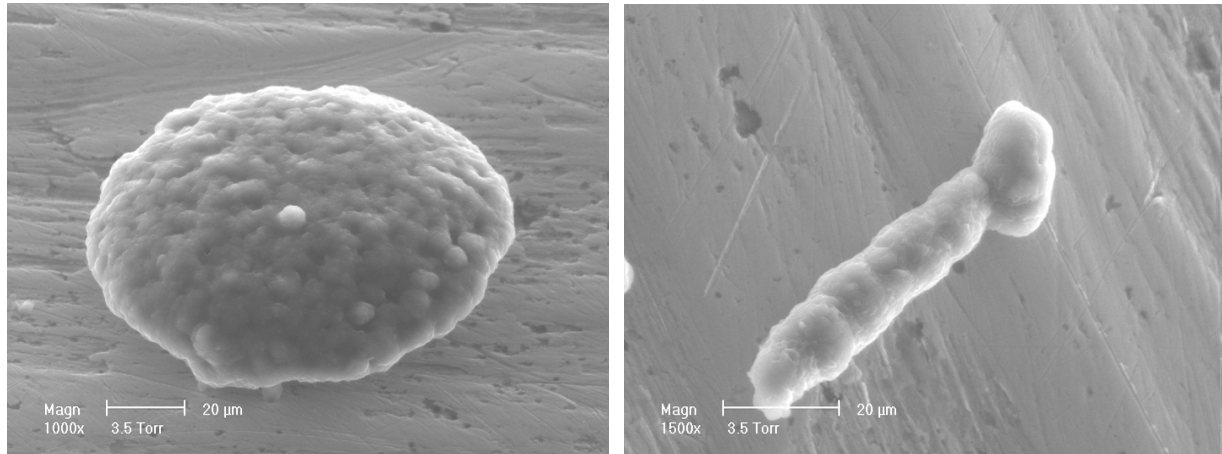


Figure 15 Cellules C3A sous forme d'agrégats sphériques présents dans l'alginate de faible viscosité (à gauche) et sous forme de tunnel dans l'alginate d moyenne viscosité (à droite).

Les microvillosités présentes sur chaque structure tridimensionnelle citées dans le chapitre I, sont également observées à l'ESEM à un plus fort grossissement (figure 16).

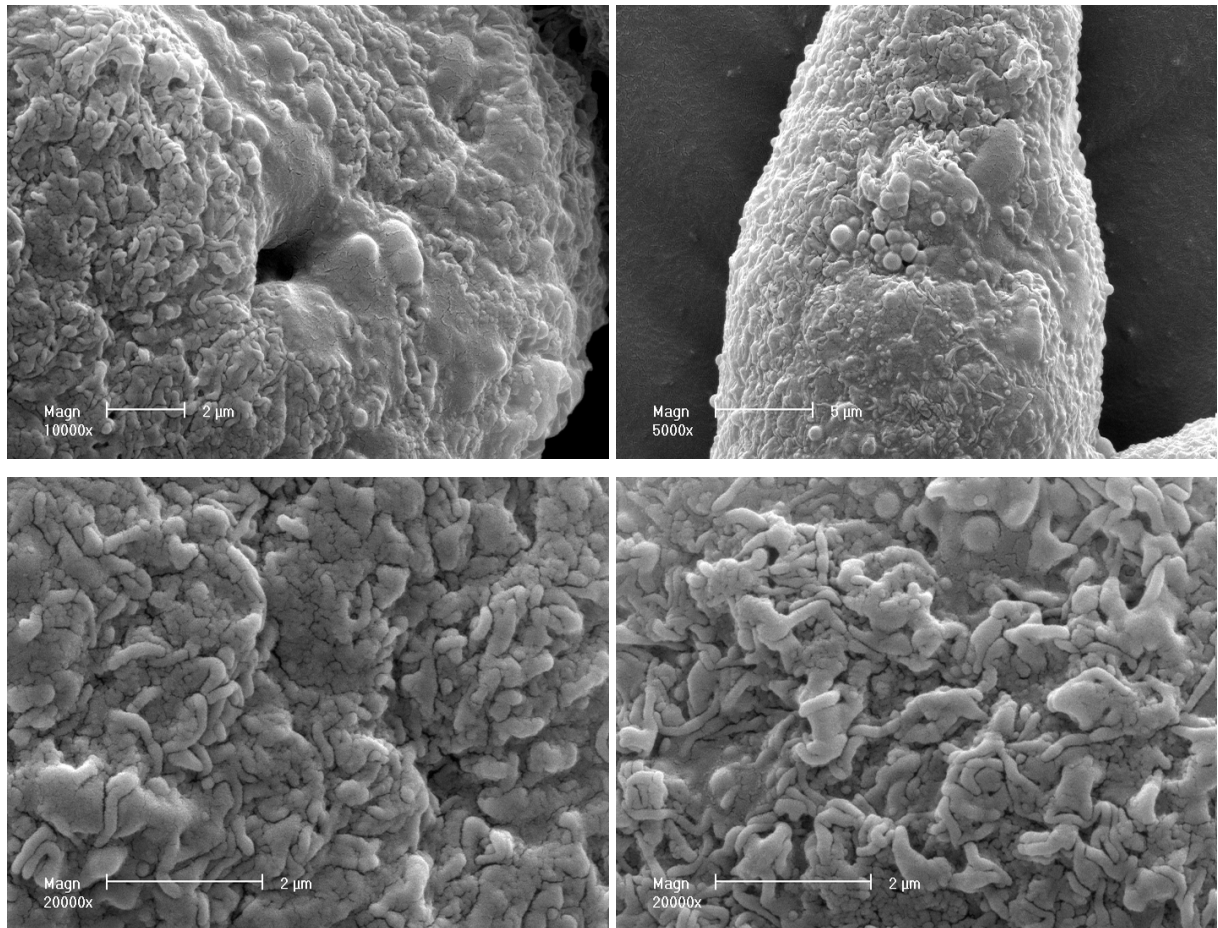


Figure 16 Microvillosités des C3A présentes à la surface des agrégats sphériques, alginate de faible viscosité (à gauche) et à la surface des agencements longitudinaux, alginate de moyenne viscosité (à droite).

L'organisation des cellules a également été observée en marquant les noyaux cellulaires par coloration fluorescente au DAPI (figure 17).

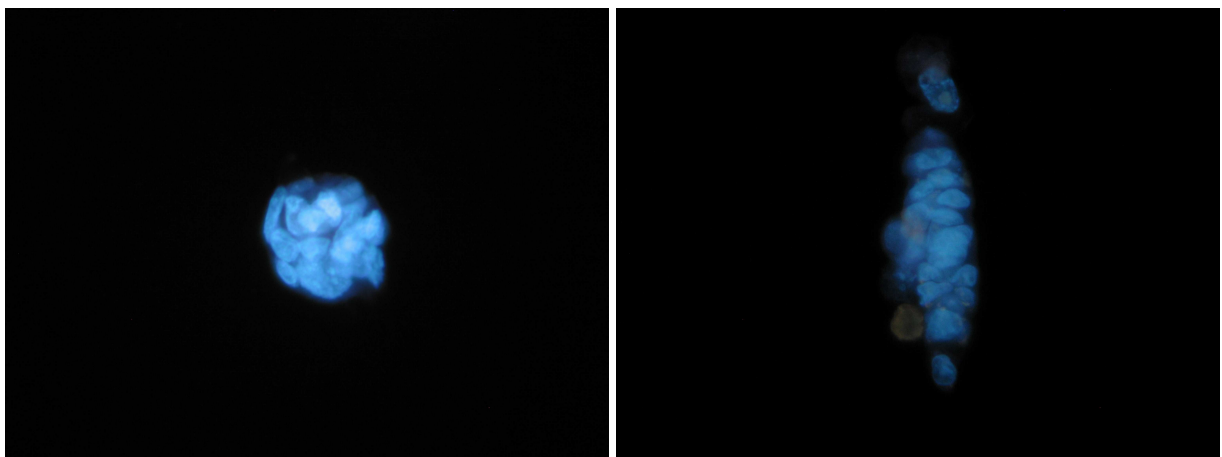


Figure 17 Structure tridimensionnelle des C3A au sein d'une bille d'alginate de faible viscosité (à gauche) et de moyenne viscosité (à droite). Grossissement $\times 400$.

Nous supposons que ces tunnels ont pu être formés par les cellules lors de l'encapsulation, comme l'a souligné Shirai *et al.* (1989). En effet, des sillons présents dans les billes d'alginate semblent délimiter un espace libre pour une colonisation cellulaire. Pour mimer la présence des C3A, des billes de verre de 10 à 50 μm de diamètre ont été utilisées. Après encapsulation de ces billes de verre, seules celles de plus faibles diamètres (10 à 20 μm) migrent du centre vers la périphérie de la bille en traçant un sillon, les billes de verre de diamètre plus grands restant au centre de la bille en ne laissant aucune trace visible (figure 18).

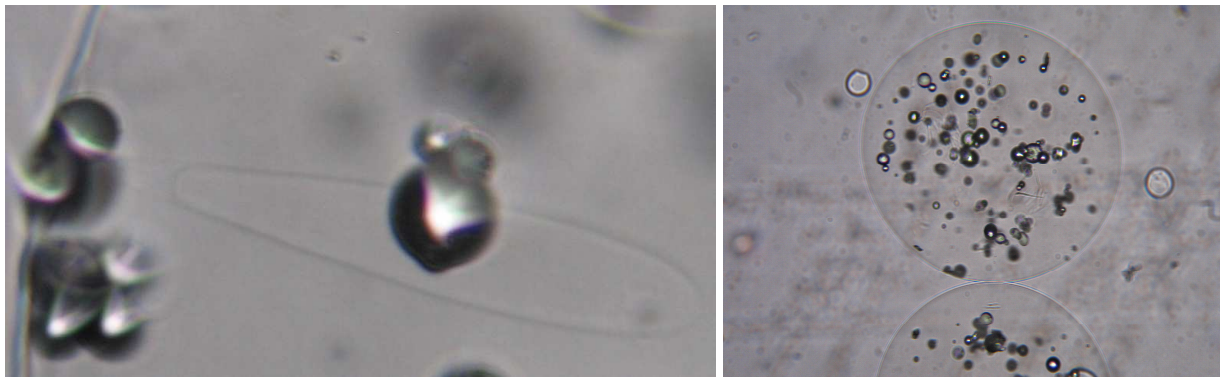


Figure 18 Tunnel formé par une bille de verre (diamètre 10-20 μm) au sein d'une bille d'alginate (à gauche) alors que les billes de verre de plus fort diamètre sont restées au centre (à droite).

Ce phénomène de structure en forme de tunnel, expliqué à la figure 19, dépend donc de la taille des particules encapsulées, de la nature de l'alginate et/ou de sa concentration.

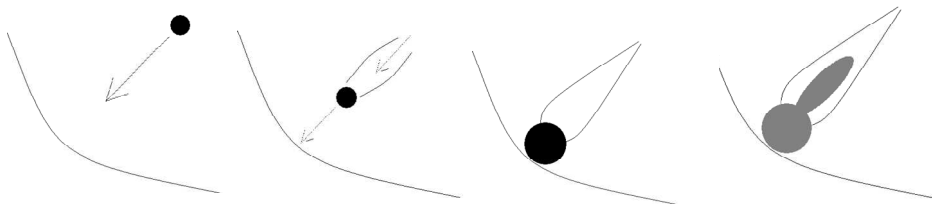


Figure 19 Schéma expliquant la formation d'un tunnel au sein d'une bille d'alginate.

Lors de l'encapsulation, la particule encapsulée se déplace du centre vers la périphérie de la bille en laissant une empreinte tridimensionnelle en forme de tunnel dans la bille d'alginate.

A la suite de cette observation, nous nous sommes demandés si ce comportement pouvait entraîner une modification au niveau des fonctionnalités cellulaires. Nous avons donc analysé la synthèse d'albumine en bioréacteur à J1, J7 et J14. Nous avons pu constater une forte augmentation de la synthèse d'albumine entre J1 et J14 sans pour autant observer de différence significative entre les deux configurations cellulaires. Concernant la comparaison entre les deux méthodes d'encapsulation, aucune différence significative n'a été observée suite aux

travaux du Docteur Kinasiewicz. L'augmentation de la synthèse d'albumine après 7 et 14 jours de culture s'explique à la fois par l'augmentation de la densité cellulaire au sein des billes et par une hausse de l'activité des C3A, déjà démontrée dans d'autres conditions par Khalil *et al.* (2001).

C. Modélisation mathématique des transferts de masse

Ce modèle mathématique a pour but de caractériser les transferts de masse de différents solutés au sein du bioréacteur à lit fluidisé en présence de cellules. Cet outil a pour but d'aider à la compréhension des phénomènes se produisant à l'intérieur de ce système en déterminant un coefficient de transfert appelé K pour chaque soluté et chaque diamètre de billes. Ce modèle a été inspiré de celui développé par David *et al.* (2004) basé sur les équations décrites par la loi Fick pour les transferts diffusifs en absence de cellule.

Modelling mass transfer and hepatic cell functions into a fluidized bed bioartificial liver

A. Gautier, M. Dufresne, C. Legallais

UMR CNRS 6600, Laboratory of Biomechanics and Bioengineering, University of Technology of Compiègne, Compiègne, France

a. Introduction

Liver is a complex organ ensuring numerous essential metabolic functions. Acute or evolution of chronic liver failures cause severe complications due to the loss of vital liver functions, such as detoxification and synthesis. Disorders in liver's metabolic activities dramatically impact patient's health and compromise short term survival. Until now, liver transplantation only can efficiently treat these end stage pathologies.

The expanding gap between the number of patients on waiting list and the number of liver transplants confirms the challenge for an alternative solution to treat such patients. Since the 90's, different extracorporeal support systems have been developed to bridge patients to transplantation or recovery. They are classified into artificial and bioartificial livers (Legallais *et al.*, 2008). Artificial livers are based on mechanical and chemical components to remove toxins only, whereas bioartificial systems use liver cells to restore all the liver functions. To satisfy the inclusion of liver cells into extracorporeal set ups, some requirements have to be ensured:

- To avoid patient's immunological reactions, cells need be isolated in a specific compartment
- To preserve cells integrity and functions, a tri-dimensional scaffold made of an adequate biocompatible material should be employed
- To supply cells in nutrients and oxygen and to ensure the release of metabolites to the patients, the barrier between the cell and the blood or plasma has to be permeable to solutes. According to the literature, this barrier can find different configurations : hollow fiber (Legallais *et al.*, 2001, Hughes *et al.*, 1996, Jasmund *et al.*, 2002, Mullon *et al.*, 1999, Patzer *et al.*, 2002, Rozga *et al.*, 2006, Nyberg *et al.*, 1993 and 1998, Gerlach *et al.*, 2006), beads (Gao *et al.*, 2005, Selden *et al.*, 1999, David *et al.*, 2004,

Kinasiewicz *et al.*, 2007 and 2008) or capsules (Orive *et al.*, 2004, Canaple *et al.*, 2001, Haque *et al.*, 2005), or matrices (Zmora *et al.*, 2002 and Seo *et al.*, 2006).

The bioreactors hosting the cells should be correctly dimensioned to optimize the mass transfer and thus cell viability and functions, for the final goal of clinical application. To assess the efficacy of such bioreactors, different methods can be proposed : i) direct application to animal models (Van de Kerkhove *et al.*, 2004) or even to patients; ii) in vitro investigations, leading to experimental data, where the bioreactor is analyzed as a black box, considering only input and output data (Nyberg *et al.*, 1992) ; iii) modelling the mass transfer and cell activity, an approach much more common in chemical engineering and biotechnology, also applied to bioartificial organs mainly for oxygen transport studies (McClelland *et al.*, 2002).

In chemical engineering, mass transfer modelling advantageously improved the productivity of bacteria, yeast or mammalian cells in bioreactors. Fassnacht *et al.* (1999) and others developed reaction-diffusion models to describe the oxygen distribution in fixed-bed systems (Kurosawa *et al.*, 1989, Indlekofer *et al.*, 1996, Nath *et al.*, 1996, Shiraishi *et al.*, 1996, Wanner *et al.*, 1996). In the same way, Willaert *et al.* (1996) studied reaction-diffusion models within various bioreactors to point out their limitations and inhibitions. Fassnacht *et al.* (1998) applied their method to the culture of immortalized hepatocytes for the future development of artificial liver support systems in culturing mHep-R1 on porous carriers. They exhibited the inability to access to cells directly during the cultivation.

In this study, the liver supply was proposed as a fluidized bed bioreactor, as represented in Figure 1 (David *et al.*, 2006 and 2004, Dore *et al.*, 1999, Legallais *et al.*, 2000). The barrier was materialized by a porous alginate matrix where human hepatoblastoma cells, C3A, were entrapped in a bead shape. Once encapsulated, the cells were retained in the bioreactor column, named Fluidized Bed Bioartificial Liver (FBBAL).

Our bioengineering approach was to understand mass transfer phenomena and metabolic activities occurring within such a bioreactor using experimental and modelling approaches. This characterization was proposed following three different ways: i) physical point of view, with mass transfers studies with a well defined molecular weight marker (vitamin B12); ii) biological point of view, with hepatoblastoma cells C3A cultured within alginate beads, studying mass transfers and cell activities with the markers synthesised (ammonia, albumin and alpha-foetoprotein) or consumed (glucose) by the cells iii) mathematical point of view, with a model developed to analyze these mass transfer phenomena and determine in situ synthesis or consumption rates of cells, that classically could not be directly assessed. We

produced beads of two different diameters to analyze whether reducing the diffusion length could result in enhanced cell functions.

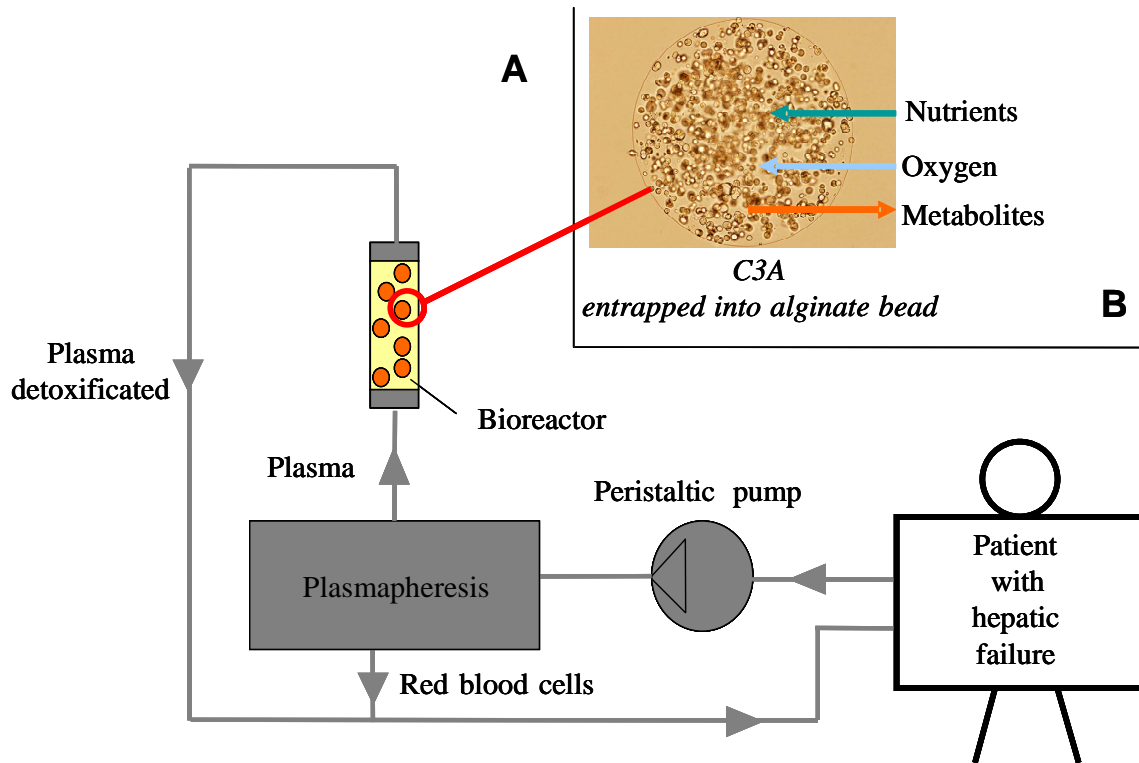


Figure 1 Principle of the fluidized bed bioartificial liver for liver support (A). Patient's blood is withdrawn and separated into plasma and blood cells. Plasma is perfused through a fluidized bed bioreactor hosting hepatocytes in order to be detoxified. Plasma and blood cells are mixed again and returned to the patient. Transfers of nutrient, oxygen and metabolites through the alginate bead structure (B).

b. Materials and methods

A) Experiments

1) Fluidized bed bioreactor design

The fluidized bed bioreactor was designed using Solid Works software and produced in glass by Medicolab in order to be autoclavable. Its geometry was determined by semi-empirical

model developed by Richardson and Zaki (1954): 1, 35 cm internal diameter and 17 cm height. The concept was detailed in previous work (Dore et al. (1999), Legallais et al. (2000) and Gautier et al. (2008)).

2) Encapsulation process

Alginate beads were produced via an encapsulation process based on extrusion method with a coaxial air flow made by our laboratory. 10 ml of alginate sol with or without cells were extruded through a needle using a peristaltic pump at 5.65 ml/min (Ismatec IPC Type ISM934 VA.01). Air flow intensity was measured thanks to a flow meter (Sho-rate Emerson Electric S.A., France). Beads of 1000 μm and 600 μm diameter were produced under air flow rates of 1350 and 4050 ml/min, respectively. Upon formation, alginate droplets jellified for 15 minutes into a 70 ml of gelation bath (154 mM NaCl, 10 mM Hepes, 115 mM CaCl_2). Beads were rinsed twice with 70 ml of sterile saline solution. Cell-containing beads were submitted to an additional rinsing with 70 ml of culture medium and finally placed in a culture flask with 15 ml of culture medium for the transition before the fluidization experiment.

3) Mass transfer study with cell-free beads

Mass transfers were carried out under dynamic conditions within the fluidized bed bioreactor (Fig 2). Vitamin B12 marker was used to evaluate mass transfers' phenomena between the core of the alginate beads and the fluid surrounding the beads. Measures were repeated in triplicates. Vitamin B12 concentration was measured through a spectrophotometric circulation spectrophotometric cell. Vitamin B12 solution was composed of 100 mg/l of this solute diluted in a 154 mM NaCl solution. 26 ml of this solution was needed to completely fill the loop circuit. Cell containing alginate beads were perfused in the bioreactor under flow rate of 6 ml/min and 10 ml/min for 600 μm or 1000 μm beads diameter, respectively, in order to generate optimal fluidization.

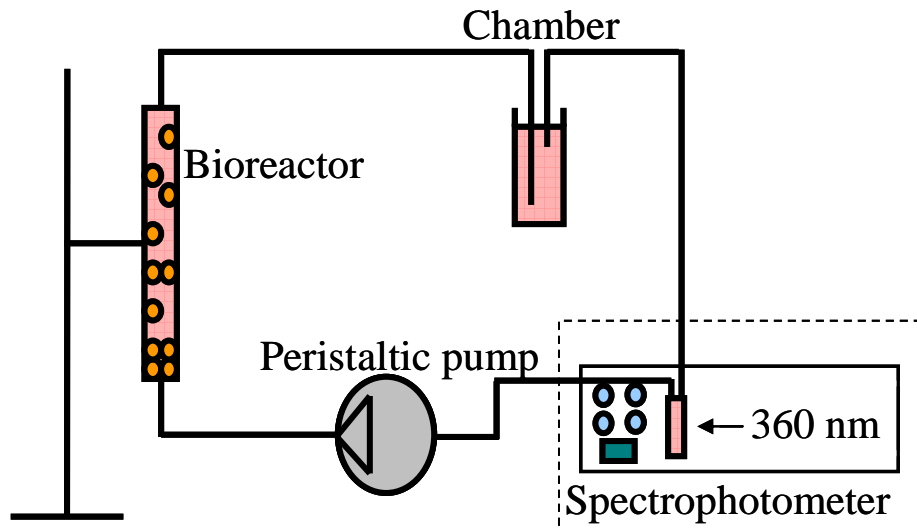


Figure 2 Experimental setup for dynamic assessment of mass transfer or dynamic culture of C3A cells within the fluidized bed bioreactor. The part limited by the dotted frame was only necessary for mass transfer experiments without cells. When dynamic culture was conducted, the whole set up but the pump was placed in an incubator at 37°C and 5% CO₂.

4) Mass transfer studies with cells

a) C3A cell culture

C3A human hepatocellular carcinoma cells (ATCC, CRL 10-741) were cultivated in T75 Falcon culture flasks within 15 ml of complete culture medium in a 37 °C and 5% CO₂ incubator. This complete medium culture was described in Gautier *et al.*, 2008. Culture medium was replaced every 2 to 3 days. Conventional static cultures within T75 vessels were performed as a reference.

b) Preparation of fluidization experiment

For the encapsulation step, C3A cells containing alginate beads were prepared in sterile conditions. Cells are detached and counted in order to isolate an aliquot of 50 million cells for encapsulation step. Afterwards, cells are mixed with 10 ml of alginate sol 2.2% (low viscosity, A 0682, Sigma-Aldrich, France) diluted in saline solution at 154 mM NaCl buffered with 10 mM Hepes, pH 7.4 and extrusion was performed.

To study mass transfer, the fluidized bed bioreactor was connected to a closed loop circuit complete containing 42 ml of culture medium. Alginate beads were perfused under flow rates

of 6 ml/min and 10 ml/min for 600 μm or 1000 μm diameter beads, respectively. The whole circuit continuously operated for 48 hours.

c) Biochemical assays

Samples of supernatant were removed from the culture vessel at time 0, 24 hours and 48 hours to perform the biochemical assays. Ammonia (Randox kit, France) and glucose (Thermo kit, France) were assessed with a biochemical automatus (Konelab 20, Thermo, France). Albumin concentration was measured by Elisa sandwich method (goat anti-human albumin IgG antibodies were purchased from Cappel, MP Biomedicals, Solon, Ohio).

Alpha-foetoprotein levels were evaluated using a biochemical automatus (Modular Analytics E170, Roche, Meylan, France) along with a kit from Roche (Meylan, France).

B) Theory

The purpose of this part was to describe mass transfer occurring in the bioreactor column between the perfusion fluid (the supernatant) and the core of the beads, taking into account the cell activity (Fig. 3 and 4).

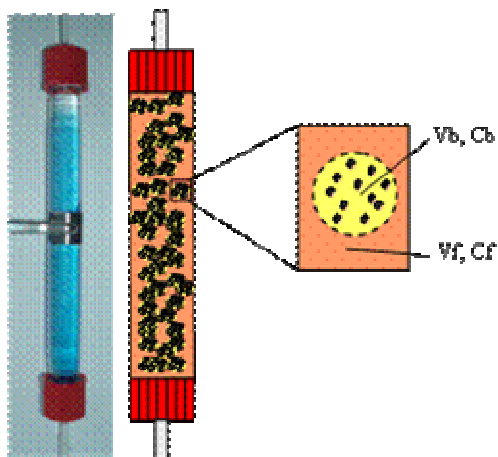


Figure 3 Left : Bioreactor allowing alginate bead fluidization; Right : Schematic representation of cells entrapped into alginate bead with V_b , volume of beads and V_f , volume of perfusion fluid in the whole circuit.

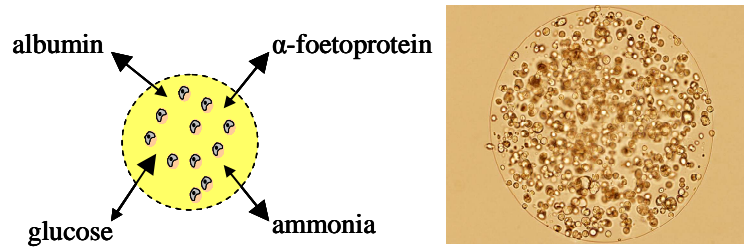


Figure 4 a) Transfers of solutes synthesized or consumed by cells occurring at the surface of alginate bead within the fluidized bed bioreactor

b) Microscopy photo of the cells containing alginate bead ($\varnothing = 1\text{mm}$)

The theoretical model was developed under the following assumptions:

1. the properties of alginate bead structure were constant over time.
2. the bead (V_b) and culture medium (V_f) volumes were constant (no swelling or shrinking)
3. there was no cell proliferation with time
4. concentration of solutes were homogeneous in the supernatant fluid (C_f) and in the beads (C_b)
5. no adsorption occurred on beads surface or on the walls of the system
6. at the interface fluid/bead, transfers were only diffusive and are described by Fick's law.
7. cell production/consumption depended only on cell count.

The conservation equations could be written for both solid (bead) and liquid phases. In the supernatant, the solute mass (M_f) changes were due to transfer from or towards the beads (eq. [1]).

$$\frac{\partial M_f}{\partial t} = -KA(C_f - C_b) \quad [1]$$

With:

K: diffusive mass transfer coefficient

A: exchange surface area for the beads,

C_f : concentration of the solute of interest in the supernatant fluid

C_b : concentration of the solute of interest in the beads

Within the beads, solute mass (M_b) changes were due to transfer from or towards the supernatant, and to cell activity reported as a reaction rate R (eq. [2])

$$\frac{\partial M_b}{\partial t} = KA(C_f - C_b) + R \quad [2]$$

$R > 0$ meant that the substances was synthesized and released by the cells.

$R < 0$ meant that the substance was consumed by the cells.

Only the supernatant concentration C_f could be followed over time. Equations 1 and 2 were thus combined to obtain a second order differential equation for C_f (eq. [3]):

$$\frac{\partial^2 C_f}{\partial t^2} + KA \left(\frac{V_b + V_f}{V_b V_f} \right) \frac{\partial C_f}{\partial t} = \frac{KAR}{V_b V_f} \quad [3]$$

which could be analytically solved [4]:

$$C_f(t) = \frac{-\alpha V_b V_f}{KA(V_b + V_f)} \exp \left[-KA \left(\frac{V_b + V_f}{V_b V_f} \right) t \right] + \frac{Rt}{V_b + V_f} + \gamma \quad [4]$$

The constant γ could be identified using the initial condition (eq. [5]):

$$\gamma = C_0 + \frac{\alpha V_b V_f}{KA(V_b + V_f)} \quad [5]$$

with C_0 : initial concentration of the solute of interest in the supernatant.

In the experiments, two additional time points were available, at $t = 24$ hours and $t = 48$ hours, leading to the identification of α (eq. [6]) and of the overall mass transfer coefficient K (eq. [7]).

$$\alpha = \frac{\frac{KA(V_b + V_f)}{V_b V_f} \left(C_{48h} - C_0 - \frac{Rt_{48h}}{(V_b + V_f)} \right)}{\left\{ 1 - \exp \left[-KA t_{48h} \left(\frac{V_b + V_f}{V_b V_f} \right) \right] \right\}} \quad [6]$$

$$K = \frac{V_b V_f}{-At_{24h}(V_b + V_f)} \left\{ \text{Ln} \left[\frac{\left(C_{48h} - C_0 - \frac{Rt_{48h}}{(V_b + V_f)} \right) - \left(C_{24h} - C_0 - \frac{Rt_{24h}}{(V_b + V_f)} \right)}{\left(C_{24h} - C_0 - \frac{Rt_{24h}}{(V_b + V_f)} \right)} \right] \right\} \quad [7]$$

To study mass transfer within cell-free beads, this mathematical model was applied with R equal to 0. This approach was developed in previous work by David *et al.* (2004) and applied to the two types of beads diameter in Gautier *et al.* (2008).

c. Results

C) Mass transfer study within cell-free beads

Mass transfers within the fluidized bed bioreactor were evaluated for two types of bead diameter: 1000 and 600 μm .

Vitamin B12 concentration in the supernatant decreased over time because of its continuous migration from the fluid surrounding the bead to the bead internal accessible volume, until the equilibrium (C_{eq}) between C_f and C_b was reached.

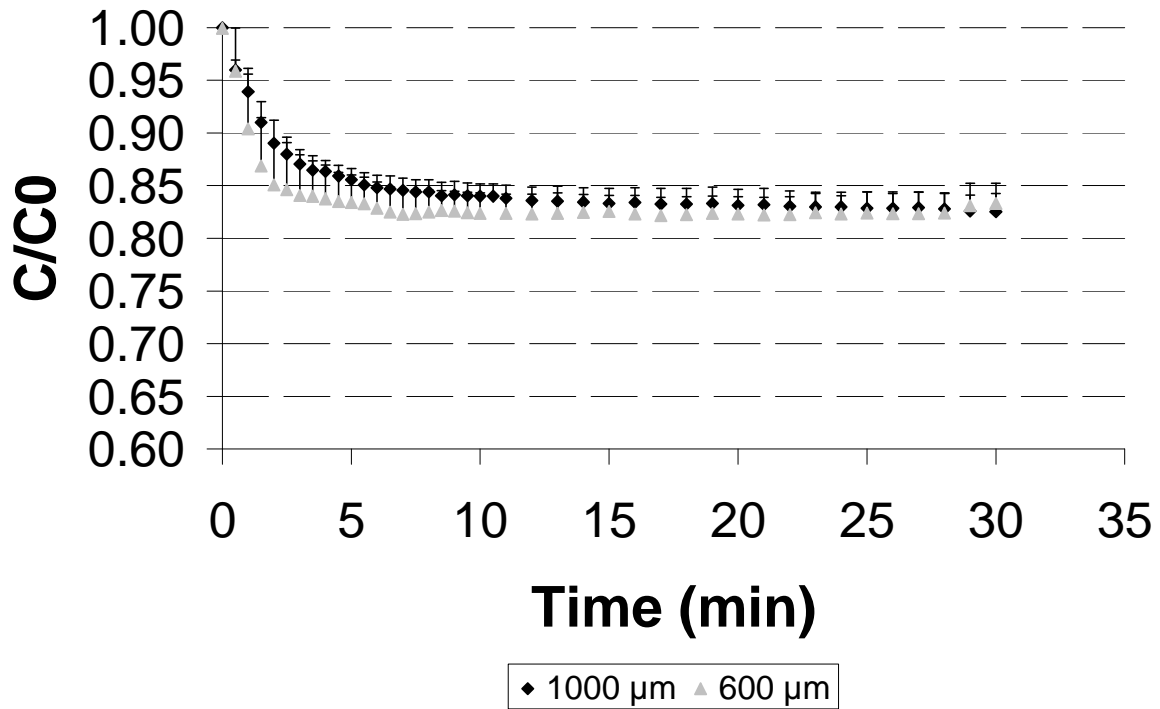


Figure 5 Vitamin B12 absorption curves for beads 1000 and 600 μm diameter.

In each case, the equilibrium was reached about 10 minutes after the perfusion starts (Fig. 5). In the mathematical model described in paragraph 2.2, the term R was set to 0 and the final solution of the equation was equal to presented by eq. [8]:

$$C_f(t) = C_{eq} + (C_0 - C_{eq}) \exp\left[\frac{-KA}{V_b V_f} (V_b + V_f)t\right] \quad [8]$$

Using this model, K could be successfully determined for the two selected types of alginate bead diameter, by calculating the slope of $(-\ln [(C_f - C_{eq}) / (C_0 - C_{eq})])$ as a function of time (Fig. 6).

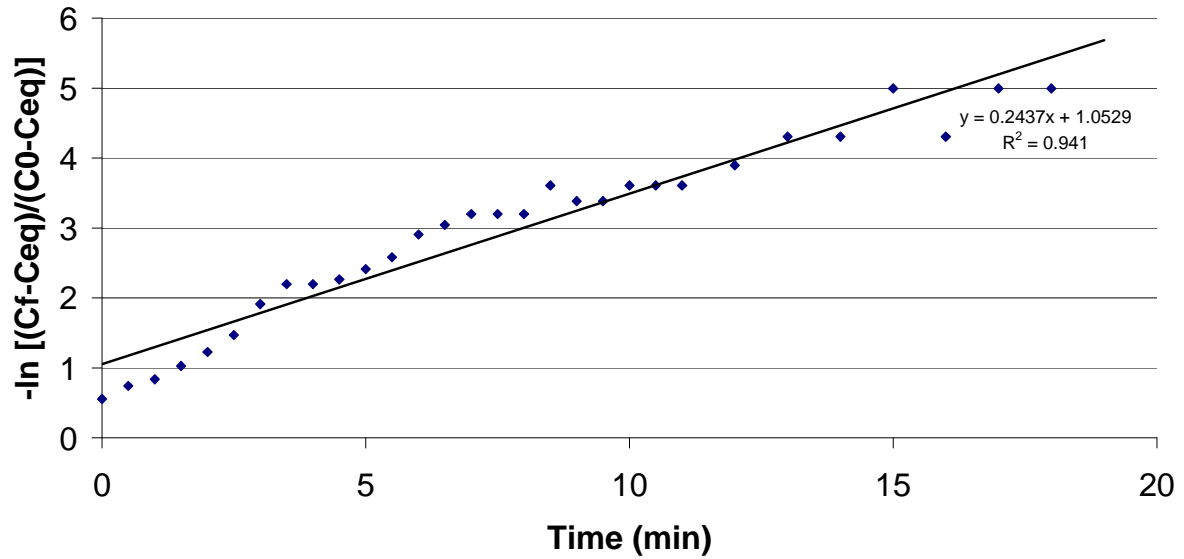


Figure 6 Example of a slope of $(-\ln [(C_f - C_{eq}) / (C_0 - C_{eq})])$ as function of time obtained for beads of 1000 μm diameter.

The mass transfer coefficient found for vitamin B12 for 600 μm and 1000 μm beads diameter were 3.718 ± 1.132 and $4.399 \pm 0.727 \cdot 10^{-7}$ m/s and respectively.

D) Bioreactor behaviour with C3A cells

In vitro biological experiments were performed for 48 hours and samples of the supernatant were collected at 0, 24 and 48-hour fluidization. We followed the concentrations of four molecules of interest: ammonia, glucose, albumin and AFP. On the one hand, ammonia, albumin and AFP were synthesized by C3A and then released to the supernatant by diffusion across the bead core. Sieving effects due to the porous structure could potentially be observed because the first molecule was a low molecular weight solute while the others, proteins, could be considered as high molecular weight solutes. On the other hand, glucose was consumed by C3A, decreasing the bead concentration that would be compensated by diffusive mass transfer from the supernatant to the bead core.

Table 1 reports the concentrations of each solute of interest measured in the supernatant during experiments regarding the beads diameter 1000 μm and 600 μm .

Sampling Time	Nature of solute	Beads 1000 μm	Beads 600 μm
		Concentration (g/m^3)	
0h	Ammonia	6.59 ± 1.35	6.59 ± 1.35
	Glucose	936 ± 16.86	936 ± 16.86
	Albumin	0	0
	AFP	0	0
24h	Ammonia	12.63 ± 1.07	13.02 ± 2.26
	Glucose	525 ± 92.7	498 ± 72
	Albumin	1.77 ± 1.58	1.48 ± 1.06
	AFP	1 ± 0.50	0.63 ± 0.46
48h	Ammonia	15.89 ± 1.49	15.37 ± 3.22
	Glucose	426.6 ± 79.38	437 ± 90.18
	Albumin	4.87 ± 0.07	3.62 ± 1.65
	AFP	3.26 ± 0.11	1.22 ± 1.05

Table 1 Concentration of different solutes (ammonia, glucose, albumin and alpha-foetoprotein) at different time point 0, 24 and 48h for beads 1000 and 600 μm .

E) Mass transfer and cell activity model

The physical and biological approaches were translated in term of mathematical modelling as described in the previous section. Using the data collected in the experiments, there were indeed two unknown parameters to determine: the mass transfer coefficient K and the synthesis / consumption rate R , which meant that the solution to equation [4] was not unique a priori.

1) Estimation of realistic range for K and R

We first considered the possible range for both parameters (couple R , K) that were mathematically connected and that ensured a solution to the equation. These couples are presented for each types of solute (ammonia, glucose, albumin and alpha-foetoprotein) for beads diameter of 600 μm (Fig. 7) and 1000 μm (Fig. 8).

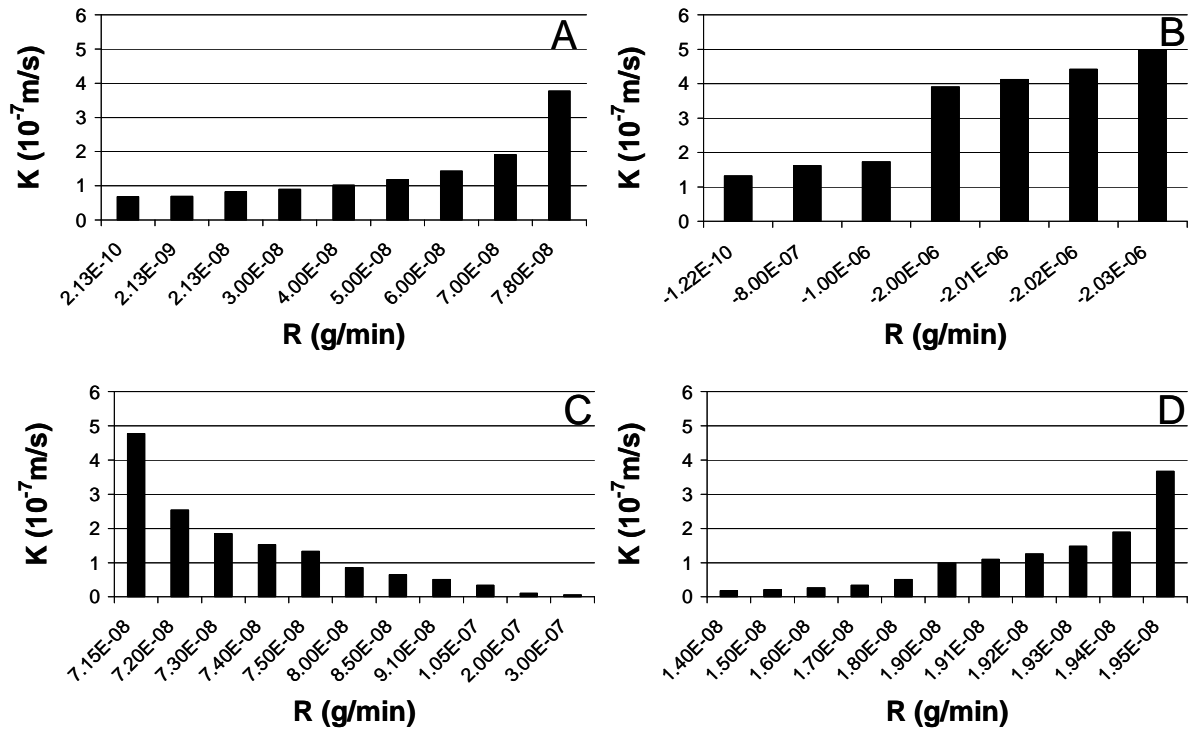


Figure 7 Potential range for the couple (R, K) ensuring the solution of the mathematical model for 600 μm beads diameter : (A) ammonia, (B) glucose, (C) albumin, (D) AFP.

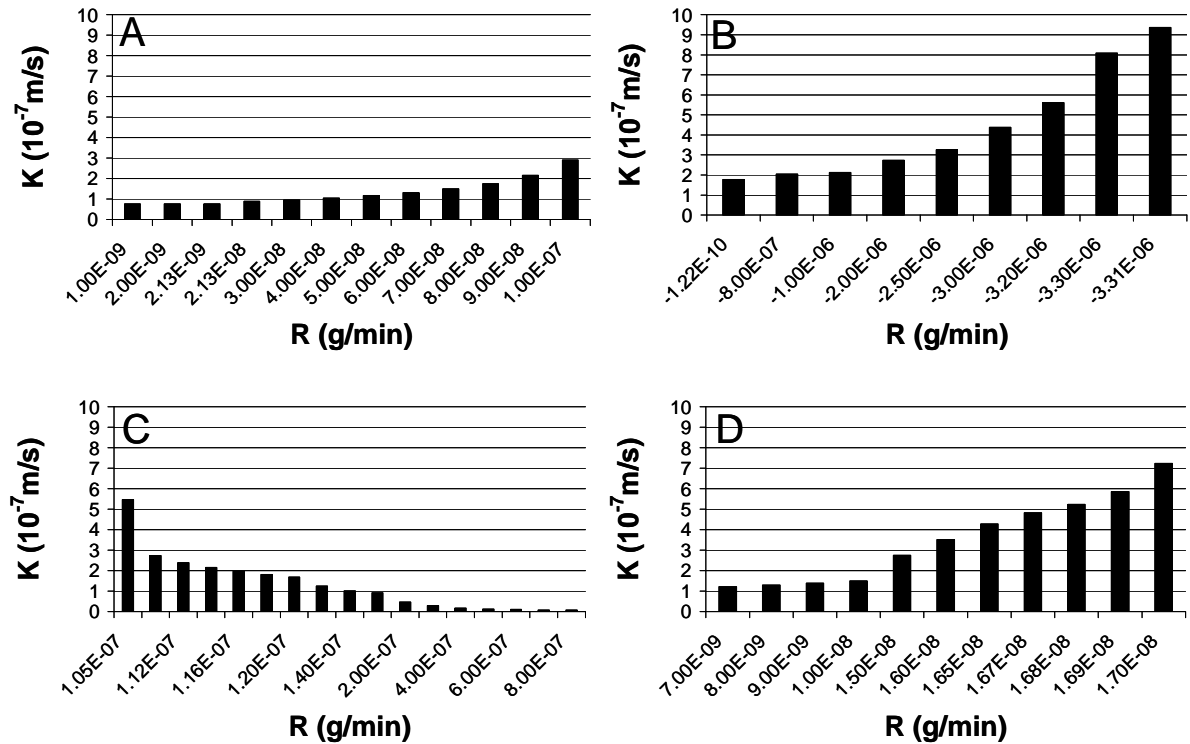


Figure 8 Potential range for the couple (R, K) ensuring the solution of the mathematical model for 1000 μm beads diameter : (A) ammonia, (B) glucose, (C) albumin, (D) AFP.

It should be noticed that very small changes in the synthesis or consumption rate R could lead to significant variations in the mass transfer coefficient K , and vice versa. The behaviour seemed to follow an exponential curve. From this raw data, it was not realistic to determine a unique (R, K) couple that could be validated. Before going further, Table 2 summarizes the lower and the upper limit for both R and K , named couple $(R, K)_{\min}$ when the mass transfer coefficient K was the smallest and couple $(R, K)_{\max}$ when K was the largest.

		Ammonia	Glucose	Albumin	AFP
Beads 1000 μm	Couple $(R, K)_{\min}$	$R = 1 \cdot 10^{-9}$	$R = -1.22 \cdot 10^{-10}$	$R = 1 \cdot 10^{-6}$	$R = 6.64 \cdot 10^{-12}$
		$K = 7.68 \cdot 10^{-8}$	$K = 1.77 \cdot 10^{-7}$	$K = 6.05 \cdot 10^{-9}$	$K = 8.50 \cdot 10^{-8}$
	Couple $(R, K)_{\max}$	$R = 1 \cdot 10^{-7}$	$R = -3.31 \cdot 10^{-6}$	$R = 1.05 \cdot 10^{-7}$	$R = 1.70 \cdot 10^{-8}$
		$K = 3.0 \cdot 10^{-7}$	$K = 9.36 \cdot 10^{-7}$	$K = 5.48 \cdot 10^{-7}$	$K = 7.23 \cdot 10^{-7}$
Beads 600 μm	Couple $(R, K)_{\min}$	$R = 2.13 \cdot 10^{-10}$	$R = -1.22 \cdot 10^{-10}$	$R = 3 \cdot 10^{-7}$	$R = 6.64 \cdot 10^{-10}$
		$K = 6.77 \cdot 10^{-8}$	$K = 1.32 \cdot 10^{-7}$	$K = 6.19 \cdot 10^{-9}$	$K = 5.75 \cdot 10^{-9}$
	Couple $(R, K)_{\max}$	$R = 7.80 \cdot 10^{-8}$	$R = -2.03 \cdot 10^{-6}$	$R = 7.15 \cdot 10^{-8}$	$R = 1.95 \cdot 10^{-8}$
		$K = 3.77 \cdot 10^{-7}$	$K = 4.98 \cdot 10^{-7}$	$K = 4.78 \cdot 10^{-7}$	$K = 3.66 \cdot 10^{-7}$

Table 2 Couples $(R, K)_{\min}$ and $(R, K)_{\max}$ limiting the range for the mathematical modelling for each solute (ammonia, glucose, albumin and AFP) concerning beads diameter 1000 μm and 600 μm (R in g/min and K in m/s).

2) Additional assumptions for K leading to R assessment

For small molecular weight solutes such as ammonia and glucose, the maximum mass transfer coefficient K in Table 2 was about $3.0 \cdot 10^{-7}$ m/s, which was slightly lower than the coefficient found with empty beads. This could be due to the presence of cells that hindered diffusive mass transfer. This value was thus retained as “optimal value” for K .

For high molecular weight solutes such as albumin and AFP, lower values for K were expected. They nevertheless could not be lower than $8.5 \cdot 10^{-8}$ m/s (according to the operating

range defined in Table 2). We therefore, proposed to focus on an initial value about $9 \cdot 10^{-8}$ m/s.

According to the range defined for each solute, R was determined to ensure a correct concentration at t_{48h} . To check the validity of the obtained couple (R, K), the equation [4] was then applied to calculate the concentration at t_{24h} .

Table 3 shows the concentration determined at t_{24h} from the mathematical modelling ($C_{24 \text{ theo}}$), from the experiments ($C_{24 \text{ exp}}$) and the difference in percentage between both values for ammonia, glucose, albumin and AFP, and for both types of beads.

	K (m/s)	R (g/min)	Beads 1000 μm			Beads 600 μm		
			$C_{24 \text{ theo}}$ (g/m^3)	$C_{24 \text{ exp}}$ (g/m^3)	Error (%)	$C_{24 \text{ theo}}$ (g/m^3)	$C_{24 \text{ exp}}$ (g/m^3)	Error (%)
Ammonia	$3.0 \cdot 10^{-7}$	$1.1 \cdot 10^{-7}$	12.4	12.63	1.85	12.04	13.02	8.14
Glucose	$3.0 \cdot 10^{-7}$	$-2.2 \cdot 10^{-6}$	522	525	0.57	507	498	1.77
Albumin	$9.0 \cdot 10^{-8}$	$1.45 \cdot 10^{-7}$	1.78	1.77	0.56	0.33	1.48	77.70
AFP	$9.0 \cdot 10^{-8}$	$1.5 \cdot 10^{-9}$	1.003	1.003	0	0.93	0.63	32.26

Table 3 Concentration of each solute (ammonia, glucose, albumin and AFP) at t_{24h} estimated from the mathematical modelling $C_{24 \text{ theo}}$ and from the experiments $C_{24 \text{ exp}}$ for beads 1000 and 600 μm .

The determined couples (R, K) led to negligible errors for ammonia and glucose for both types of beads. However, the predictions were not accurate for high molecular weight solutes in the case of 600 μm beads regarding albumin (77.70%) and AFP (32.26%).

On a biological point of view, it could be hypothesized that R was identical for both types of beads. Thus, K had to be adjusted using a trial and error procedure to make the theoretical result meet the experimental one, as proposed in Table 4. With albumin, a mass transfer coefficient K of $1.8 \cdot 10^{-8}$ m/s was found to lead to a correct C_{24} estimation.

K (m/s)	R (g/min)	$C_{24 \text{ theo}}$ (g/m^3)	$C_{24 \text{ exp}}$ (g/m^3)	Error (%)
$5.0 \cdot 10^{-8}$	$1.45 \cdot 10^{-7}$	0.91	1.48	38.51
$3.0 \cdot 10^{-8}$	$1.45 \cdot 10^{-7}$	1.25	1.48	15.54
$1.8 \cdot 10^{-8}$	$1.45 \cdot 10^{-7}$	1.47	1.48	0.68

Table 4 Concentration of albumin solute at t_{24h} estimated from the mathematical modelling $C_{24 \text{ theo}}$ and from the experiments $C_{24 \text{ exp}}$ for beads 600 μm .

The same held true for AFP. A good correlation between the AFP concentrations determined from the mathematical modelling ($C_{24 \text{ theo}} = 0.68 \text{ g/m}^3$) and from the experiments ($C_{24 \text{ exp}} = 0.63 \text{ g/m}^3$) has been found (error 7.35%).

d. Discussion

Mass transfer modelling, although widely used in chemical engineering, were not easy to translate to tissue engineering application since the cells consumptions and productions could not be determined a priori. However, our iterating method, implementing step by step plausible hypotheses, helped in the determination of both mass transfer coefficient K and “biological reaction” rate R for four different solutes of interest. This rate R could thus be translated in term of cell activity (r), considering the number (N) of cells present in the bioreactor:

$$R = r \times N \quad [9]$$

Table 5 summarizes this final iteration. The consumption/synthesis rates obtained with the same cells in classical 2D cultures (flasks) was also reported.

For the small molecular weight solutes such as ammonia and glucose, mass transfer coefficients were identical for both types of alginate beads diameter. However, concerning the high molecular weight markers such as albumin and alpha-foetoprotein, the decrease of mass transfer coefficient value for beads 600 μm diameter in comparison to beads 1000 μm diameter suggested that the porosity of this kind of beads was less important and thus the transfer more hindered. This theoretical study confirms the experimental work performed by Gautier *et al.* (2008). We hypothesized that the smaller diameter beads, being reticulated under the same conditions as the larger ones, might be too compact reducing the transfer kinetics.

	Ammonia	Glucose	Albumin	AFP
Molecular weight (Da)	17	180	66000	70000
K_{600} (m/s)	$3.0 \cdot 10^{-7}$	$3.0 \cdot 10^{-7}$	$1.8 \cdot 10^{-8}$	$1.8 \cdot 10^{-8}$
K_{1000} (m/s)	$3.0 \cdot 10^{-7}$	$3.0 \cdot 10^{-7}$	$9.0 \cdot 10^{-8}$	$9.0 \cdot 10^{-8}$
r_{Bead} (g/min/million cells)	$2.2 \cdot 10^{-9}$	$-4.4 \cdot 10^{-8}$	$2.9 \cdot 10^{-9}$	$3.0 \cdot 10^{-11}$
r_{Flask} (g/min/million cels)	$4.25 \cdot 10^{-9}$	$-2.43 \cdot 10^{-7}$	$3.09 \cdot 10^{-9}$	$1.329 \cdot 10^{-9}$

Table 5 mass transfer coefficients K for beads 1000 μm (K_{1000}) and 600 μm (K_{600}) diameter and synthesis or consumption rates in beads (r_{Bead}) determined according to the mathematical model and obtained in conventional 2D culture under static condition (r_{Flask})

Thanks to this modelling approach, the cells synthesis or consumption rates could be estimated in the bead configuration. As the cells were cultured under 3D conditions and in a matrix, these values were unsurprisingly quite different from those measured in flask under static condition. These differences in cell activity can be linked to the cell shape and/or external confinement and configuration due to the environmental structure. Indeed, in the flask, cells could spread and proliferate. In the alginate bead, cells presented a more spherical shape and entrapped in a matrix where they could not proliferate during the short delay of experiment. After the encapsulation process, these cells had to adapt to their new environment and to their new dynamic culture condition before recovering their basic metabolic activities . Kinasiwicz *et al* (2007) showed that albumin synthesis from C3A cells on the first 24 hour of fluidization was low about (200 ng/h/million cells) and reached 2000 ng/h/million cells after 14 days in alginate beads microenvironment. During this period, cells are adapted to their new environment and show excellent rate of albumin synthesis from 7 days with an exponential increase. Khalil *et al.* (2001) and Coward *et al.* (2005) with smaller beads, found the same results.

Finally, this mathematical modelling appeared as an interesting tool to scale up bioreactors. According to the amount of substances to be released to the patient in the case of liver supply, this model can help in calculating the number of cells to encapsulate, to define the volume of alginate beads and culture medium and to determine the volume of bioreactor. In parallel, this mathematical tool can help to predict the concentration of solutes at specific instants during an experiment or an in vivo application.

e. Conclusions

In bioartificial livers, many questions still need to be solved before reaching the final goal which is a widespread application to human. Our contribution to the progress in this field consists in showing the interest of developing a mathematical model taking into account both mass transfer and cell activity in a specific geometry of bioreactors, i.e. a fluidized bed bioartificial liver. Both aspects are strongly intricate : the cell metabolic activity can not be assessed in situ, but via the concentrations measured in the supernatant, i.e. after the occurrence of mass transfer.

Applied to the present system, the model confirmed that 600 μm diameter bead, did not enhance the system efficiency, probably because hindered mass transfers due to an higher reticulation degree of alginate. We could also show that biological activity per se was different when cells were cultured in this 3D structure rather than in flasks. This effect should be taken into account for scaling up studies, and more specifically to calculate the amounts of cells to use in extracorporeal systems to replace liver functions.

f. References

Canaple, L., Nurdin, N., Angelova, N. *et al.* (2001) Maintenance of primary murine hepatocyte functions in multi component polymer capsules – in vitro cryopreservation studies. *Journal of Hepatology*, 34, 11.

Coward, S. M., Selden, C., Mantalaris, A. *et al.*, (2005) Proliferation rates of HepG2 cells encapsulated in alginate are increased in a microgravity environment compared with static cultures. *Artificial Organs*, 29, 2, 152.

David, B., Barbe, L., Barthes-Biesel, D. *et al.* (2006) Mechanical properties of alginate beads hosting hepatocytes in a fluidized bed bioreactor. *International Journal for Artificial organs* 29, 756.

David, B., Doré, E., Jaffrin M. Y., *et al.* (2004) Mass transfer in a fluidized bed bioreactor using alginate beads for a future bioartificial liver. *International Journal of Artificial Organs* 27, 284.

David, B., Dufresne, M., Nagel, M. D. *et al.* (2004) In vitro assessment of encapsulated C3A hepatocytes functions in a fluidised bed bioreactor. *Biotechnol Prog*, 20, 1204.

Dore, E., Legallais, C. (1999) A new concept of bioartificial liver based on a fluidized bed bioreactor. *Ther. Apher.*, 3, 264.

Fassnacht, D., Pörtner, R. (1999) Experimental and theoretical considerations on oxygen supply for animal cell growth in fixed-bed reactors. *Journal of Biotechnology*, 72, 169.

Fassnacht, D., Rössing, S., Stange, J. *et al.* (1998) Long-term cultivation of immortalised mouse hepatocytes in a high cell density, fixed-bed reactor. *Biotechnology Techniques*, 12, 1, 25.

Gao, Y., Jiang, H. C., Xu, J. *et al.* (2005) Microencapsulating hepatocytes. *Transplantation Proceedings*, 37, 4589.

Haque, T., Chen, H., Ouyang, W. *et al.* (2005) Investigation of a new microcapsule membrane combining alginate, chitosan, polyethylene glycol, poly-L-lysine for cell transplantation applications. *Regenerative medicine*, 28, 631.

Hughes, R. D., Williams, R., (1996) Use of bioartificial and artificial liver support devices. *Semin Liver Dis*, 16, 4, 435.

Indlekofer, M., Brotz, F., Bauer, A. *et al.* (1996) Stereoselective bioconversion in continuously operated fixed bed reactors: modeling and process optimization. *Biotechnol. Bioeng.* 52, 459.

Jasmund, I., Langsch, A., Simmoteit, R. *et al.*, (2002) Cultivation of primary porcine hepatocytes in an OXY-HFB for use as a bioartificial liver device. *Biotechnol Prog*, 18, 4, 839.

Khalil, M., Shariat-Panahi, A., Tootle, R. *et al.*, (2001) Human hepatocyte cell lines proliferating as cohesive spheroid colonies in alginate markedly upregulate both synthetic and detoxificatory liver function. *J. Hepatol.*, 34, 68.

Kinasiewicz, A., Gautier, A., Lewinska, D. *et al.* (2007) Culture of C3A Cells in Alginate Beads for Fluidized Bed Bioartificial Liver. *Transplantation Proceedings* 39, 2911.

Kinasiewicz, A., Gautier, A., Lewinska, D. *et al.* (2008) Three-dimensional growth of human hepatoma C3A cells within alginate beads for fluidized bioartificial liver. *The International Journal of Artificial Organs*, 31, 340.

Kurosawa, H., Matsumura, M., Tanaka H. (1989) Oxygen diffusivity in gel beads containing viable cells. *Biotechnol. Bioeng.*, 34, 926.

Legallais, C., David, B., Dore, E. (2001) Bioartificial livers (BAL): current technological aspects and future developments. *Journal of Membrane Science*, 181, 81.

Legallais, C., Dore, E., Paullier, P. (2000) Design of a Fluidized Bed Bioartificial Liver. *Artificial Organs*, 24, 519.

Legallais, C., Gautier, A., Dufresne, M. *et al.* (2008) The place of adsorption and biochromatography in extracorporeal liver support systems. *Journal of Chromatography B*, 861, 171.

Mullon, C. (1999) Bioartificial organs may help reduce risk of zoonosis in xenotransplantation. *Artificial Organs*, 23, 4, 366.

Mullon, C., Pitkin, Z., (1999) The HepatAssist bioartificial liver support system: clinical study and pig hepatocyte process. *Expert Opin Investig Drugs*, 8, 3, 229.

Nath, S., Chand, S. (1996) Mass transfer and biochemical reaction in immobilized cell packed bed reactors: correlation of experiment with theory. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 66, 286.

Nyberg, S. L., Misra, S. P. (1998) Hepatocyte liver assist systems a clinical update. *Mayo Clin. Proc.*, 73, 8, 765.

Nyberg, S. L., Shatford, R. A., Peshwa, M. V. *et al.* (1993) Evaluation of a hepatocyte-Entrapment Hollow fiber bioreactor: A potential bioartificial liver. *Biotechnology and Bioengineering*, 41, 194.

Orive, G., Hernandez, R. M., Rodriguez Gascon, A. *et al.* (2004) History, challenges and perspectives of cell microencapsulation. *Trends in Biotechnology*, 22, 87.

Patzer, J. F., Mazariegos, G. V., Lopez, R., (2002) Preclinical evaluation of the Excorp Medical, Inc, Bioartificial Liver Support System. *J Am Coll Surg*, 195, 3, 299.

Richardson, J. F., Zaki, W. N., (1954) Sedimentation and fluidization. *Trans Inst Chem Eng*, 32.

Rozga, J., (2006) Liver support technology : an update. *Xenotransplantation*, 13, 5, 380.

Selden, C., Shariat, A., McCloskey, P. *et al.* (1999) Three-dimensional in vitro cell culture leads to a marked upregulation of cell function in human hepatocyte cell lines-an important tool for the development of a bioartificial liver machine. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 875, 353.

Seo, S. J., Kim, I. Y., Choi, Y. J. *et al.* (2006) Enhanced liver functions of hepatocytes cocultured with NIH 3T3 in the alginate/galactosylated chitosan scaffold. *Biomaterials* 27, 1487.

Shiraishi, F., Miyakawa, H., Hasegawa, T., *et al.* (1996) A computational method for determination of the mass transfer coefficient in packed-bed immobilized enzyme reactors. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 66, 405.

Wanner, O., Reichert, P. (1996) Mathematical modelling of mixed-culture biofilms. *Biotechnol. Bioeng.*, 49, 172.

Willaert, R.G., Baron, G.V., De Backer, L. *et al.* (1996) *Immobilized Living Cell Systems: Modelling and Experimental Methods.* Wiley, Chichester.

Zmora, S., Glicklis, R., Cohen, S. (2002) Tailoring the pore architecture in 3-D alginate scaffolds by controlling the freezing regime during fabrication. *Biomaterials* 23, 4087.

D. Synthèse partielle

Concernant notre collaboration avec l'équipe du Professeur Werynski de l'Institut de Biocybernétique, ce projet POLONIUM a permis une mise en commun, via des échanges bilatéraux, de nos compétences et connaissances scientifiques qui concerne tout particulièrement la technique d'encapsulation des hépatocytes dans des billes d'alginate en vue d'une culture en bioréacteur. Notre équipe utilise une encapsulation dite à extrusion alors qu'il s'agit d'une encapsulation utilisant un champ électrostatique pour le laboratoire polonais. La première est une technique rapide mais limitée à un diamètre des billes qui ne peut être inférieur à 600 μm . La seconde peut produire des billes de 200 μm de diamètre mais nécessite un dispositif relativement complexe. Les deux approches ont fait l'objet d'une étude comparative qui a concerné plusieurs étapes liées à l'encapsulation et la fonctionnalité d'un bioréacteur hépatique.

Outre une étude de la viabilité cellulaire, nous avons comparé le transfert de masse pour différents types d'alginate et différents diamètres produits à partir des deux techniques d'encapsulation. Ces paramètres auraient pu avoir une influence importante sur la diffusion de l'oxygène, des nutriments par exemple, entre le milieu nutritif dans lequel circulent les billes et les cellules maintenues à l'intérieur de celles-ci. D'après les expériences effectuées à l'UTC et à l'IBIB, nos résultats ne montrent pas de différences significatives concernant la synthèse d'albumine ou la consommation de glucose selon la technique d'encapsulation et le type d'alginate et ce sur une durée de culture en bioréacteur de 14 jours.

Enfin, dans le cadre du projet POLONIUM, une étude morphologique a été menée sur l'organisation tridimensionnelle des cellules au sein des billes d'alginate cultivées pendant 48 heures. Les hépatocytes forment en effet soit des agrégats multicellulaires sphériques, soit se disposent en microcanaux, appelés « canaliculi ». Cette structure montre que les cellules sont capables de se polariser et d'exprimer des fonctions différenciées. Nous avons étudié les paramètres à l'origine de cette organisation tubulaire et montré qu'elle dépend de la viscosité et/ou de la concentration de l'alginate utilisée pour la conception des billes. Nous avons observé que la croissance de ces canaliculi est orientée vers le centre des billes. Ces structures sont indépendantes de la méthode d'encapsulation. Ces études ont permis de mettre en valeur l'efficacité du bioréacteur à lit fluidisé jusqu'à 14 jours de culture. Ce bioréacteur, mis au point et validé par notre équipe, améliore le transfert de masse entre les cellules encapsulées et le

milieu nutritif et permet de maintenir la fonctionnalité des hépatocytes au moins jusqu'au 14ème jour (B. David a étudié la fluidisation jusqu'à 6 heures).

En conclusion, le projet POLONIUM a permis un échange bilatéral fructueux qui s'est concrétisé par deux publications et quatre présentations en congrès internationaux :

KINASIEWICZ A., GAUTIER A., LEWINSKA D., DUFRESNE M., PAULLIER P., BUKOWSKI J., LEGALLAIS C., WERYŃSKI A. Activity of cells within alginate beads produced for fluidized bed bioreactor (bioartificial liver). XXIII ESAO Congress, Umea, Juin 2006.

GAUTIER A., KINASIEWICZ A., CARPENTIER B., LEWIŃSKA D., PAULLIER P., BUKOWSKI J., WERYŃSKY A., LEGALLAIS C. In vitro optimization of alginate bead production for hepatocytes encapsulation in the fluidized bed bioartificial liver. 5th World Congress of Biomechanics, Munich, Juillet 2006.

GAUTIER A., KINASIEWICZ A., DUFRESNE M., LEWINSKA D., CARPENTIER B., PAULLIER P., BUKOWSKI J., WERYNSKI A., LEGALLAIS C. Alginate bead production for hepatocytes encapsulation in the fluidized bed bioartificial liver. 89th ICB Seminar, Varsovie, Novembre 2006.

KINASIEWICZ A., GAUTIER A., LEWINSKA D., DUFRESNE M., SMIETANKA A., BUKOWSKI J., LEGALLAIS C., WERYNSKI A. Three dimensional growth of hepatic cells in alginate beads. Studies of beads optimization for fluidized bed bioreactor. XXIV ESAO Congress, Krems, Septembre 2007.

CHAPITRE III. LE BIOREACTEUR A AIRLIFT UTILISANT L'ENCAPSULATION

Cette partie des travaux de recherche est présentée sous la forme d'un article intitulé « Solid-liquid mass transfers in an Airlift Reactor incorporating alginate beads for the application as a bioartificial liver » publié dans le journal *Chemical Engineering and Processing* en 2008 et rédigé par S. Demming, A. Gautier, C. Legallais et A. Ould-Dris. Cet article présente certains résultats du projet de fin d'études de Steffie Demming, encadrée par A. Ould-Dris et C. Legallais, et avec qui j'ai pu travailler lors de ma première année de thèse. Il propose une nouvelle géométrie de foie bioartificiel appelé Airlift Reactor utilisé plus communément dans le domaine de la biotechnologie. Il nous a semblé intéressant de transférer cette technologie vers notre application. Ce type de réacteur, également employé en Génie Chimique, met en mouvement la phase fluide grâce à l'apport de gaz sous forme de bulles. L'idée est de garder les cellules encapsulées dans des billes d'alginate et de tester ce nouveau bioréacteur en plaçant les billes d'alginate dans le fluide mis en mouvement par les bulles d'air. Ce système semble avantageux par rapport à celui du bioréacteur à lit fluidisé du fait qu'on est moins limité par le régime de perfusion. En effet, comme il existe une faible différence de densité entre le plasma et les billes, le flux de perfusion est limité dans le bioréacteur à lit fluidisé afin que les billes ne s'échappent pas de l'enceinte du bioréacteur. Or, dans cette nouvelle géométrie, les débits ne sont pas pas limités car l'ensemble est en mouvement dans une boucle. Il n'y a donc pas de risque d'échappement des billes.

Dans un premier temps, nous avons cherché à caractériser ce réacteur au niveau physique de façon expérimentale et théorique. Après expérience, il s'est avéré que la vitesse du gaz, responsable de la formation de bulles et donc de l'écoulement du fluide dans le dispositif, n'influence guère les transferts de masse. Par la suite, nous nous sommes intéressés à l'incidence de la fraction solide (volume de billes/volume fluide) sur les transferts de masse en faisant varier cette fraction de 0.07 à 0.36 à une vitesse de gaz fixé à 1.16 cm/s. Plus la fraction de solide est importante, plus la surface des billes disponible pour les échanges est grande et donc plus l'équilibre des concentration est bas.

Dans cet article, nous avons aussi mis en évidence l'effet de « gonflement » des billes appelé « swelling » qui est dû à la fois à la composition chimique du milieu environnant et aussi à l'effet convectif entraîné par le brassage des billes d'alginate dans la circulation du fluide aéré par les bulles d'air.

Finally, to compare the efficiency of this new device with that of the fluidized bed bioreactor, mass transfer rates were evaluated using a known molecular weight marker, vitamin B12, in both systems. The comparison between the two geometries of the bioreactor allowed us to show that mass transfer rates are of better quality in the Airlift Reactor, mainly because the relative velocity between the beads and the surrounding fluid is much higher, compared to that of the fluidized bed. It remains now to know the limits of this fluid velocity in the presence of cells. In fact, if the fluid velocity is important, and mass transfer rates are optimized, a certain limit must be guaranteed to not alter the behavior of the cells: viability and essential cellular functions for the application of an artificial liver.

This first feasibility study brings us back to the first characterization work of the fluidized bed bioreactor, and will in the future be enriched by *in vitro* experiments with cells, in a similar approach to the one already used in the laboratory.



Solid–liquid mass transfers in an Airlift Reactor incorporating alginate beads for the application as a bioartificial liver

Stefanie Demming^{a,1}, Aude Gautier^{b,2}, Cécile Legallais^{b,2}, Aissa Ould-Dris^{c,*}

^a *Institut für Mikrotechnik, Alte Salzhalmer Str. 203, 38124 Braunschweig, Germany*

^b *UMR CNRS 6600, Biomécanique et Génie Biomédical, Université de Technologie de Compiègne, BP 20529, 60205 Compiègne Cedex, France*

^c *CNRS-UMR 6067, Laboratoire de Génie des Procédés Industriels, Université de Technologie de Compiègne, BP 20529, 60203 Compiègne Cedex, France*

Received 15 May 2007; received in revised form 18 January 2008; accepted 27 January 2008

Available online 5 February 2008

Abstract

Airlift Reactors may present an alternative to fluidized bed bioreactors with integrated alginate beads in order to immobilize hepatocytes for bioartificial liver use. The present study was aimed to examine the bi-directional mass transfers of the marker Vitamin B₁₂ between the surrounding fluid and the empty alginate beads. A simplified mathematical model based on Fick's first law was applied to describe diffusive mass transfer at the interface between the fluid and the beads calculating the overall mass transfer coefficients for both static and dynamic experimental conditions.

Comparing with the Fluidized Bed Reactor, the more shear enhanced diffusion coefficient for Vitamin B₁₂ was 1.5 times higher verifying the efficiency of such a device. Increased shear rates in Airlift Reactors are provoked by additional turbulences due to the rising bubbles. Furthermore, it could be proven that the overall mass transfer mainly depends on the relative velocity between the external fluid and the alginate beads.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Mass transfer; Airlift Reactor; Bioreactor; Alginate beads; Swelling; Bioartificial liver

1. Introduction

The loss of cellular hepatic functions results in a damage or disruption of indispensable metabolic functions of the liver. Fulminant hepatic failure and acute episodes in chronic liver failure give rise to a high mortality rate in case of the abrupt loss of liver functions. Patients with severe life-threatening liver diseases depend on organ transplantations which remains so far the only efficient and acknowledged treatment to improve patient survival [1]. However, a universal shortage of liver donors causes roughly 20% of mortality among the patients depending on a liver transplantation [2]. Since 20 years, the expanding gap between the quantity of liver transplants and the number of patients waiting

for a donated liver has underlined the necessity of a temporary liver support system. This artificial device could serve as a bridge until a suitable organ for transplantation is allocated or until the severely pathologic changed liver has recuperated its native liver functions.

Besides purely artificial liver support systems which can only mimic the detoxification functions [3], the idea of an extracorporeal bioartificial liver (BAL) is to profit hepatocytes entrapped in three-dimensional anchorage framework and placed into a bioreactor to perform main liver functions [4,5]. Due to an efficient and controlled environment provided by the immobilization of the cells their viability is enhanced. Capsule or beads grant a hydrated space with a semi-permeable membrane for the diffusion of nutrients and metabolites to and from the cell material [6–11].

The most commonly used material for cell encapsulation and drug delivery for biomedical applications such as tissue engineering and cell transplantation is calcium alginate, which proffers a favourable and hospitable environment for the cell roles. Its high facility to put in form under very mild condi-

* Corresponding author. Tel.: +33 3 44 23 44 37; fax: +33 3 44 23 19 80.

E-mail addresses: s.demming@tu-bs.de (S. Demming),

Aude.Gautier@utc.fr (A. Gautier), cecile.legallais@utc.fr (C. Legallais), oulddris@utc.fr (A. Ould-Dris).

¹ Tel.: +49 531 391 9769; fax: +49 531 391 9751.

² Tel.: +33 3 44 23 44 01; fax: +33 3 44 23 79 42.

tions, its biocompatibility and low prices because of abundance in source is advantageous to alginate beads [12]. Several types of alginate beads or capsules have been designed and tested for future BAL purposes [13–16].

Within the so far tested perfusion bioreactor systems, the alginate beads were usually distributed either in a fixed or in a Fluidized Bed Reactor (FBR). With low perfusion fluid velocity the risk of the formation of preferential channels exists; a reduced efficiency of marker exchange between the beads and the surrounding medium is the consequence. It has already been proven that the mass transfer properties in a FBR could be improved 20 times compared to batch conditions due to the shear enhanced diffusion [17].

However, one limitation of the FBR depends on the small density difference between plasma and beads which could cause the release of beads out of the reactor system. Moreover, mass transfer properties in FBRs are restricted by low shear rates due to limited perfusion velocity which can result in a rate of unused cellular mass. Oxygenation, which is a key to cell function, might be sub-optimally included into the actual Fluidized Bed Reactors.

We developed a new BAL concept, called the Airlift Reactor (ALR) letting the fluid circulate in the reactor on account of injected gas bubbles which provokes the displacement of the fluid phase. Contact between the beads and the fluid is performed due to a homogeneous circulation in the moving bed loop. This type of bioreactor is well known for biotechnology applications [18–20] but has not been applied yet in the field of bioartificial liver with its inherent constraints.

This type of reactor offers many advantages over other multiphase reactors employed in chemical and biochemical engineering: simple construction, no mechanically moving parts, space-saving design, good mass transfer properties, high thermal stability, low energy supply and hence low construction and operation costs [21]. The dual function of agitation and aeration of the suspension appears therefore promising for the application as an extracorporeal liver supply system.

The present study aimed at demonstrating the mass transfer properties between the inner of the beads and the surrounding medium using Vitamin B₁₂ as marker substance inside the ALR. This step is mandatory before going further in the BAL design, and Vitamin B₁₂ was chosen as a well-known molecular marker not interacting with alginate [22]. Results were compared to the outcomes formerly obtained in the FBR in calculating the overall mass transfer coefficient. For the medical application of the BAL it is important to know the diffusion and exodiffusion behavior of the gel beads, also known as the ingress and egress process. For an adequate liver supply system both nutrients and metabolites have to be exchanged between the immobilized liver cells in the alginate beads and the surrounding media, represented in the clinical application as the patient's plasma.

In general, the global transport mechanism can be described at least by two steps: the external diffusion from the fluid to the bead and the internal diffusion within the bead.

2. Experimental

2.1. Airlift Reactor and Fluidized Bed Reactor

Fig. 1a illustrates the used set-up of the ALR, which was composed of two cylindrical Plexiglas tubes both for the riser and for the downcomer that were connected by a flexible tube and on the top by a gas disengagement tank. The dimensions of the device were set to contain a total volume of 300 mL to provide a working circulation of the fluid. The system operated under pressured gas input rates introduced beneath the riser ranging from 23 mL/min to 283 mL/min which was controlled by a rotameter Sho Rate Brooks Emerson (France) and a clamp serving as a valve.

The employed volume fraction of alginate beads ranged between 0.07 and 0.36.

In the FBR the liquid entered the reactor by means of a nozzle, following a perforated plate to allow a homogeneous distribution of the perfusion velocity over the section (Fig. 1b). The beads

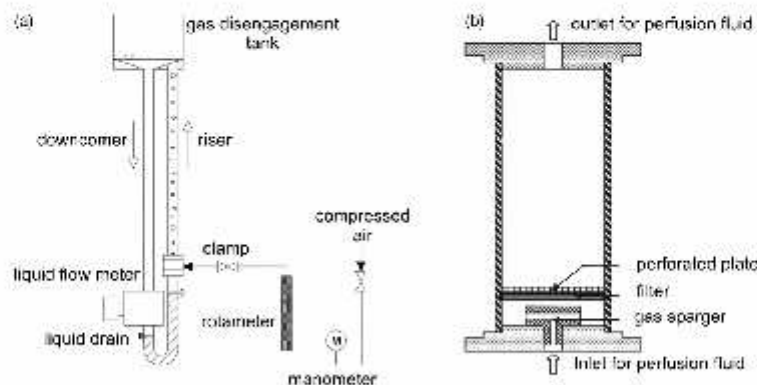


Fig. 1. (a) Set-up of the used ALR and (b) set-up of the used FBR.

circulated inside the coaxial column due to the induced superficial fluid velocity and were kept in a fixed volume preventing any release out of the reactor insured by a special safety height of the reactor column [23]. Under optimized hydrodynamic conditions a homogeneous biphasic mixture can be promoted within a stable bed expansion resulting from a permanent and cyclic movement of the solid material. For the experiments in the FBR the perfusion velocity of the supernatant was set to the maximum possible in order to avoid any bead release out of the reactor.

2.2. Production of alginate beads

Gel beads without cell material were produced in our laboratory by means of an extrusion method using alginic acid sodium salt from brown algae (Sigma–Aldrich, USA). Droplets of alginate solution (0.22 g alginate in 155 mM NaCl and 10 mM HEPES, pH 7.4) were formed with a multi-gauge system, self designed by our research group. The bead size was controlled by using a parallel air flow rate of 12.5 mL/min which was sterilized by means of a glass micro fiber filter (Hepa-Cap, Whitman). In a calcium casting bath (154 mM NaCl, 150 mM CaCl₂, 10 mM HEPES) the beads cross-linked within 15 min. After rinsing the beads twice with serum physiologic (137 mM NaCl, 2 mM KCl, 0.28 mM Na₂HPO₄) they were stored in the same solution. Under these conditions spherical gel beads with a diameter of 1 mm and a tolerance of ± 0.2 mm could be produced [23]. The overall porous structure of the alginate beads allows immobilization of viable cell material granting the diffusion of nutrients and metabolites to and from the cell material.

2.3. Experimental determination of kinetic curves of Vitamin B₁₂

In physiological buffer (137 mM NaCl, 2 mM KCl, 0.28 mM Na₂HPO₄) a single component solution of 73.8 $\mu\text{mol/L}$ of Vitamin B₁₂, a neutral, low molecular mass marker (MW of 1355 Da) was prepared. The analysis method was based on spectrophotometry through absorption carried out with the spectrophotometer U-2001 Hitachi at the optical density of 360 nm.

Before starting each experiment specific volumes of gel beads were measured in a graduated cylinder. The saline solution used for the beads storage was then withdrawn manually by the suction effect of a pipette. The total bead volume could therefore be determined with the void fraction of the fixed bed. The graduated cylinders were refilled up to the total volume with Vitamin B₁₂ enriched saline solution which was then instantly placed into the bioreactor. Once the equilibrium concentration for Vitamin B₁₂ was reached, the reversibility of the mass transfer could be assessed by replacing the liquid volume with uncolored saline solution in order to evaluate the egress of Vitamin B₁₂ out of the gel beads into external fluid. The mass transfer for Vitamin B₁₂ was examined with empty beads in both batch experiments under static and dynamic configurations.

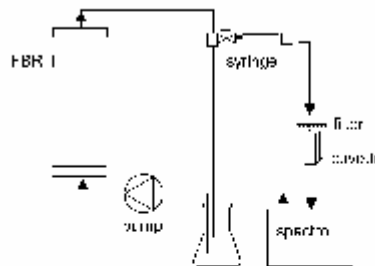


Fig. 2. Measurement method to evaluate mass transfer in the FBR.

2.3.1. Static configuration

The static case was used to determine the maximal concentration diffusing into the beads in order to determine the total porosity of one bead. In Schott flasks of a total volume of 200 mL the ingress and egress behavior was analyzed for 0.11 and 0.28 of solid bead fraction. Samples were taken over a day.

2.3.2. Dynamic configurations

In dynamic configurations mass transfer behavior was investigated for both the FBR and ALR. The overall volume applied in each experiment for the FBR and ALR was 188 mL and 300 mL, respectively, due to vessel configuration. In any case, the key point was the alginate bead over supernatant volume ratio.

The dynamic experiments in the FBR were accomplished with the experimental set-up illustrated in Fig. 2 at ambient temperature. The peristaltic pump (Watson Marlow 302S, Cornwell, England) circulated 30 mL/min of liquid through the closed loop reactor system. Samples of 1 mL were taken by means of a 5 mL syringe (Terumo, Belgium). Its needle (21 G \times 1 in., 0.8 \times 25, Terumo) was fixed into a membrane placed into the external circuit, directly behind the outlet stream of the reactor. The needle was connected to the syringe by means of a syringe valve. This configuration permitted constant and direct measurement of the solute concentration until a steady equilibrium was reached. Passing the probe through a self-made filter cuvette with a pore size of 200 μm , any falsification of the measured results due to remaining gel beads could be prevented. After being analyzed three times in the spectrophotometer, the specimen was replaced into the bioreactor through the opening of the reservoir implemented into the closed loop circuit. Samples were taken every minute.

The measurement method to estimate mass transfer behavior in the ALR is depicted in Fig. 3. With a pipette (Eppendorf) 1 mL samples were taken out from the open gas disengagement tank. After passing it through the filter cuvette the sample was analyzed in the spectrophotometer. After attaining the diffusion equilibrium the volume was taken out of the reactor by loosening the tube clip which connects the down-comer tube and the flexible tube. The content was distributed into the graduated cylinders to suck out the initial solution enriched with Vitamin B₁₂ in order to continue with the egress process.

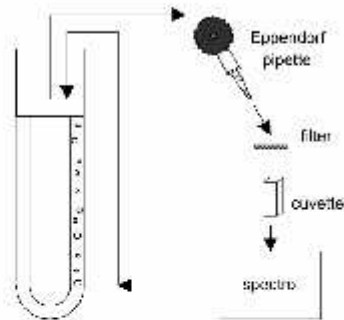


Fig. 3. Measurement method to evaluate mass transfer in the ALR.

2.4. Characterization of the swelling phenomenon of the beads

In order to understand the swelling phenomenon of the alginate beads better, several experiments were carried out. Swelling of one single gel bead was examined by analyzing the changing in diameter after storage in test tubes with different surrounding mediums (3 mL) by means of an optical microscope, model Wild M3 Heerbrugg.

3. Results and discussion

3.1. Kinetics of mass transfer in the ALR

Fig. 4 shows a typical example of exponential variation with time for the fluid concentration of Vitamin B₁₂ in the ALR. Data are obtained under dynamic conditions with a solid volume fraction α of 0.28 and a gas velocity of u_g of 1.16 cm/s.

Marker ingress is referred to the diffusion of Vitamin B₁₂ from the fluid into the beads, whereas marker egress stands for the reverse solute transfer from the interior of the beads into the surrounding media. The liquid concentration decrease observed during ingress phase as well as increase in the egress phase indi-

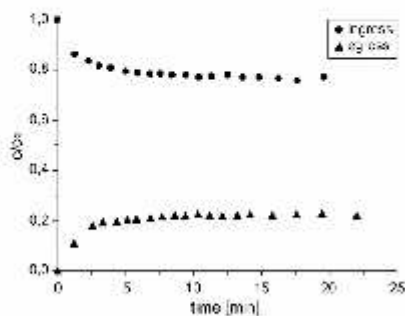


Fig. 4. Dynamic case in the ALR: time course of Vitamin B₁₂ concentration during ingress and egress for solid volume fraction $\alpha = 0.28$ and gas velocity $u_g = 1.16$ cm/s.

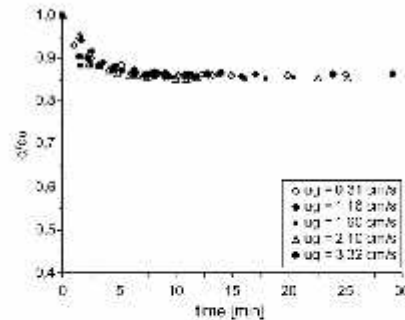


Fig. 5. Effect of different gas velocities u_g on the time course of Vitamin B₁₂ concentration during ingress ($\alpha = \text{constant} = 0.28$).

cates effective mass transfers between the fluid and the interior of the beads and reflects the quantity of Vitamin B₁₂ penetrating into and out of the empty gel beads. After around 10 min the equilibrium state was reached.

3.2. Effect of operating conditions in the ALR based on experimental data

3.2.1. Superficial velocity

In Fig. 5 the effect of different gas velocities u_g on the time course of Vitamin B₁₂ for the ingress phase can be observed. The total solid volume fraction was kept constant at 0.28. No significant changes of the different time courses are shown.

3.2.2. Solid volume fraction of alginate beads

In Fig. 6 the effect of different solid volume fractions on the time course of Vitamin B₁₂ concentration in the liquid during ingress is depicted. The gas velocity remained constant at 1.16 cm/s. With increasing solid volume fraction, the total surface area of the beads augments: equilibrium concentration depends on the volume of the beads because its overall capacity is changed. This results in a lower equilibrium concentration for higher solid volume fractions.

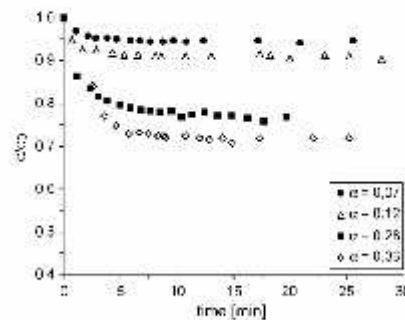


Fig. 6. Effect of different solid volume fractions α on the time course of Vitamin B₁₂ concentration during ingress ($u_g = \text{constant} = 1.16$ cm/s).

3.3. Calculation of overall mass transfer coefficients

In a first study, we used the model already described by David et al. [17]: we attempted to determine the kinetics of mass transport using a simplified mathematical model based on Fick's first law, which describes quasi steady state diffusive mass transfer at the interface between the fluid and the bead. Moreover, it was hypothesized that the volume of the external fluid V_1 (total volume devoid of beads) and its marker concentration c_1 remained homogeneous in the entire reactor. As a second assumption, the inner concentration c_b of the accessible volume in the beads $V_{b,ac}$ should also reveal a homogeneity. It was supposed that the mass of Vitamin B₁₂ stayed constant within the reactor system.

3.3.1. Overall mass transfer coefficient K_i for marker ingress

As already stated by David et al. [17] the internal mass transfer is assumed to be fast due to the small diameter of the beads. Therefore the mass balance for the marker concentration in the external fluid and in the bead can be written as Eqs. (1) and (2), respectively:

$$\frac{dm_1}{dt} = -V_1 \frac{dc_1}{dt} = KA(c_1 - c_b) \quad (1)$$

$$\frac{dm_b}{dt} = V_{b,ac} \frac{dc_b}{dt} = KA(c_1 - c_b) \quad (2)$$

where K is the overall mass transfer coefficient. The total external bead surface area A available for the mass transport was calculated by the total number of beads, knowing their bead volume. Special simple solutions of both equations exist when the marker transport shows only a diffusive character and the solute penetrates freely into the bead pores. It was supposed that the distribution of the marker within the beads porosity was homogeneous.

Combining the two Eqs. (1) and (2) according to the conservation of mass the final concentration c_∞ in both the fluid $c_{1,\infty}$ and bead $c_{b,\infty}$ can be determined under the assumption that the initial marker concentration in the beads $c_{b,0}$ is zero.

$$-V_1 \frac{dc_1}{dt} = V_{b,ac} \frac{dc_b}{dt} \Leftrightarrow V_{b,ac}(c_b - c_{b,0}) = -V_1(c_1 - c_{1,0}) \quad (3)$$

$$c_{b,\infty} = c_{1,\infty} = c_\infty = \frac{V_1 c_{1,0}}{V_1 + V_{b,ac}} \quad (4)$$

At equilibrium state equal marker concentration in both the supernatant $c_{1,\infty}$ and the bead $c_{b,\infty}$ is reached. The simple solution (5) from Eq. (1) is calculated knowing the initial and final conditions to describe the time course of the marker concentration variation c_1 in the external fluid.

$$c_1 = c_\infty + (c_{1,0} - c_\infty) \exp\left(-\frac{K_i A}{V_{b,ac} V_1} (V_{b,ac} + V_1) t\right) \quad (5)$$

The overall mass transfer coefficient for marker ingress K_i can thus be determined from the slope of the linear regression com-

puted with the experimental curves of (6):

$$-\ln\left(\frac{c_1 - c_\infty}{c_{1,0} - c_\infty}\right) = -\frac{At}{V_{b,ac} V_1} (V_{b,ac} + V_1) K_i \quad (6)$$

In this equation, both the bead volume accessible to the marker solution $V_{b,ac}$ and the final concentration c_∞ are critical for exact determination. Moreover, existing small inaccuracies of these values would induce high errors in the calculated value of K due to the exponential correlation. Two different approaches were applied in order to define these parameters. In a first attempt, the final concentration c_∞ was expressed by the average of the measured concentrations when the equilibrium state was reached. Doing this, $V_{b,ac}$ could be directly expressed with Eq. (4). The second approach consisted in assuming the total accessible bead volume to the marker determined in the static case experiments, in order to calculate the final concentration according to (4). The total porosity of a bead according to the static experiments could be approximated to be 70% for a 1 mm diameter bead. The results calculated by the two methods showed similar values.

3.3.2. Overall mass transfer coefficient K_e for marker egress

To determine the mass transfer coefficient K_e for solute release the same method as for the determination of K_i was applied. The relation (7) was obtained for the time course variation of the marker concentration during the egress phase.

$$c_1 = c_\infty - c_\infty \exp\left(-\frac{K_e A}{V_{b,ac} V_1} (V_{b,ac} + V_1) t\right) \quad (7)$$

where the final concentration can be written as (8):

$$c_\infty = \frac{V_b c_{b,0}}{V_1 + V_b} \quad (8)$$

Tracing the linear regression of the experimental curve (9) the value for the overall mass transfer coefficient for marker egress K_e could be evaluated.

$$-\ln\left(\frac{c_1 - c_\infty}{c_\infty}\right) = -\frac{At}{V_{b,ac} V_1} (V_{b,ac} + V_1) K_e \quad (9)$$

Figs. 7 and 8 illustrate typical examples of linear regressions resulting from experimental data of the temporal concentration evolution for Vitamin B₁₂ ingress collected under dynamic conditions in the ALR and FBR, respectively.

In general, the regression coefficients of the traced slope ranged between 0.94 and 1, and gave therefore reliable approximations of the overall transfer coefficient.

3.4. Effect of operating conditions in the ALR based on estimated overall mass transfer coefficients

3.4.1. Superficial velocity

Fig. 9 shows the overall mass transfer coefficients obtained as a function of the gas velocity for both solute ingress and egress at constant solid volume fraction of 0.19. The values were obtained with both approaches according to the final concentration c_{final} and the total accessible bead volume V_b . Due to the fact that

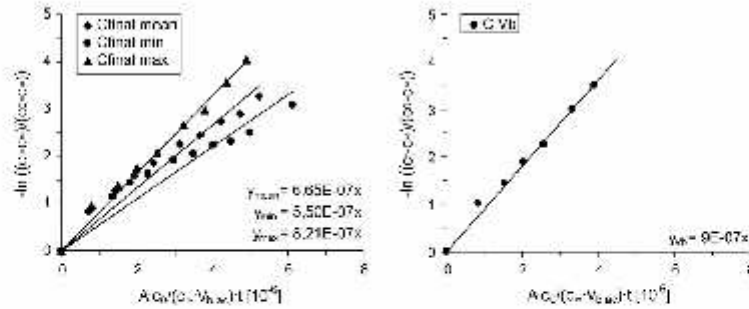


Fig. 7. Example of linear regression obtained from the time course of Vitamin B₁₂ during ingress in the ALR ($\alpha = 0.28$; $u_g = 1.16$ cm/s): expressing c_{00} as the average of measured values (left), presuming a bead porosity of 70% to determine c_{00} (right).

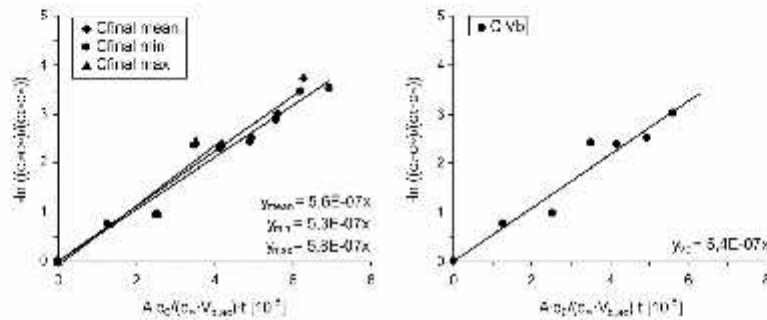


Fig. 8. Example of linear regression obtained from the time course of Vitamin B₁₂ during ingress in the FBR ($\alpha = 0.24$): expressing c_{00} as the average of measured values (left), presuming a bead porosity of 70% to determine c_{00} (right).

the dispersion of the results are similar for all the four curves, statistical analysis has only be graphically illustrated for marker ingress as an example in order to not overload the graph.

It is striking that no significant influence of the gas velocity on the overall transfer coefficient could be noticed for several experiments. However, this result seems to be coherent when

regarding the relative velocity between the fluid and the bead velocity.

Because the acceleration zone of the particles only exists in a very small section in the bottom part of the riser, it can be assumed that in the major tube of the riser the relative velocity between the fluid and the particles is given by the terminal sinking velocity of one bead. Therefore, the flow profile around one alginate bead remains the same for any superficial gas velocity and allows constant mass transfer conditions provoked by a constant shearing strain between the fluid and the bead.

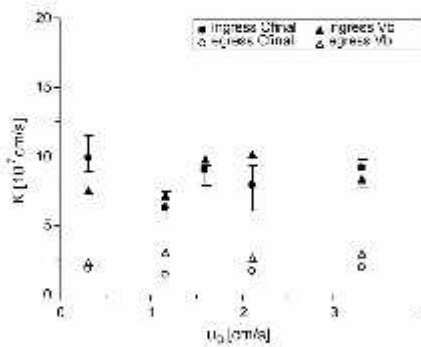


Fig. 9. Overall mass transfer coefficients K obtained under dynamic conditions in function of u_g for marker ingress and egress in the ALR and constant $\alpha = 0.19$.

3.4.2. Solid volume fraction of alginate beads

In Fig. 10 the transfer coefficients for both ingress and egress in the ALR are illustrated in function of the solid volume fraction at constant velocity $u_g = 1.16$ cm/s.

It is apparent that transport coefficients increase for smaller solid volume fractions from about 6×10^{-7} cm/s to 12×10^{-7} cm/s for concentrations from 0.2 to 0.06, respectively. This result could be due to a more turbulent flow pattern provoked by the helically rising of bubbles which exists only for highly diluted suspensions. For higher solid volume fractions, the wobbling character of bubbles is restricted: bubbles rise in a vertical manner. The transfer coefficient remained constant for increasing gas velocities.

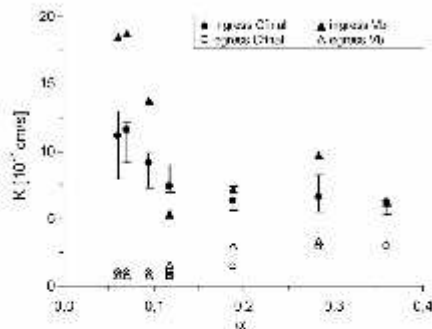


Fig. 10. Overall mass transfer coefficients K obtained under dynamic conditions in function of α for marker ingress and egress in the ALR and constant $u_0 = 1.16$ cm/s.

For increasing solid volume fraction, it cannot be assumed anymore that the concentration of the external fluid stays constant. In contrast, the formation of bead aggregates provokes that the mass transfer is reduced. This effect can be understood, when visualizing that several gel beads produce a cluster under conditions of higher solid volume fractions, representing a bead with a bigger diameter. Facing these aggregates with bigger diameter, the concentration gradient is reduced compared to single gel beads and therefore results in a smaller mass transfer.

For all mass transfer experiments undertaken in the ALR the estimated transfer coefficients for ingress phase were always higher than those for egress. During the experiments a swelling of the beads could be encountered which is probably due to the exchange of Ca^{2+} and Na^+ between the cross-linked gel bead and the surrounding limiting effective crosslinking. If the concentration in the surrounding medium lacks of CaCl_2 , which is the case for the used surrounding medium serum physiologic, Ca^{2+} ions are released from the gel bead into the liquid in order to reach the same equilibrium as in the casting bath. Vice versa Na^+ ions diffuse from outside into the gel beads, replacing the empty places. However, because of the lower valence, Na^+ does not provide effective crosslinking between the alginate monomers (α -L-guluronic acid) resulting in a smaller ramification than for Ca^{2+} .

If swelling can be considered, the transport phenomenon is not only influenced by diffusion, but also by convection. This would mean, that in case of the ingress phase, the transport coefficients calculated with our model were overestimated, whereas the coefficients for the egress phase were underestimated, as schematically shown in Fig. 11. This means that during ingress process the convection term is added to the diffusion (a), whereas

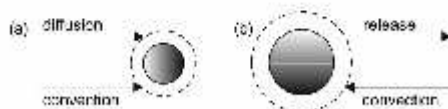


Fig. 11. Diffusion and convection phenomenon.

it is subtracted from the diffusion when further swelling is produced during marker release (b). Because of the fact that a swelling phenomenon of the beads was not foreseen at the beginning of the experimental program, but could be verified with the analysis of the experimental data, the convective transport was not included into theoretical considerations. This effect will be investigated in further studies.

On the other hand, for the convective transport to be taken into account in the model, the kinetics of the beads swelling must be known. Consequently, even if the convective transport was included into the model, it could not be validated by the experimental results.

The swelling phenomenon would present a reason for the difference between transfer coefficients for ingress and egress. It also justifies the fact that the transfer coefficients for ingress decrease with an increase of the solid fraction (Fig. 10). The ion exchange decreases for higher solid fractions, which means that the swelling phenomenon is less dominant for each bead. This results in more similar values of transfer coefficients for ingress and egress.

3.5. Swelling effect

In 20 samples of one single bead continuously shaken in 3 mL of serum physiologic Vitamin B_{12} during 40 min a mean swelling in diameter of 36% was observed. The minimal and maximal value of the increased diameter was 25% and 50%, respectively. In culture medium lower swelling values are obtained in comparison to saline solution, ranging between 17% and 35% with a mean value of 26%. This result can be justified considering the concentration of NaCl and CaCl_2 in each surrounding medium as listed in Table 1.

Culture medium contains in comparison to serum physiologic CaCl_2 , if though only 1.6 mM, which implicates a lower concentration gradient between bead and surrounding medium than in the case of serum physiologic. Moreover, the concentration of NaCl in the culture medium is with 100 mM about one-third smaller than the concentration in the casting bath of 154 mM. However, serum physiologic contains same concentration of NaCl as the casting bath.

It could also be shown that bead swelling is enhanced by higher shear rates: beads under constant turbulences due to continuous shaking ballooned with 36% about twice as much as those that were kept in motionless storage giving values of only 19% diameter increase for the same time span. For extreme high shear rates, it could be observed that whole alginate beads even disappeared when being shaken for any length of time.

This shear enhanced swelling could also be a reason for the elevated deviations of the mass transfer coefficients K obtained

Table 1
Ionic concentration of NaCl and CaCl_2 for different surrounding mediums

	NaCl [mM]	CaCl_2 [mM]
Casting bath	154	153
Serum physiologic	154	0
Culture medium	100	1.6

under dynamic conditions for marker ingress in high-diluted systems, which were calculated with the method based on bead porosity (Fig. 10). The values of $V_{b,ac}$ are therefore underestimated for low concentrated suspensions in the case of increased swelling, resulting in an overestimated transfer coefficient.

3.6. Comparison of transfer characteristics between ALR and FBR

Comparing the two reactor systems, the average value of the overall transfer coefficient ($K_{1,ALR} = 8.5 \times 10^{-7}$ cm/s for $\alpha = 0.19$) obtained in the ALR is 1.5 times higher than K_1 attained in the FBR ($K_{1,FBR} = 5.4 \times 10^{-7}$ cm/s for $\alpha = 0.24$). The variation in mass transfer is mainly due to the different relative velocity between the beads and the supernatant achieved in both types of reactor. It is apparent, that it is not possible to obtain the same relative velocity in the FBR as in the ALR. In order to attain a relative velocity equal to the terminal sinking velocity of one bead in the FBR, the beads would be released out of the reactor. In order to prevent bead displacement out of the reactor, the achieved relative velocity in the FBR will always be lower when compared to the ALR, resulting in a reduced mass transfer. Moreover, due to the usually higher solid concentration of beads in a FBR when compared to an ALR the mass transfer results smaller due to a modified concentration profile between the bead aggregates.

Furthermore, the solute mass transport in the ALR is promoted by additional turbulences produced by the rising bubbles, which ascend in a wobbling manner following a spiral trajectory.

4. Conclusion

The purpose of this study was to characterize a new type of bioreactor – an Airlift Reactor – for application as an extracorporeal liver support system, based on experimentally and theoretically determined mass transfer properties. A comparative trial with the formerly studied Fluidized Bed Reactor served to define optimization factors of the utilized bioreactors for future therapy application.

For all mass transfer experiments, the global transport coefficient for marker ingress is always higher than the values for egress. This could be due to a bead swelling phenomenon which occurs during the dynamic diffusion phase. This swelling, caused by ion exchange between the cross-linked gel bead and the surrounding liquid, could be accompanied by a convective transfer and presents therefore the reason for the difference between the global transfer coefficients of ingress and egress phase.

Moreover, the average value of the overall transfer coefficient obtained in the ALR was 1.5 times higher than in the FBR. This difference indicates that enhanced shear rates provoked by additional turbulences due to the rising bubbles promotes solute mass transport in the ALR. Moreover, it could be shown that the overall mass transfer depends on the relative velocity between the external fluid and the alginate beads. Therefore the mass transfer achieved in the ALR is not limited by any constructional barriers, such as the obligatory security height in the FBR, and

supposes therefore a convincing device for the application of a bioartificial support system.

Swelling phenomenon should be investigated more precisely in order to analyze the consequences on mechanical bead properties as well as cell protection and viability of the formerly entrapped hepatocytes. A perspective of gel bead stabilization could be presented by the use of a protective membrane layer.

Appendix A. Nomenclature

A	total external and initial bead surface area
ALR	Airlift Reactor
BAL	bioartificial liver
c_b	marker concentration in the beads
$c_{b,0}$	initial marker concentration in the beads
$c_{b,\infty}$	final marker concentration in the bead
c_1	marker concentration in the liquid
$c_{1,\infty}$	final marker concentration in the liquid
FBR	Fluidized Bed Reactor
K_e	overall mass transfer coefficient for marker egress
K_1	overall mass transfer coefficient for marker ingress
u_g	superficial gas velocity
$V_{b,ac}$	accessible volume in the beads
V_1	total volume devoid of beads
α	solid volume fraction

References

- [1] R.W. Chapman, D. Forman, R. Peto, S. Smallwood, Liver transplantation for acute hepatic failure, *Lancet* 335 (1990) 32–35.
- [2] S. Cao, C.O. Esquivel, E.B. Keeffe, New approaches to supporting the failing liver, *Ann. Rev. Med.* 49 (1998) 85–94.
- [3] H. Bertani, R. Gelmini, M.G. Del Buono, N. De Maria, M. Girardis, V. Solfrini, E. Villa, Literature overview on artificial liver support in fulminant hepatic failure: a methodological approach, *Int. J. Artif. Organs* 25 (2002) 903–910.
- [4] A. Kamlot, J. Rozga, E.D. Watanabe, A.A. Demetriou, Review: artificial liver support systems, *Biotechnol. Bioeng.* 50 (1996) 382–391.
- [5] J.W. Allen, T. Hassanein, S.N. Bhatia, Advances in bioartificial liver devices, *Hepatology* 34 (2001) 447–455.
- [6] T.M.S. Chang, Therapeutic applications of polymeric artificial cells, *Nat. Rev. Drug Discov.* 4 (2005) 221–235.
- [7] H.W. Mathew, S.O. Salley, W.D. Peterson, D.R. Deshmukh, A. Mukhopadhyay, M.D. Klein, Microencapsulated hepatocytes. Prospects for extracorporeal liver support, *ASAIO Trans.* 37 (1991) 328–330.
- [8] B. Clément, M. Desille, B. Frémond, J.P. Campion, C. Guguen-Guillouzo, M. Bourel, A. Guillouzo, Hépatocytes en thérapie cellulaire, *Transfus. Clin. Biol.* 5 (1998) 80–87.
- [9] L. Canaple, N. Nardin, N. Angelova, D. Saugy, D. Hunkeler, B. Desvergne, Maintenance of primary murine hepatocyte functions in multicompartment polymer capsules in vitro cryopreservation studies, *J. Hepatol.* 34 (2001) 11–18.
- [10] Y. Zhou, T. Sun, M. Chan, J. Zhang, Z. Han, X. Wang, Y. Toh, J.P. Chen, H. Yu, Scalable encapsulation of hepatocytes by electrostatic spraying, *J. Biotechnol.* 117 (2005) 9–109.
- [11] T. Aoki, T. Koizumi, Y. Kobayashi, D. Yasuda, Y. Izumida, Z. Jin, N. Nishino, Y. Shimizu, H. Kato, N. Murai, T. Niya, Y. Enami, K. Mitamura, T. Yamamoto, M. Kusano, A novel method of cryopreservation of rat and human hepatocytes by using encapsulation technique and possible use for cell transplantation, *Cell Transplant.* 14 (2005) 609–620.
- [12] O. Smidsrød, G. Skjåk-Bræk, Alginate as immobilization matrix for cells, *Trends Biotechnol.* 8 (1990) 71–78.

- [13] V. Dixit, M. Arthur, R. Reinhardt, G. Gitnick, Improved functions of micro-encapsulated hepatocytes in a hybrid bioartificial liver support system, *Artif. Organs* 16 (1992) 336–341.
- [14] B. Fremont, A. Joly, M. Desille, J.F. Desjardins, J.P. Campion, B. Clement, Cell-based therapy of acute liver failure: the extracorporeal bioartificial liver, *Cell Biol. Toxicol.* 12 (1996) 325–329.
- [15] T.M. Rahman, C. Selden, M. Khalil, I. Diakanov, H.J. Hodgson, Alginate-encapsulated human hepatoblastoma cells in an extracorporeal perfusion system improve some systemic parameters of liver failure in a xenogeneic model, *Artif. Organs* 28 (2004) 476–482.
- [16] B. David, M. Dufresne, M.D. Nagel, C. Legallais, In vitro assessment of encapsulated C3a hepatocytes functions in a fluidised bed bioreactor, *Biotech. Prog.* 20 (2004) 1204–1212.
- [17] B. David, E. Doré, M.Y. Jaffrin, C. Legallais, Mass transfers in a fluidized bed bioreactor using alginate beads for a future bioartificial liver, *Int. J. Artif. Organs* 27 (2004) 284–293.
- [18] W.R. Kessler, M.K. Popovic, C.W. Robinson, Xanthan production in an external-circulation-loop airlift fermenter, *Can. J. Chem. Eng.* 71 (1993) 101–106.
- [19] Y. Wang, B. McNeil, Production of the fungal exopolysaccharide scleroglucan by cultivation of *Sclerotium* in an airlift reactor with an external loop, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 63 (1995) 215–222.
- [20] B.J. Ritchie, G.A. Hill, Biodegradation of phenol-polluted air using external-loop air lift bioreactor, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 62 (1995) 339–344.
- [21] W.D. Deckwer, *Reaktionstechnik in Blasenstulen*, Otto Salle Verlag (1992).
- [22] D. Lewinska, S. Rosinski, D. Hunkeler, D. Poncelet, A. Werynski, Mass transfer coefficient in characterization of gel beads and microcapsules, *J. Membr. Sci.* 209 (2002) 533–540.
- [23] E. Doré, C. Legallais, A new concept of bioartificial liver based on fluidized bed bioreactor (FBBAL), *Ther. Apher.* 3 (1999) 264–267.

CHAPITRE IV. LE MICROBIOREACTEUR A FIBRES CREUSES

Cette partie de mes travaux de recherche est présentée sous la forme d'un article intitulé « Hollow Fiber Bioartificial Liver : physical and biological characterization with C3A cells », en vue d'une soumission dans le journal *Journal of Membrane Science* en octobre 2008. Il a été rédigé par A. Gautier, A. Ould-Dris, M. Dufresne, P. Paullier, B. Von Harten, H.-D. Lemke, et C. Legallais. Ce microbioréacteur à fibres creuses a été initialement conçu par la société Membrana GmbH qui fabrique des fibres creuses pour les modules de dialyse et de plasmaphérèse. Depuis ces dernières années, cette technologie de membrane en forme de fibre creuse s'est transférée peu à peu du domaine de traitement des maladies rénales à son application au système de suppléance hépatique comme le prouve le tableau présent dans l'introduction de l'article. Ce type de géométrie reste donc une technologie prometteuse pour une future application au foie bioartificiel. Avec l'aide de M. Von Harten et du Dr. Lemke, nous avons donc caractérisé ce type de bioréacteur en testant différentes membranes montrant des perméabilités et des seuils de coupure différents. Nous avons testé une membrane nommée MicroPES® classiquement utilisée pour séparer le plasma, une membrane Synclear® utilisée pour fractionner le plasma et une membrane pour l'hémodialyse appelée DiaPES®. La caractérisation de chaque type de membrane s'est faite selon trois approches différentes :

-physique : nous avons évalué la résistance membranaire, les caractéristiques intrasèques des membranes au microscope à balayage (diamètre externe des fibres, épaisseur et porosité). Puis nous avons étudié les transferts de masse avec un marqueur de poids moléculaire connu, la vitamine B12 avec deux débits de perfusion (3 et 10 ml/min).

-mathématique : nous avons développé un modèle mathématique basé sur l'effet diffusif et convectif adapté à ce type de bioréacteur afin de déterminer lequel de ces deux effets est prépondérant. Ce modèle nous a permis de déterminer la perte de charge ΔP , le débit de filtration Q_f , le coefficient de transfert de masse représentant la diffusion K_0 et le flux de filtration J_f correspondant à l'effet convectif.

-biologique : nous avons mis en culture les cellules C3A jusqu'à 72h pour la membrane Synclear afin d'étudier le comportement morphologique et les fonctionnalités de ces cellules au sein de ce type de bioréacteur. Ces cultures ont été testées à deux débits différents 3 et 10 ml/min.

Il a été constaté que les cellules avaient une morphologie et des activités métaboliques quasiment identiques quelle que soit la nature des fibres creuses présentes dans le bioréacteur

et quelque soit le débit appliqué (3 ou 10 ml/min). Un effet très net au niveau du seuil de coupure s'est avéré pour les molécules de haut poids moléculaire de type alphafoetoprotéine. En effet, la DiaPES ne laisse pas passer ce soluté, tandis que la MicroPES reste « invisible » au passage de celui-ci. La Synclear montre un seuil de coupure intermédiaire.

Cette caractérisation a permis de déterminer un nombre de Péclet caractéristique à chaque soluté et pour chaque type de membrane. Ce nombre de Péclet a mis en évidence que l'effet prépondérant était convectif pour la MicroPES et diffusif pour la DiaPES quelle que soit la nature du soluté. Par contre, pour la Synclear, l'effet était plutôt diffusif pour les molécules de bas poids moléculaires (type ammoniac et lactate) et convectif pour les moyennes et hauts poids moléculaires (type vitamin B12 et alpha-foetoprotéine). Cette approche a permis de mettre de côté les membranes de type MicroPES (qui a un seuil de coupure trop important risquant de laisser passer les facteurs immunitaires de type immunoglobulines) et DiaPES (qui, au contraire a un seuil de coupure trop faible entraînant le non passage de l'albumine). Par conséquent, à l'issue de cette étude, la membrane Synclear s'est montrée très prometteuse en vue d'une future application dans un système de foie bioartificiel.

Nous avons montré dans ce travail l'intérêt de :

- comprendre les mécanismes physiques sous tendant les fonctions du système,
- travailler à petite échelle, ce qui est primordial lorsqu'on se place en ingénierie tissulaire
- Aborder des approches adimensionnelles, qui permettent non seulement de mettre en évidence les facteurs prépondérants, mais aussi d'aborder les mécanismes de changement d'échelle.

Hollow Fiber Bioartificial Liver : physical and biological characterization with C3A cells

Aude Gautier¹, Aïssa Ould-Dris², Murielle Dufresne¹, Patrick Paullier¹, Bodo Von Harten³,
Horst-Dieter Lemke³, Cécile Legallais¹

¹University of Technology of Compiègne, UMR CNRS 6600, Biomechanics and Bioengineering, Compiègne, France

²University of Technology of Compiègne, EA : 4297, Transformation Intégrée de la Matière Renouvelable, Compiègne, France

³Membrana GmbH, Obernburg, Germany

a. Introduction

Hollow fiber membranes are commonly used in hemodialysis to treat renal diseases. In the late 90's, this technology was tentatively transferred to bioartificial application in order to handle patients suffering from hepatic diseases, for instance, or from other metabolic disorders (Stamatialis *et al.*, 2008, Legallais *et al.*, 2001). 600 000 patients with acute chronic liver failure die each year in the world waiting a healthy available liver graft up to now, no bioartificial liver system support has fully proved a total success in liver therapy, although first trials were promising (Demetriou *et al.*, 1995, Chen *et al.*, 1996, Watanabe *et al.*, 1997) . Consequently, it is still a scientific challenge to define and design a bioartificial liver support allowing the patient's survival until transplantation or recovery.

The concept of bioartificial liver systems imposes the satisfaction of different requirements, the first of them being the use of hepatic cells in an adequate framework. Cells have to be isolated from the external environment and cultured on a favourable biomaterial (Fig. 1a). A three-dimensional structure aims at promoting the organisation of cells to mimic *in vivo* , leading to high cell viability and functions. This porous structure has also to ensure efficient mass transfers of nutrients, oxygen and metabolites (Catapano *et al.*, 1996).

Since the pioneer work of Wolf *et al.* (1975), many clinical teams used hollow fibers technology in order to reach the objectives described in the requirements of a bioartificial liver system. Table 1 summarized the characteristics of the principal bioartificial liver based

on hollow fiber in pre-clinical or clinical study (Gautier *et al.*, 2007). Hepatic cells can be placed out of the fibers (Fig. 1b), in extra capillary space and are either in direct contact with the membrane outer surface such as in ELAD system (Hughes *et al.*, 1996), Oxy-HFB system (Jasmund *et al.*, 2002) or attached on microcarriers ou microspheres as in HepatAssist (Mullon *et al.*, 1999). Alternately, they could be incorporated in a gel surrounding the fibers as BLSS (Patzner *et al.*, 2002) and LIVERaid (Rozga *et al.*, 2006) or stuck inside the hollow fibers as showed in LIVERx2000 (Fig. 1c) (Nyberg *et al.*, 1993 and 1998). The MELS system developed in Berlin exploited different types of hollow fibers, some admitting the gaseous exchanges (oxygen, carbon dioxide...) (Gerlach *et al.*, 2006). Other teams used perfused porous matrix such as RFB-BAL (Morsiani *et al.*, 2002), BLSS and AMC-BAL (van de Kerkhove *et al.*, 2005) (Fig. 1d). In the case of the BLSS system, hollow fibers were used for blood circulation and for AMC-BAL for gaseous exchanges. Hepatocytes are located in the matrix.

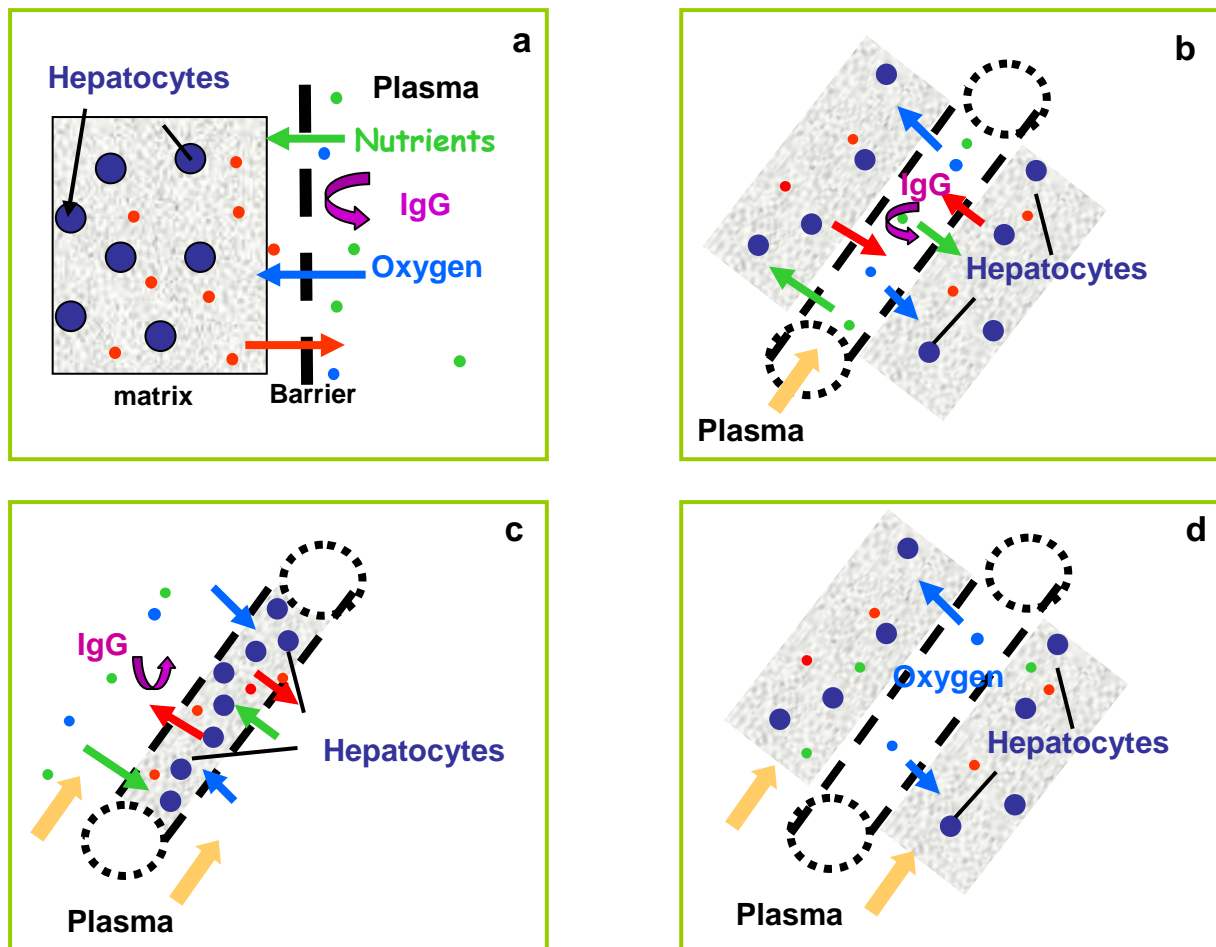


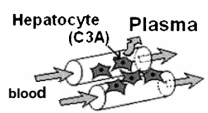
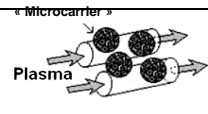
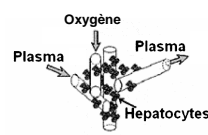
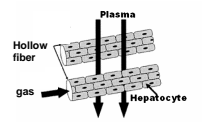
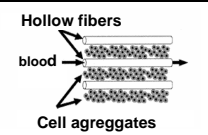
Figure 1 a : principles of bioartificial organs. b : principle of bioartificial liver with hepatocytes cultivated as aggregates or on microcarriers in the extraluminal space. c : principle of bioartificial liver with

hepatocytes cultivated in the fiber lumen. d : principle of bioartificial liver with hepatocytes attached on a matrix located in the extraluminal space.

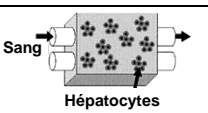
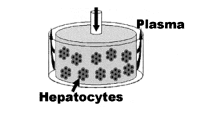
These systems have been developed at macroscale level in order to find a direct application in clinics. However, some teams now recognize that this approach did not lead to definitive positive conclusions about the efficacy of the treatment. This is partially due to the lack of characterization in the behaviour of such large systems. A new approach consists thus in developing microscale bioreactors to better understand the system before scaling up for clinical application. Some teams design bioreactor which show encouraging results in cultivating hepatic cells, such as SlideReactor (Sauer *et al.*, 2005 and Schwartlander *et al.*, 2007), or leukemic cells (Gloeckner *et al.*, 2001) outside hollow fibers.

Our bioengineering approach was to understand mass transfer phenomena occurring within micro-scale Hollow Fiber Bioartificial Liver (HFBL) modules equipped with different types of polyethersulfon (PES) hollow fibers classically used in biomedical applications (dialysis, plasmafractionation, or plasmapheresis). This characterization was achieved following two different ways: i) physical point of view, with electronic microscopy and mass transfers studies with a well defined molecular weight marker (vitamin B12); ii) biological point of view, with hepatoblastoma cells C3A culture out of the fibers, following their behaviour in the HFBL regarding chamber colonization, cell morphology and activities. A mathematical model was also developed to analyze the preponderant mass transfers occurring in the HFBL, in relation with the type of fibers used.

- Hollow fiber concept without matrix

Bioartificial liver	Principle	Cell organisation	Fiber type	Perfusion fluid
ELAD (Amphioxus Cell Technologies, USA)		Aggregates	Cellulose acetate Cut off 70 kDa (Park <i>et al.</i> , 2005)	Blood
Hepatassist (Circe Biomedical, USA)		Hepatocytes on microcarriers	PS microfiltration Pore size : 0.2 μm	Plasma
MELS (Charity Berlin, Germany)		Spheroids out of the fiber network	Inflow PA 100kDa Outflow PES 80 kDa	Plasma
Oxy-HFB (University Eberhard Karls, Germany)		Cells surrounding the fibers		Plasma
LLS-HALSS (University Kuysu, Japon)		Aggregates	PS 70 kDa	Blood

- Hollow fibers concept with perfused matrix

Bioartificial liver	Principle	Cell organisation	Fiber type (if any)	Perfusion fluid
BLSS (Excorp Medical Inc., Unites States)		Aggregates included in collagen gel	PS Cut off 100 kDa (Park <i>et al.</i> , 2005)	Blood
RFB-BAL (University Ferrara, Italy)		Aggregates		Plasma

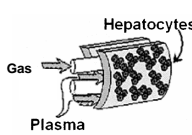
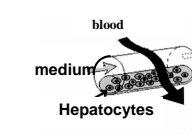
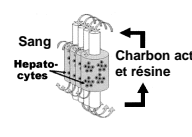
AMC-BAL (University of Amsterdam, The Netherlands)		Small aggregates		Plasma
LIVERx2000 (Algenix Inc., United States)		Hepatocytes entrapped in a collagen cylinder inside hollow fibers	Polysulfone Cut off 100 kDa (Nyberg <i>et al.</i> , 1992)	Blood
LIVERaid (Arbios System Inc., United States)		Aggregates	Cut off 100 kDa	Blood

Table 1 Synthesis of different geometries of hollow fiber based bioartificial liver described in the literature

b. Materials and methods

A) Materials

1) Hollow Fiber Bioartificial Liver bioreactor

The Hollow Fiber Bioartificial Liver (HFBL) module was composed of a transparent chamber (cell compartment) in polycarbonate easy to observe cell morphology. In the cell compartment, two types of membranes were present as a crossing network: semi-permeable membranes for culture medium circulation and gas membranes (Gloeckner *et al.*, 2001). Each bioreactor was equipped with one type of the semi-permeable PES membranes and with the Oxyphan® membranes that could be used for gaz exchanges. The module were manufactured by Membrana GmbH (Wuppertal, Germany).



Figure 2 Hollow Fiber Bioartificial Liver bioreactor equipped with : semi-permeable (red connections) and oxygenation membranes (blue connections)

2) Semi - permeable membranes

Different types of semi-permeable membranes (MicroPES, Synclear and DiaPES) made of polyethersulfone were used in this study. They were produced by Membrana GmbH. Their physical characteristics are shown in Table 2. External diameter and wall thickness of the fibers were controlled under Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM-FEG XL 30, Philips, France).

Module characteristics	Type of semi-permeable membranes		
	MicroPES®	Synclear®	DiaPES®
Classical application	Plasma separation	Plasma fractionation	Haemodialysis
Number of fibers	12	22	22
Length of a fiber (cm)	1.7	2.1	2.1
Lumen radius of a fiber (µm)	150	100	100
Wall thickness of a fiber δ (µm)	100	35	25
External diameter of a fiber (µm)	500	270	250
Membrane surface (10 ⁻⁴ m ²)	1.92	2.90	2.90
Volume of cell chamber (ml)	1	4	4

Table 2 Module and hollow fiber membranes characteristics inside the bioreactor.

B) Membrane physical characteristics

The membrane hydraulic permeability was determined using PBS (Phosphate Buffered Saline) solution (0.15 M NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄ (12H₂O), 15 mM KH₂PO₄, pH 7.4). The hydraulic set up was composed of a tank, a peristaltic pump (ISM834C, Ismatec, France), 2 pressure sensors (DP15-38, Validyne, California), linked to a computer to record pressures at the entrance (P_i) and the exit (P_o) every 10 minutes. The flow rate was fixed at 3 ml/min. The cap of the HFBL bioreactor was open to collect the filtrate. The hydraulic permeability (L_p) or membrane resistance (R_m) were calculated for 5 bioreactors for each type of semi-permeable membranes, and can be determined by equation 1:

$$L_p = \frac{Q_f}{A \times TMP} \text{ or } R_m = \frac{TMP \times A}{\mu \times Q_f} \quad [1]$$

with :

Q_f : filtration flow rate (m³/min)

A : exchange surface area (m²)

μ : perfusion fluid viscosity (10⁻³ Pa.s at 20°C in the case of PBS).

TMP : mean transmembrane pressure (mmHg) : $TMP = \frac{P_i + P_o}{2}$

P_i : pressure at the entrance of the HFBL bioreactor (mmHg)

P_o : pressure at the exit of the HFBL bioreactor (mmHg)

The porosity of each type of membrane was qualitatively determined by ESEM.

C) Mass transfer with vitamin B12

1) Experimental

Vitamin B12 was used as a middle molecular weight marker (1355 Da) to assess mass transfer phenomena between the close loop circuit and the chamber. The set up was composed of the HFBL bioreactor, a peristaltic pump and a spectrophometric cell (Hellma, France) (Fig. 3). The chamber of the bioreactor was filled with ultra pure water and the close loop circuit was filled with 4.5 ml of vitamin B12 solution at the initial concentration of 73 μmol/l. Vitamin B12 concentration in the close loop circuit was measured in the spectrophometric cell at 360

nm. Two flow rates were used (3 and 10 ml/min) for each type of semi-permeable membranes.

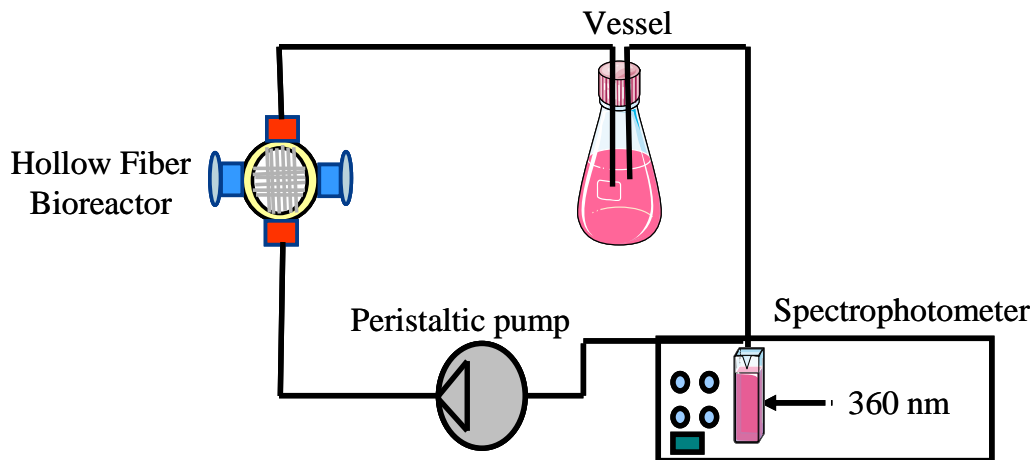


Figure 3 Mass transfer with vitamin B12 set up

2) Mathematical model

The following definitions and abbreviations were used to write the mass transfer model :

- index 1 for the supernatant (perfusion fluid), index 2 for the chamber (cell compartment)
- index in : inlet of the hollow fiber, index out : outlet of the hollow fiber
- P : pressure
- V : volume
- C(t) : solute concentration (function of time)
- N : number of fibers in the minimodule
- D : fiber diameter
- L : effective fiber length
- μ : fluid viscosity
- v : fluid velocity in one fiber
- Jf (x) : local filtration flux
- δ : membrane thickness
- Dm : solute diffusivity in the membrane
- Rm : membrane resistance
- A : membrane area available for fluid and mass transfer

A number of hypotheses were set before describing the fluid and mass balance :

- osmotic pressure was neglected (in culture medium)

- pressure (P_2) was constant and uniform in the chamber, as it could be considered as a closed tank
- concentration (C_2) was uniform in the chamber
- solute concentration was uniform along the fibers (C_1), since mass transferred were low compared to the overall solute amount.

Conservation equations

- *Overall fluid balance* (circuit + chamber): the overall volume remained constant over the experiment :

$$\frac{dV_1}{dt} + \frac{dV_2}{dt} = \frac{dV_1}{dt} = \frac{dV_2}{dt} = 0 \quad [2]$$

- *Overall solute mass balance*

The solute amount remains constant all over the experiment; there is no adsorption on the vessel walls or within the membrane:

$$\frac{d(V_1C_1)}{dt} + \frac{d(V_2C_2)}{dt} = 0 \Rightarrow V_1 \frac{dC_1}{dt} + V_2 \frac{dC_2}{dt} = 0 \Rightarrow \frac{dC_1}{dC_2} = -\frac{V_2}{V_1} \quad [3]$$

After integration over time, this led to equation [4], since the initial vitamin B12 concentration in the cell chamber was zero at the beginning of the mass transfer experiment.

$$\frac{C_{10} - C_1}{C_2} = \frac{V_2}{V_1} \Rightarrow C_2 = (C_{10} - C_1) \frac{V_1}{V_2} \quad [4]$$

With :

C_{10} : initial concentration of vitamin B12 in the supernatant

- *Fluid balance in the cell compartment*

$$\frac{dV_2}{dt} = \int_0^L N J_f \pi D dx = N \int_0^L \frac{(P_1 - P_2)}{\mu R_m} \pi D dx = 0 \quad [5]$$

This led to the calculation of the pressure in the cell compartment (eq. [6])

$$P_2 = \frac{1}{L} \int_0^L P_1 dx \quad [6]$$

- *Pressure loss on the fluid size along the membrane:*

Locally, the pressure loss in a cylindrical fiber followed the Hagen-Poiseuille law :

$$\frac{dP_1}{dx} = -32 \frac{\mu v}{D^2} \quad [7]$$

The perfusion velocity (v) was supposed to be constant over the membrane length (since the filtration flux J_f was much smaller than v), resulting in

$$\frac{dP_1}{dx} = \text{constant}$$

Combining [6] and [7] led to :

$$P_2 = P_{1in} + \Delta P/2 \quad [8]$$

With :

ΔP : pressure drop between the fiber inlet and outlet : $\Delta P = P_{1in} - P_{1out}$

Following these assumptions, the local transmembrane pressure was positive in the first half of the device, and negative in the second one. Therefore, if $x < L/2$, $P_1 - P_2$ was positive and the filtration flux occurred from the supernatant to the cell chamber (also named internal filtration). If $x > L/2$, the filtration flux occurred in the opposite direction (also named backfiltration).

- *Solute mass balance over the supernatant volume*

The mass transfer occurring through the membrane was supposed to be due to both diffusion and convection. In the first part ($x < L/2$), the convective transfer occurred from the supernatant to the chamber; in the second part ($x > L/2$), the convective transfer was in the opposite direction.

$$V_1 \frac{dC_1}{dt} = -N \int_0^{L/2} \left[J_f(x) C_1(x) + \frac{D_m}{\delta} (C_1(x) - C_2) \right] \pi D dx - N \int_{L/2}^L \left[J_f(x) C_2 + \frac{D_m}{\delta} (C_1(x) - C_2) \right] \pi D dx \quad [9]$$

Leading to :

$$V_1 \frac{dC_1}{dt} = -N \pi D \left[C_1 \int_0^{L/2} J_f(x) dx + C_2 \int_{L/2}^L J_f(x) dx + \int_0^L \frac{D_m}{\delta} (C_1 - C_2) dx \right] \quad [10]$$

The internal filtration flow rate (from the supernatant to the cell chamber) was named Q_f :

$$N \pi D \int_0^{x^*} J_f(x) dx = Q_f = - N \pi D \int_{x^*}^L J_f(x) dx \quad [11]$$

For diffusion, overall diffusive mass transfer coefficient K_0 was introduced:

$$N\pi D \int_0^L \frac{D_m}{\delta} (C_1 - C_2) dx = N\pi D L K_o (C_1 - C_2) = K_o A (C_1 - C_2) \quad [12]$$

which, finally led to the differential equation for C1 and C2 over time :

$$V_1 \frac{dC_1}{dt} = - (K_o A + Qf) (C_1 - C_2) \quad [13]$$

With [4], the differential equation for C₁(t) became :

$$\frac{dC_1}{dt} + (K_o A + Qf) \left(\frac{1}{V_1} + \frac{1}{V_2} \right) C_1 = \frac{(K_o A + Qf)}{V_2} C_{10}$$

[14]

which can be solved as :

$$C_1(t) = \frac{V_2 C_{10}}{V_1 + V_2} \exp[-(K_o A + Qf) \left(\frac{1}{V_1} + \frac{1}{V_2} \right) t] + \frac{V_1}{(V_1 + V_2)} C_{10} \quad [14]$$

D) *Biological characterization*

1) Cell subculture

C3A human hepatocellular carcinoma cells provided by the American Type Culture Collection (ATCC, reference CRL 10-741) were used to complete the study. C3A cells were cultivated in standard T75 Falcon culture flasks (Merk Eurolab, Strasbourg, France) in 15ml of complete culture medium: Minimum Essential Medium Earles salts (MEM) supplemented with 0.2% L-glutamine (200 mM), 0.5% penicillin-streptomycin (10,000 units/ml and 10,000 µg/ml, respectively), 1% nonessential amino acids (10 mM), 1% Hepes buffer solution (1M), 1% sodium pyruvate (100 mM) and 10% fetal calf serum, from Gibco (Cergy Pontoise, France). Cell numbers per flask ranged from 25 to 30 million at 80-90% confluence. The culture medium was replaced every 2 to 3 days. Cultures and subcultures were carried out as recommended by the ATCC in a 37°C and 5% CO₂ incubator.

2) Cell culture in experimental conditions

After trypsinization, 0.5 million C3A cells were isolated and placed in the cell compartment of each HFBL bioreactor with 2 ml of culture medium. Cells were seeded for 24 hours. For each experiment, 6 HFBL bioreactors with the same type of membrane were used. After 24

hour-cell seeding, each HFBL bioreactor was integrated in a closed loop circuit which was filled with 4 ml of culture medium. The complete volume of culture medium was then 6 ml. 3 HFBL bioreactors were randomly designated to perform the dynamic study where a flow rate of 3 or 10 ml/min was applied and the last three ones were used under static condition where the peristaltic pump was replaced by a clamp. One HFBL bioreactor under static conditions and one under dynamic conditions were stopped at different time points along the experiment after 24, 48 and 72 hours, respectively. The medium culture from the circuit and the chamber were then independently sampled for further analysis (Fig. 4).

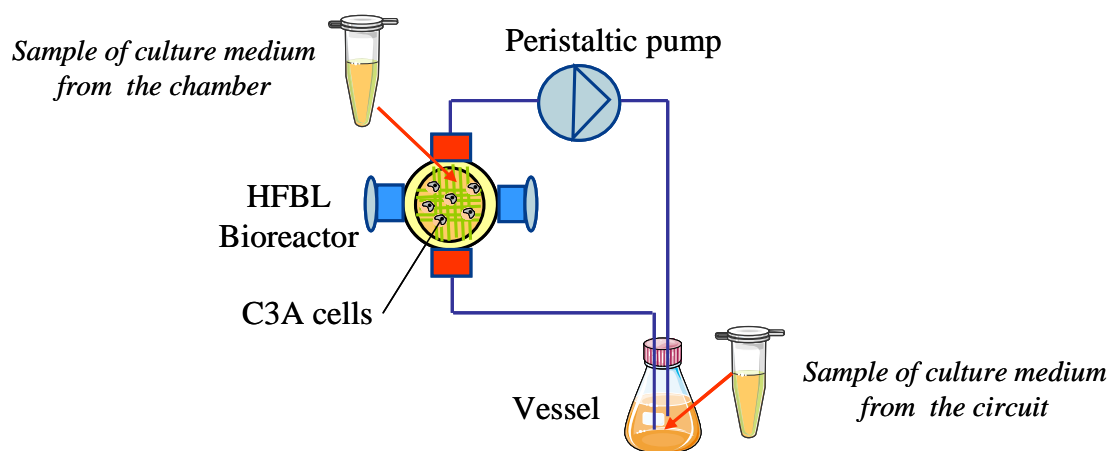


Figure 4 Experimental setup for dynamic assessment of culture of C3A cells within HFBL bioreactor. The whole set up except the pump was placed inside an incubator at 37°C and 5% CO₂. Under static conditions, the peristaltic pump was replaced by a clamp.

3) Chamber colonization, cell morphology and viability

Chamber colonization and cell morphology were observed at the surface of cell compartment of the HFBL at different times along the experiments (0, 24, 48 and 72 hours) under contrast phase microscope. Cell viability was evaluated with trypan blue test (0.4%).

4) Biochemical assays

The biochemical assays were performed on samples taken from the supernatant.

Ammonia and glucose concentrations were determined with a biochemical automatus (Konelab 20, Thermo, Cergy-Pontoise, France) using kits from Randox (Mauguio, France) and Thermo (Cergy-Pontoise, France), respectively. The determination of ammonia

concentration was based on the following reaction : ammonia combines with α -ketoglutarate and NADPH in the presence of glutamate dehydrogenase (GLDH) to yield glutamate and NADP⁺. To measure the glucose concentration, the method employed glucose oxidase (GOD) and a modified trinder colour reaction, catalysed by the enzyme peroxidase (POD). Alpha-foetoprotein and lactate levels were evaluated using a biochemical automatus (Modular Analytics E170, Roche, Meylan, France) along with the kits from Roche (Meylan, France), respectively. The alpha-foetoprotein analysis followed a “sandwich” method analysis consisting on a first incubation with an antigen which was sandwiched between a specific monoclonal antibody marked with biotine and specific monoclonal antibody marked with ruthenium. For the next incubation, streptavidine particles were added to the reaction. The immunological complex fixed to the solid phase with streptavidine-biotine liaison. The lactate concentration was determined from an enzymatic reaction. The L-lactate was oxidized by the lactic oxidase in order to produce pyruvate. The enzyme peroxidase was used to create a stain with oxygenated water.

E) Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Kruskal-Wallis non-parametric test in order to compare the differences between groups. Differences were considered as significant when $p < 0.05$ and are identified by *. Results were expressed as mean \pm standard error of the mean.

c. Results

F) Membrane hydraulic permeability and porosity

Although these data are usually provided by the manufacturer after quality measurements performed in large scale modules after sterilization procedure, it seemed necessary to determine these values in the case of the micro-scale modules. It also permitted to assess the variability inherent in the production of these “home made” devices.

Table 3 shows the membrane resistance measured for each type of membranes, following the protocol described in Materials and Methods section, as well as the data provided by Membrana GmbH. As expected, the highest hydraulic permeability was found with the

plasma separation membrane - MicroPES - followed by the plasma fractionation one - Synclear - and the haemodialysis one - DiaPES.

Membrane resistance	MicroPES	Synclear	DiaPES
Measured Rm (m ⁻¹)	1.97 10 ¹⁰ ± 0.31 10 ¹⁰	4.27 10 ¹¹ ± 0.41 10 ¹¹	2.12 10 ¹³ ± 1.48 10 ¹³
Manufacturer Rm (m ⁻¹)	1.21 10 ¹⁰		3.96 10 ¹²

Table 3 Hydraulic permeability experimentally determined and provided by the manufacturer for MicroPES, Synclear and DiaPES membranes.

The external fiber diameter, the wall thickness and the external surface porosity were observed and measured for each type of membranes under ESEM (Table 4). The membrane inner and outer diameters are different depending on the clinical application. Internal diameter, as well as membrane thickness were determined for further use in the mass transfer model. For each type, membrane appeared quite dense, with selective layers near the inner and outer surface.

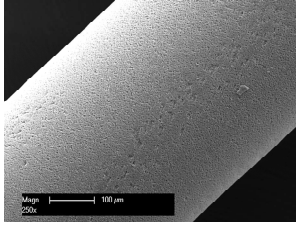
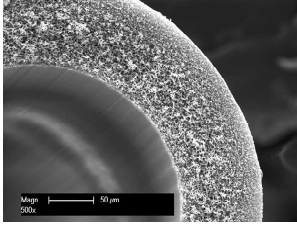
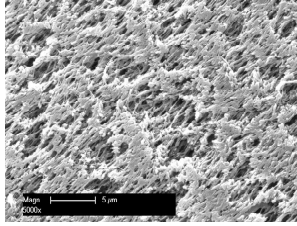
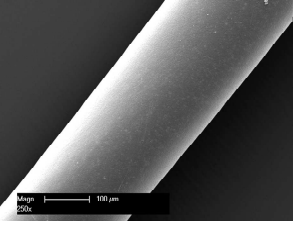
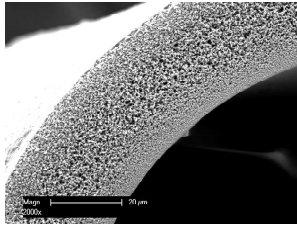
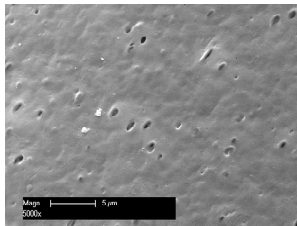
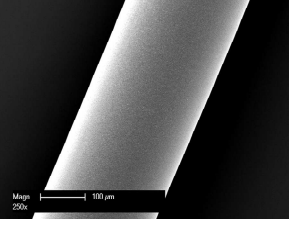
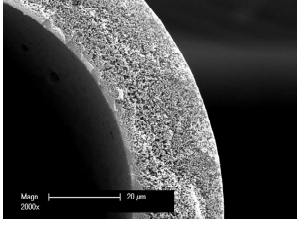
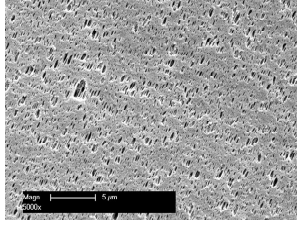
	External fiber diameter	Wall thickness	Surface porosity
(a)	 450 μm	 100 μm	 ++
(b)	 270 μm	 35 μm	 +
(c)	 250 μm	 50 μm	 -

Table 4 Membranes characteristics (external fiber diameter, wall thickness and surface porosity) observed under environmental scanning electron microscope for MicroPES (a), Synclear (b) and DiaPES (c) membranes.

The MicroPES membrane presented surface porosity with a pore diameter about 0.2-0.5 μm , which were larger than those observed with Synclear and DiaPES (it was not possible to estimate pore size for the latter membranes). We were mostly interested by the outer surface characterization since hepatic cells might be in contact with this side of the membrane.

G) Mass transfers with vitamin B12

The decrease of vitamin B12 concentration over time in the spectrophotometric cell illustrated its migration from the lumen of the hollow fiber to the chamber. The transfer stopped as soon as both concentrations between the chamber and the close loop circuit are equilibrated.

Using the mathematical model, K_0 could be successfully determined for the three selected types of membranes and for both flow rates (3 and 10 ml/min), by calculating the slope of $-\ln \left[\frac{(C_1(t) - C_{eq})(V_2 + V_1)}{C_{10} \cdot V_2} \right]$ in function of time extracted from the equ. [14] as follows:

$$-\ln \left[\frac{(C_1(t) - C_{eq})(V_2 + V_1)}{C_{10} \cdot V_2} \right] = (AK_0 + Qf) \left(\frac{1}{V_1} + \frac{1}{V_2} \right) t \quad [15]$$

The slope of $-\ln \left[\frac{(C_1(t) - C_{eq})(V_2 + V_1)}{C_{10} \cdot V_2} \right]$ in function of time obtained for MicroPES was equal to 0.0083 at 3 ml/min and 0.0082 at 10 ml/min. For DiaPES, the slope was determined at 0.0077 at 3 ml/min and 0.0091 at 10 ml/min. Concerning Synclear membrane, the slope calculated is at 0.0139 for 3 ml/min and 0.014 for 10 ml/min. Increasing flow rate resulted in a lower delay to reach equilibrium (Fig. 5).

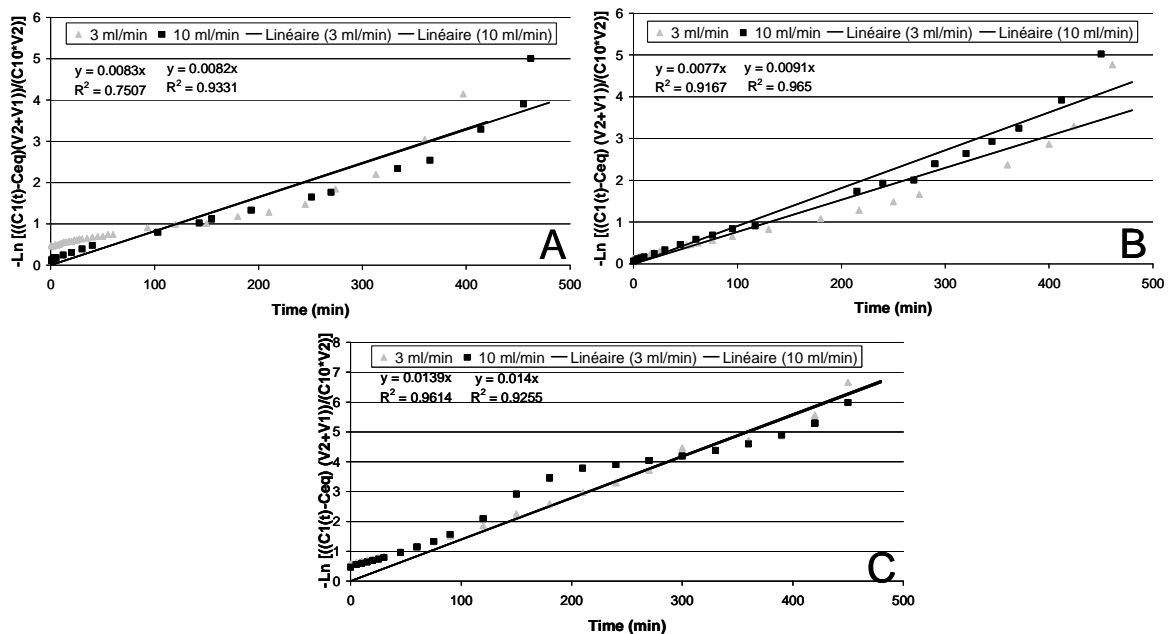


Figure 5 Slope of $-\ln \left[\frac{(C_1(t) - C_{eq})(V_2 + V_1)}{C_{10} \cdot V_2} \right]$ in function of time obtained for MicroPES (A), DiaPES (B) and Synclear (C).

To better understand the physical phenomena, a mathematical model describing convective and diffusive effects was applied. The development of the mathematical model (cf. 2.3.2) led to the calculation of the close loop circuit concentration C_1 as a function of time.

In the model, the only unknown parameter was the diffusive mass transfer coefficient K_0 . Q_f could be determined from eq. [11], following development described in Appendix:

$$Q_f = \frac{16NQL^2}{RmD^3} \quad [16]$$

This confirmed the formula found by Jaffrin *et al.* (1988), in a similar case of closed chamber :

$$Q_f = \frac{A L_p \Delta P}{8} \quad [17]$$

Assuming that the pressure drop ΔP could be calculated using the Hagen-Poiseuille law:

$$\Delta P = \frac{128\mu L}{N\pi D^4} Q \quad [18]$$

μ : perfusion fluid viscosity (10^{-3} Pa.s at 20°C in the case of PBS)

The mean internal filtration flow rate could thus be calculated, as :

$$\bar{J}_f = \frac{Q_f}{A/2} \quad [19]$$

Using the mathematical model previously described, the overall mass transfer coefficient K_0 , could thus be determined and confronted with \bar{J}_f , to analyze whether convection or diffusion was predominant, for each type of membrane under each flow rate. The data are summarized in Table 5.

		MicroPES	Synclear	DiaPES
Chamber characteristics	V_1 (ml)	4.5	4.5	4.5
	V_2 (ml)	1	4	4
	A (10^{-4} m ²)	1.92	2.90	2.90
Perfusion flow rate	ΔP (Pa)	356	1220	1220
	Q_f (10^{-8} m ³ /min)	2.67	0.627	0.025
	K_0 (10^{-6} m/s)	n.d.	1.33	0.922
Q = 3 ml/min	\bar{J}_f (10^{-6} m/s)	4.66	0.7	0.03
	Preponderant effect	Convection	none	Diffusion
Perfusion flow rate	ΔP (Pa)	1190	4050	4050
	Q_f (10^{-8} m ³ /min)	8.91	2.09	0.080
	K_0 (10^{-6} m/s)	n.d.	0.503	1.06
Q = 10 ml/min	\bar{J}_f (10^{-6} m/s)	15.4	2.4	0.09
	Preponderant effect	Convection	Convection	Diffusion

Table 5 Mathematical model parameters for the MicroPES, Synclear and DiaPES membranes.

The theoretical pressure drop was higher for Synclear and DiaPES (1220 Pa) compared to MicroPES (356 Pa), due to a smaller inner diameter. Internal filtration flow rate was much higher with MicroPES since it was the most permeable membrane. The unknown K_0 , reflecting diffusive mass transfer could be successfully determined for Synclear and DiaPES. However, in the case of MicroPES it appeared that K_0 was equal to zero, probably because all of the transfers occurred through the high convective effect.

When the perfusion flow rate was moderate ($Q = 3$ mL/min), diffusion appeared as the major driving process for mass transfer in the case of DiaPES for vitamin B12, since K_0 was 30 times higher than \bar{J}_f . For the intermediate membrane, it was not possible to determine the major mass transport phenomena, both probably occurring under comparable kinetics.

When the perfusion flow rate increased, only the DiaPES module remained under a diffusion driven process. It should be noticed that the increase in perfusion velocity only poorly impacted on K_0 , probably because the main resistance to transfer took place in the membrane itself. For intermediate membrane (Synclear), it also appeared that convection might become

the major driven force, suggesting for the future that adapted perfusion flow rate might largely influence the efficiency of HFBL.

H) Hollow Fiber Bioartificial Liver with cells

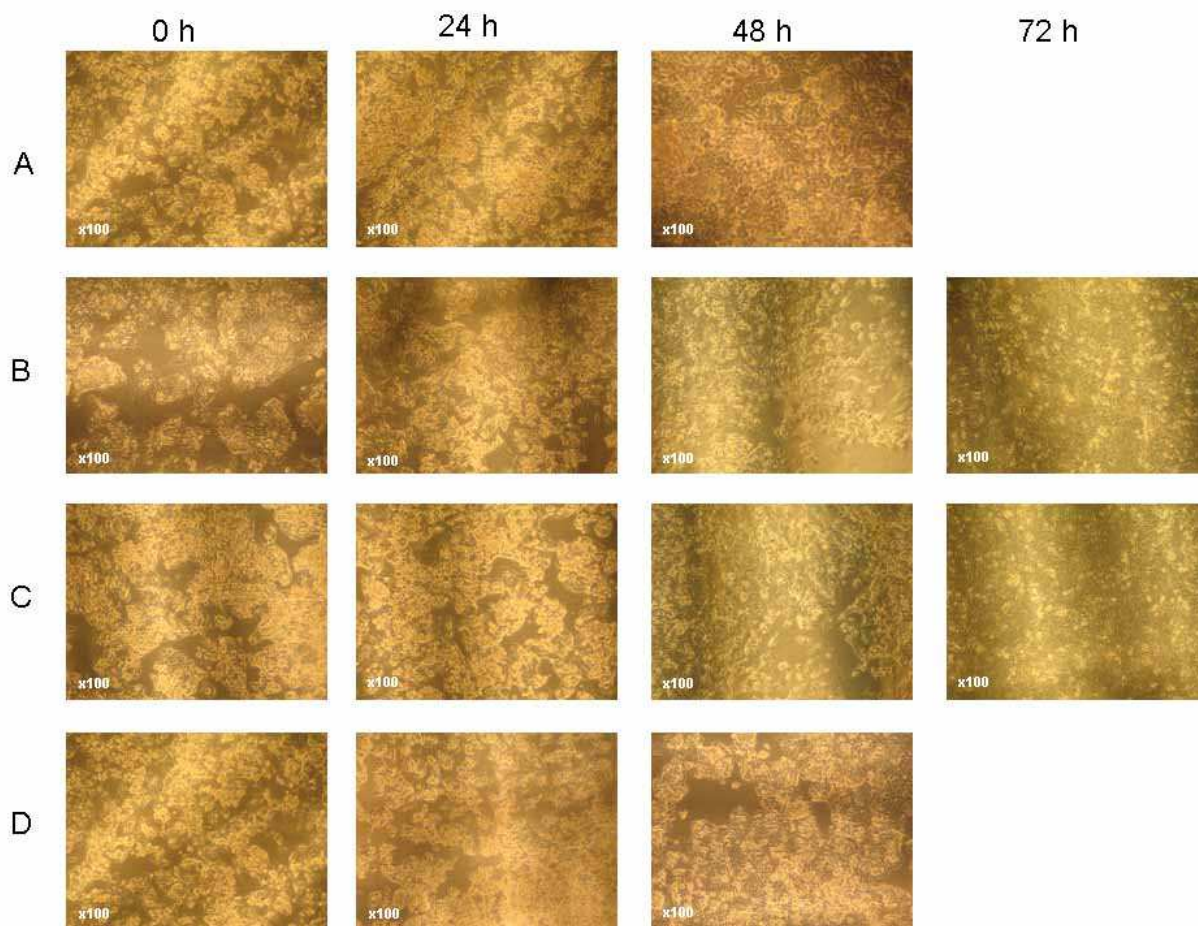
The preponderant effect of mass transfer based on convection (MicroPES) or diffusion (DiaPES) or together (Synclear) presumably impact on C3A cell culture concerning the chamber colonization, cell morphology and metabolic activities within the HFBL.

Actually, the nature of transfers could play an important role in the nutrients and oxygen supply and can improve or alter cell behaviour. On the one hand, a preponderant convective effect such as through MicroPES membrane should fully ensure the supply of nutrients and oxygen, leading to enhanced cell activities. On the other hand, too high flows might damage cells due to external mechanical forces and alter their essential activities within a bioartificial liver. The benefits and drawbacks of slow kinetics, such as in DiaPES membrane, need also to be assessed. The transfer of essential solutes might not be sufficient, or on the contrary fully adapted. Synclear membrane presenting both physical effects might thus be the most appropriate one for HFBL application with an intermediate behaviour. All of these aspects are studied in the following part.

1) Chamber colonization, cell morphology and viability

Figure 6 presents cell morphology observed in the cell compartment at 0, 24, 48 and 72-hour time experiment under contrast phase microscope. Cells seemed to maintain the same morphology within the three types of HFBL and used to concentrate in the centre of the surface of the bioreactor at the beginning and invade to the periphery of the HFBL (Fig. 7). The increase of cell density reflected cell proliferation over time.

Cell viability was excellent at the different time points and comparable for any types of membranes (> 95%).



**Figure 6 Cell colonization and adhesion at the surface of the chamber in HFBL at 0, 24, 48 and 72 hour-perfusion with MicroPES (A), Synclear (B and C) and DiaPES (D).
The flow rate applied is 3 ml/min (B) or 10 ml/min (A, C, D).**

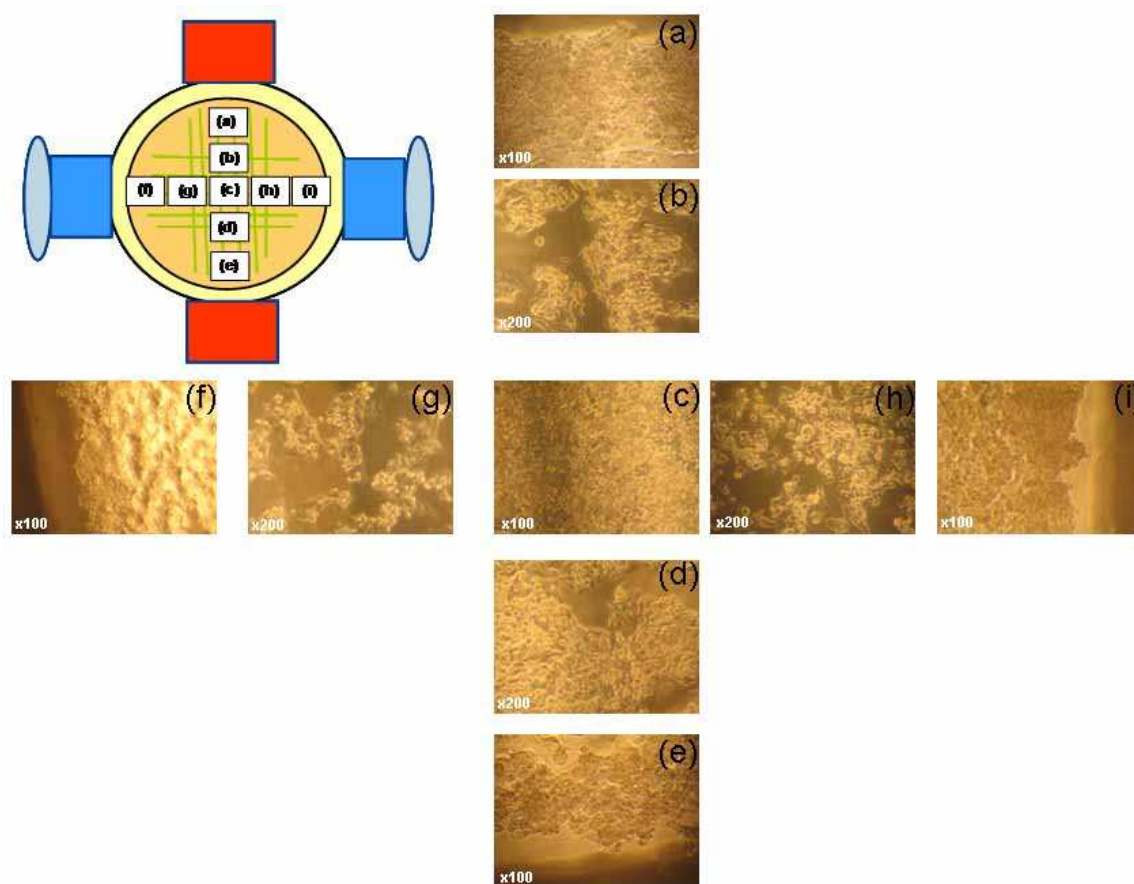


Figure 7 Example of C3A cell repartition at the surface of the chamber inside the HFBL for Synclear membrane with a flow rate of 10 ml/min after 48 hour-perfusion.

2) Cell activities

The cell functions were assessed via the follow-up of specific concentrations both in the perfusion fluid and in the cell chamber. Initial and final (after 48 hours) concentrations of ammonia, lactate, AFP and glucose were measured in the complete set-up (circuit + chamber) in all types of membranes (M for MicroPES, S for Synclear and D for DiaPES) under different experimental conditions. Simple mass balance led to the calculation of the amounts synthesized (ammonia, lactate, AFP) or consumed (glucose) by the cells. The results show that the activities of C3A were not statistically different whatever the types of hollow fibers or the environmental conditions (static or dynamic) for one solute considered. This conclusion was true for all markers. At this level, increasing flow rate did not alter C3A cell behaviour in HFBL bioreactor equipped with Synclear membranes. Consequently, C3A cell activities could be considered as independent of the type of hollow fibers membrane and the condition of experiment (Table 6).

	Ammonia (μmol)			Lactate (μmol)			Glucose (μmol)			AFP (ng)		
	M	S	D	M	S	D	M	S	D	M	S	D
Static	1.39	1.32	1.15	18.65	18.77	19.66	7.28	9.13	8.49	3.16	7.06	3.51
Q = 0	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
ml/min	0.60	0.24	0.06	3.31	2.42	0.91	1.07	0.99	0.33	0.88	2.60	0.67
Dynamic		0.72			13.39			5.28			3.34	
Q = 3	/	\pm	/	/	\pm	/	/	\pm	/	/	\pm	/
ml/min		0.45			2.09			1.58			1.38	
Dynamic	0.99	0.50	0.96	21.11	16.18	21.46	5.77	7.04	6.20	3.21	3.37	2.66
Q = 10	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
ml/min	0.29	0.38	0.19	5.40	8.52	4.43	3.19	4.28	0.64	1.95	2.10	0.50

Table 6 Amount of solute synthesized (ammonia, lactate and AFP) or consumed (glucose) by C3A cells on 48 hour-experiment in HFBL equipped with MicroPES (M), Synclear (S) and DiaPES (D) membranes in static and dynamic conditions (with flow rates of 3 and 10 ml/min).

3) Mass transfer

One of the interest of using hepatic cells in the chamber was to offer then the analysis of birectionnal mass transfer for different molecular solutes, since some of them were consumed and others were released by the cells.

a) Membrane effect

We first focused on low molecular weight solutes, such as glucose and ammonia.

Glucose mass transfer occurred from the close loop circuit to the chamber : glucose was consumed by cells as energy supply, leading to a concentration decrease in the cell chamber. Both diffusive and convective effects contributed then to restore equilibrium. Our measurements indicated that its concentration was equilibrated between both compartments of HFBL bioreactor at 0, 24 and 48-hour perfusion (Fig. 8). At t_0 , the equilibrium was expected since the same culture medium was introduced in both compartments. The results obtained with DiaPES membrane were similar to those obtained with the other types of membranes MicroPES and Synclear (data not shown).

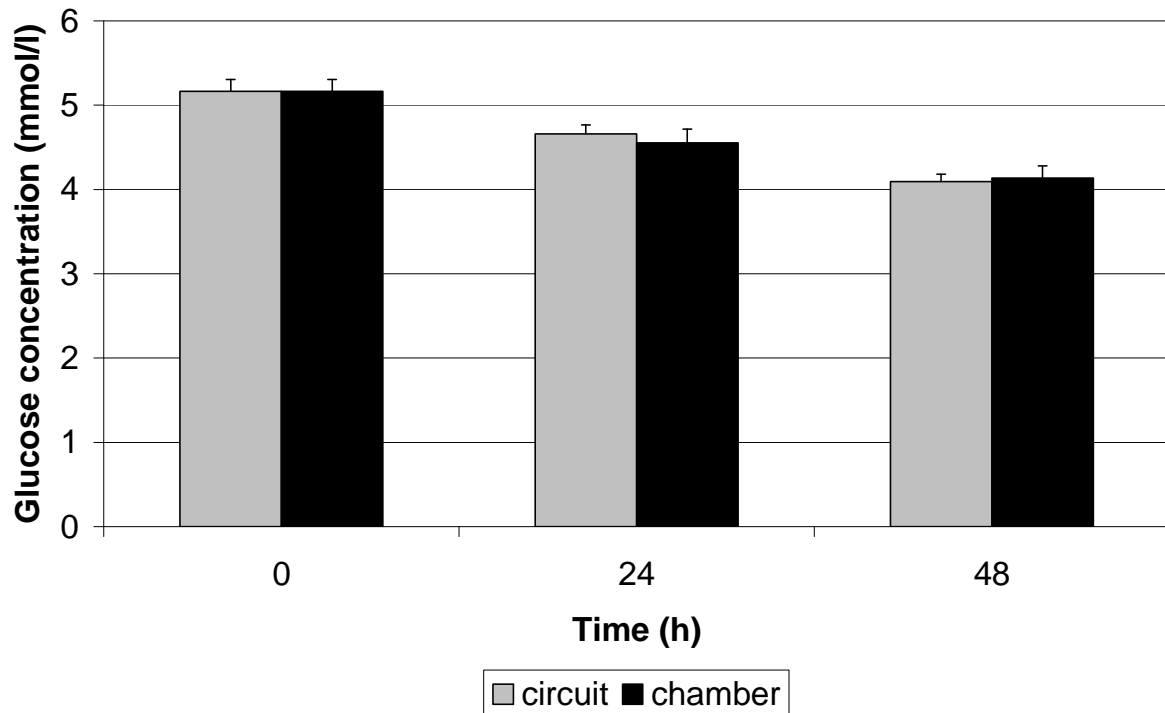


Figure 8 Glucose concentration measured in the circuit and the chamber at 0, 24 and 48 hour-perfusion under a flow rate of 10 ml/min for DiaPES.

Ammonia mass transfer occurred in the opposite direction, since this molecule is normally synthesized by liver cells. Its concentration increased over time and was equilibrated between both HFBL compartments at 24 and 48-hour perfusion (Fig. 9). It should be noticed that there was residual ammonia in the culture medium at t_0 . The results obtained with DiaPES membrane were identical with the other types of membranes MicroPES and Synclear (data not shown).

Ammonia, glucose and lactate could easily cross all types of membranes because of their low molecular weight. No significant difference was observed between all types of membrane.

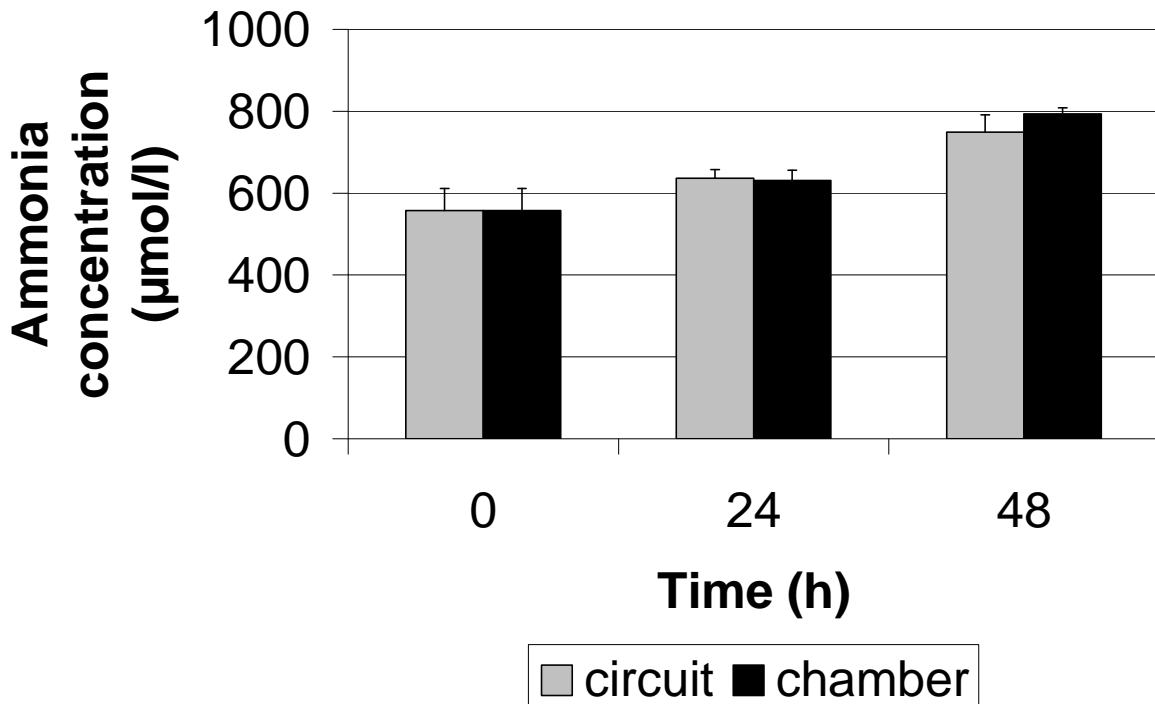


Figure 9 Ammonia concentration measured in the circuit and the chamber at 0, 24 and 48 hour-perfusion under a flow rate of 10 ml/min for DiaPES.

We secondly analyzed mass transfer of high molecular weight solutes. Table 5 already showed that AFP secretion was comparable for any type of membranes under dynamic condition at 10 ml/min. At t_0 , there was a very low concentration in the culture medium (0.605 ng/ml). Figure 10 illustrates the concentrations found in the perfusion circuit and in the cell chamber, at 24h and 48 h perfusion ($Q = 10 \text{ mL/min}$) with the three types of modules. In the chamber, concentrations raised with time since this protein was synthesized by the C3A cells. The concentrations found in the perfusion medium depended on the type of membrane used. After 48 hour-perfusion, the equilibrium in concentrations between both compartments was almost reached for MicroPES membrane. This trend did not occur for Synclear and DiaPES, for which AFP concentration in the circuit dramatically remained lower than that determined in the chamber.

Following classical membranes processes, an apparent sieving coefficient (SC) was defined as the ratio of concentrations between the circuit and the chamber ($SC = C_{\text{circuit}}/C_{\text{chamber}}=C_1/C_2$). A real time SC could not be calculated since these concentrations reflected 24 or 48 hours of mass transfer. After 24 hours, SC was 0.534 for MicroPES, 0.092 for Synclear and 0.009 for DiaPES. After 48 hour, SC reached 0.878 for MicroPES, 0.177 for Synclear and 0.003 for DiaPES.

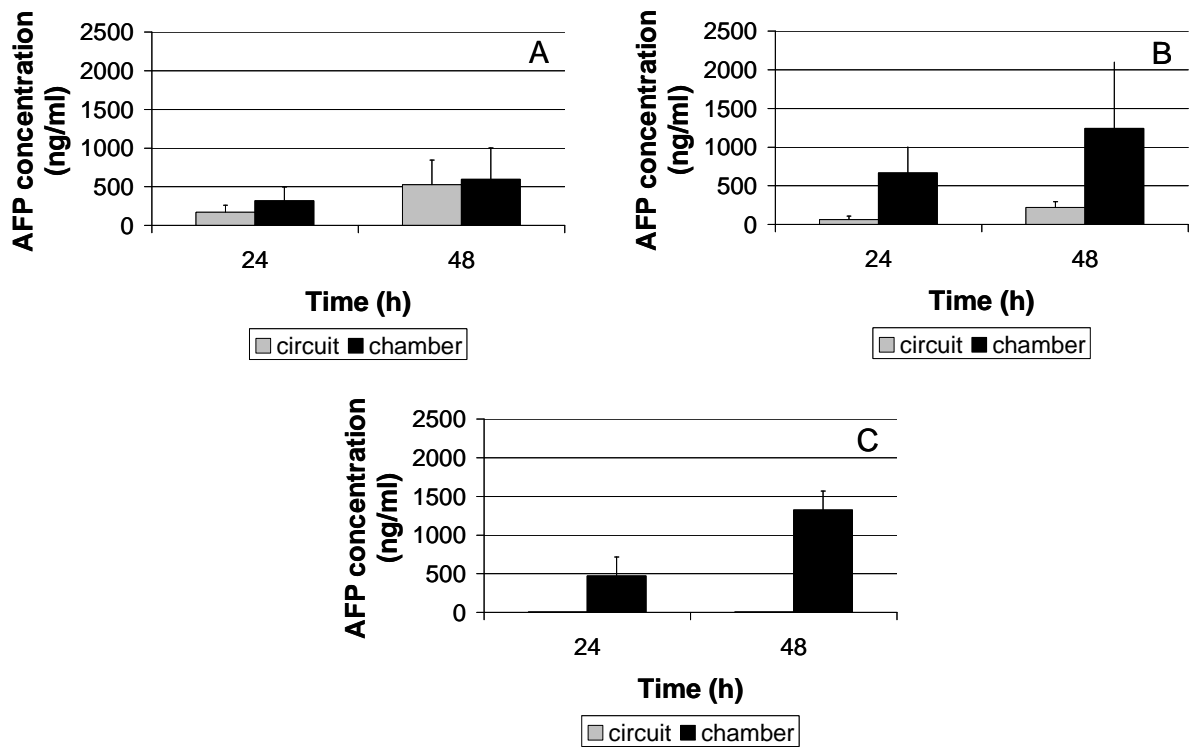


Figure 10 AFP concentration measured in the circuit and the chamber at 24 and 48 hour-perfusion with the flow rate of 10 ml/min for MicroPES (A), Synclear (B) and DiaPES (C).

This behaviour was expected for DiaPES, since this hemodialysis membrane did not allow albumin loss. As albumin had almost the same molecular weight as AFP, this last protein was naturally retained in the cell compartment. For the intermediate membrane, it seemed that partial mass transfer might occur, but was delayed in time because of hindered mass transfer. It was therefore interesting to assess whether changes in convection could affect its transfer.

b) Flow effect

Due to the module geometry, convection could only be modified by changing the perfusion flow rate. To study the kinetics effects, experiments were run for 72 hours. Indeed, after 72 hours, the AFP concentration in the supernatant was slightly higher under the larger convection condition (Fig. 11). The apparent sieving coefficient was 0.184 for 3 ml/min and 0.289 for 10 ml/min. Increasing the flow rate permitted thus to enhance mass transfer through the membrane.

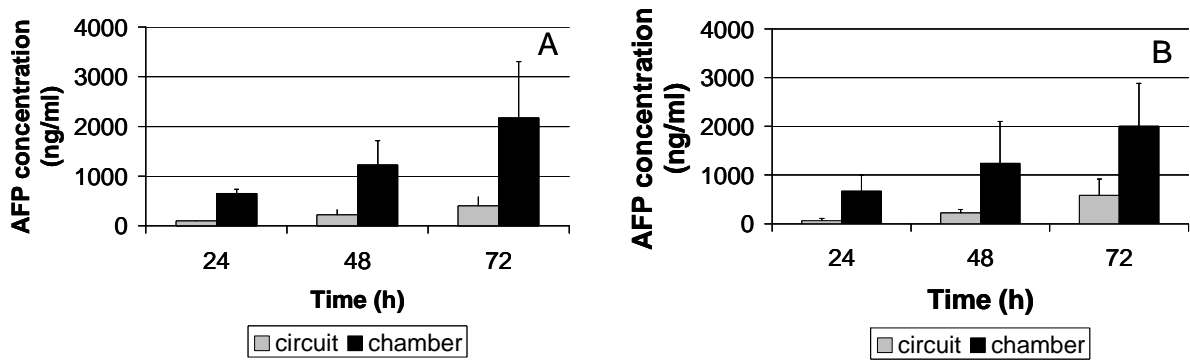


Figure 11 AFP concentrations measured in the circuit and in the chamber at 24, 48 and 72-hour perfusion with Synclear module under a flow rate of 3 ml/min (A) and 10 ml/min (B).

d. Discussion

A mathematical model to describe mass transfers in HFBL hosting cells was not beyond the scope of this study, because it would require to account for cells secretion or consumption rates, which was not direct. However, the Peclet number (Pe) could help in discriminating diffusive and convective effects. This dimensionless number represented the ratio between convection and diffusion in the membrane, with the formula :

$$Pe = \frac{\bar{J}_f \delta}{D_m}$$

To determine the diffusion coefficient of each solute, the diffusional Stokes radius Rd was calculated according to Dionne *et al.* (1996):

$$Rd = 0.305 \times (MW)^{0.47}$$

The diffusion coefficient was then calculated from Stokes-Einstein law:

$$D_m = \frac{RT}{6\pi\mu R_d N_A}$$

With :

R : constant for perfect gaz ($\text{Pa}\cdot\text{m}^3\cdot\text{K}^{-1}$)

T : temperature (K)

N_A : Avogadro number

Table 7 summarizes all parameters based on the mathematical model or on Pe number calculations for the different solutes (ammonia, lactate, glucose, vitamin B12 and AFP)

transfers through MicroPES, Synclear and DiaPES membranes with an applied flow rate of 10 ml/min.

		Ammonia	Lactate	Glucose	Vit B12	AFP	
Characteristics of the solute and experimental conditions	Molecular weight (Da)	17	90	180	1355	70000	
	Stokes radius (nm)	1.15	2.53	3.50	9.04	57.74	
	Experimental temperature (K)	310.15	310.15	310.15	293.15	310.15	
	Nature of the fluid	Culture medium	Culture medium	Culture medium	Water	Culture medium	
	Fluid viscosity (Pa.s)	$8.6 \cdot 10^{-4}$	$8.6 \cdot 10^{-4}$	$8.6 \cdot 10^{-4}$	10^{-3}	$8.6 \cdot 10^{-4}$	
	Diffusion coef. (m^2/s)	$2.16 \cdot 10^{-10}$	$9.82 \cdot 10^{-11}$	$7.09 \cdot 10^{-11}$	$2.23 \cdot 10^{-11}$	$4.30 \cdot 10^{-12}$	
	$Q_f (10^{-8} m^3/min)$	7.59	7.59	7.59	8.91	7.59	
MicroPES	$\bar{J}_f (10^{-4} m/min)$	7.90	7.90	7.90	9.26	7.90	
	Pe	5.49	12.1	16.7	62.3	276	
	Predominant effect	Convection	Convection	Convection	Convection	Convection	
	$Q_f (10^{-8} m^3/min)$	2	2	2	2.09	2	
	$\bar{J}_f (10^{-4} m/min)$	1.38	1.38	1.38	1.44	1.38	
	Synclear	Pe	0.372	0.818	1.13	3.76	18.7
		Predominant effect	Diffusion	Diffusion	None	Convection	Convection
$Q_f (10^{-8} m^3/min)$		0.078	0.078	0.078	0.08	0.078	
$\bar{J}_f (10^{-4} m/min)$		0.054	0.054	0.054	0.056	0.054	
DiaPES	Pe	$1.25 \cdot 10^{-2}$	$2.75 \cdot 10^{-2}$	$3.81 \cdot 10^{-2}$	0.127	0.629	
	Predominant effect	Diffusion	Diffusion	Diffusion	Diffusion	No transfer	

Table 7 Mass transfer parameters for MicroPES, Synclear and DiaPES membranes under the flow rate of 10 ml/min.

MicroPES membrane, the most permeable one, mainly promoted convective mass transfer whatever the molecular weight of the solute of interest. The larger the molecular weight, the higher the convective effect for molecule transfer across the membrane, as indicated by Peclet numbers.

With the Synclear membrane, the intermediate one in term of permeability, governing phenomenon for mass transfer depended on the molecule size. For low molecular weight species such as ammonia, lactate or even glucose, diffusion was the preponderant effect. Flow rate did not thus significantly affect mass transport, since shear enhanced diffusion in the perfusion fluid did not result in higher transfer, as it might occur with dialysis membrane. For middle and high molecular weight molecules such vitamin B12 and AFP, transfers seemed to be ensured mainly by convective effect, as for MicroPES.

Finally, with the DiaPES membrane, the less permeable one, transfers of low to middle molecular weight solutes was mainly achieved by diffusion, and sieving effect completely retained AFP in the cell chamber.

Our initial hypothesis, about the impact of mass transfer on cell viability and functions, was not confirmed in the present study, where cells adhered to the bottom of the HFBL. Even in the case of low permeability membranes, essential nutrients and oxygen were likely to reach the cells, since correct cell adhesion, very high viability and efficient functions were recorded. However, the membrane permeability impacted on the proteins exchange, and more specifically on the non-release to the supernatant of proteins neo-synthesized by the C3A cells.

For Synclear, due to a certain retention effect and to slow convection owing to the medium membrane hydraulic permeability, AFP could reach the supernatant after a significant delay. This delay might be reduced by increasing the perfusion flow rate and thus the internal filtration and concomitant back filtration.

With MicroPES, convective transfers were very efficient. All types of solutes equilibrated in less than 24 hours between the cell chamber and the perfusion fluid. There was no evidence of cell alteration due to the fluid motions in the chamber. Although this aspect was not investigated in the present study, it should be mentioned that MicroPES, as plasmapheresis membrane, was also probably permeable to immunoglobulins. This is in principle not acceptable for future bioartificial liver applications.

In the literature, several types of HFBL have been investigated. Going back to Table 1, and with the present results, it seemed now obvious why all the devices based on 60-80 kDa molecular weight cut off membranes could not fully succeed in liver supply therapy. Whatever the operating conditions, the membrane sieving effects would be deleterious for the transport of many proteins that might be essential in the liver functions. The devices equipped with plasmapheresis membranes showed up to now the most promising results, thanks to highly convective mass transfer. The Hepatassist device operating under large plasma flow rate (about 400 mL/min) favours this effect, which could explain its potential success. Although such membrane can not prevent immune reaction, neither adverse effects nor porcine virus back transfer have been reported up to now (Mullon *et al.*, 1999).

Thanks to its intermediate cut-off estimated around AFP molecular weight, plasmafractionation membranes such as Synclear showed some advantages and could be interestingly integrated in bioartificial liver support system. This type of membrane could allow the release of high molecular weight substances such as albumin (60 kDa) while sieving immunological factors to prevent immuno-reaction. In addition, increasing flow rate could switch the module from a diffusion mass transfer regimen to a convective one, enhancing its efficacy.

e. Conclusions

Membranes from the same material (PES) with different permeabilities (from ultrafiltration to microfiltration) were *in vitro* investigated within minimodules representing one type of hollow fiber based bioartificial liver. Together with a mathematical model of mass transfer, it could be demonstrated that nutrients were adequately provided to cells located in a closed compartment irrigated by the membranes, whatever the membrane porosity.

Membranes could be discriminated following their sieving and mass transfer properties especially for substances synthesized by the liver cells. With microporous membranes, transfers were governed by convection. With hemodialysis membranes, solute transfers were purely diffusive and restricted to low to middle molecular weight solutes. With intermediate plasmafractionation membrane, the type of transfer depended both on solute and on operating conditions. An adequate perfusion flow rate might lead to enhanced kinetics via convective effect.

Besides a better understanding of hydrodynamic and mass transfer behaviour of potential hollow fiber bioartificial liver, the use of such minimodules hosting a small number of cells might be beneficial to set the adequate membrane and operating conditions to be implement in these liver supply devices.

f. Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. Delavenne for his kind assistance, as well as Dr. Sanchez (Compiègne Hospital) whose precious help in analyzing the AFP marker was greatly appreciated. They would also like to thank P. Georgan, M. Gouet and G. Le Pape for developing the statistical analysis tools accessible on AnaStats.fr.

g. Appendix

$$\left. \begin{aligned} \frac{dP}{dx} &= -32 \frac{\mu V}{D^2} \\ V &= \frac{Q}{\pi D^2/4} \end{aligned} \right\} \frac{dP}{dx} = -128 \frac{\mu Q}{\pi D^4} \Rightarrow \Delta P = 128 \frac{\mu Q}{\pi D^4} L = P_{1ext} - P_{1sat}$$

$$Qf = N \int_0^{x^*} \pi D J f(x) dx = N \int_0^{L/2} \pi D J f(x) dx$$

$$Jf(x) = \frac{P_1(x) - \bar{P}_2}{\mu R_m}$$

$$P_1(x) = P_1 + \left(\frac{dP}{dx}\right)x = P_1 - 128 \frac{\mu Q}{\pi D^4} x$$

$$\bar{P}_2 = \frac{1}{L} \int_0^L P_1(x) dx = \frac{1}{L} \int_0^L \left(P_1 - 128 \frac{\mu Q}{\pi D^4} x\right) dx = \frac{1}{L} \left[P_1 L - 128 \frac{\mu Q}{\pi D^4} \frac{L^2}{2} \right]$$

$$\bar{P}_2 = P_1 - 64 \frac{\mu Q}{\pi D^4} L$$

$$Jf(x) = \left[P_1 - 128 \frac{\mu Q}{\pi D^4} x - \left(P_1 - 64 \frac{\mu Q}{\pi D^4} L \right) \right] \frac{1}{\mu R_m}$$

$$Jf(x) = 64 \frac{\mu Q}{\mu R_m \pi D^4} (L - 2x) = 64 \frac{Q}{R_m \pi D^4} (L - 2x)$$

$$Qf = N \int_0^{L/2} \frac{64Q}{R_m D^3} (L - 2x) dx = \frac{64NQ}{R_m D^3} \left[Lx - x^2 \right]_0^{L/2}$$

$$Qf = 64 \frac{NQ}{R_m D^3} \left[\frac{L^2}{2} - \frac{L^2}{4} \right] = 64 \frac{NQ}{R_m D^3} \frac{L^2}{4}$$

$$Qf = 16 \frac{NQ}{R_m D^3} L^2$$

h. References

Catapano, G. (1996) Mass transfer limitations to the performance of membrane bioartificial liver support devices. *The International Journal of Artificial Organs*, 19, 1, 18.

Chen, S.C., Hewitt, W.R., Watanabe, F.D., *et al.* (1996) Clinical experience with a porcine hepatocyte-based liver support system. *The International Journal of Artificial Organs*, 19, 11, 664.

Demetriou, A.A., Rozga J., Podesta L., *et al.* (1995) Early Clinical Experience with a Hybrid Bioartificial Liver. *Scand. J. Gastroenterol*, 208, 111.

Gautier, A., Carpentier, B., Legallais, (2007) Microencapsulation d'hépatocytes pour la suppléance hépatique. *Microencapsulation : des sciences aux technologies* (Lavoisier), T. Vandamme, D. Poncelet, P. Subra-Paternault, ed, pp 295-312.

Gerlach, J. C., (2006) Bioreactors for extracorporeal liver support. *Cell Transplant*, 15, 1, 91.

Gloeckner, H., Jonuleit, T., Lemke, H.D., (2001) Monitoring of cell viability and cell growth in a hollow - fiber bioreactor by use of the dye Alamar Blue™. *Journal of Immunological Methods*, 252, 131.

Gloeckner, H., Lemke, H.D., (2001) New miniaturized hollow-fiber bioreactor for in vivo like cell culture, cell expansion, and production of cell-derived products. *Biotechnol. Prog.*, 17, 828.

Hughes, R. D., Williams, R., (1996) Use of bioartificial and artificial liver support devices. *Semin Liver Dis*, 16, 4, 435.

Jaffrin, M. Y., Reach, G., Notelet, D. (1988) Analysis of Ultrafiltration and Mass transfer in a Bioartificial Pancreas. *Journal of Biomechanical Engineering*, 110, 1.

Jasmund, I., Langsch, A., Simmoteit, R. *et al.*, (2002) Cultivation of primary porcine hepatocytes in an OXY-HFB for use as a bioartificial liver device. *Biotechnol Prog*, 18, 4, 839.

Legallais, C., David, B., Dore, E., (2001) Bioartificial livers (BAL) : current technological aspects and future developments. *J. Membrane Sci.*, 181, 1, 81.

Morsiani, E., Pazzi, P., Puviani, A. C. *et al.*, (2002), Early experiences with a porcine hepatocyte-based bioartificial liver in acute hepatic failure patients. *Int J Artif Organs*, 25, 3, 192.

Mullon, C. (1999) Bioartificial organs may help reduce risk of zoonosis in xenotransplantation. *Artificial Organs*, 23, 4, 366.

Mullon, C., Pitkin, Z., (1999) The HepatAssist bioartificial liver support system: clinical study and pig hepatocyte process. *Expert Opin Investig Drugs*, 8, 3, 229.

Nyberg, S. L., Misra, S. P. (1998) Hepatocyte liver assist systems a clinical update. *Mayo Clin. Proc.*, 73, 8, 765.

Nyberg, S. L., Shatford, R. A., Peshwa, M. V. *et al.* (1993) Evaluation of a hepatocyte-Entrapment Hollow fiber bioreactor: A potential bioartificial liver. *Biotechnology and Bioengineering*, 41, 194.

Park, J. K., Lee, D. H. (2005) Bioartificial Liver Systems: Current status and Future Perspective. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99, 4, 311.

Patzer, J. F., Mazariegos, G. V., Lopez, R., (2002) Preclinical evaluation of the Excorp Medical, Inc, Bioartificial Liver Support System. *J Am Coll Surg*, 195, 3, 299.

Rozga, J., (2006) Liver support technology: an update. *Xenotransplantation*, 13, 5, 380.

Sauer, I. M., Schwartlander, R., Schmid, J. *et al.* (2005) The SlideReactor-A Simple Hollow Fiber Based Bioreactor Suitable for Light Microscopy. *Artificial Organs*, 29, 3, 264.

Schwartlander, R., Schmid, J., Brandenburg, B. *et al.* (2007) Continuously Microscopically Observed and Process-Controlled Cell Culture Within the SlideReactor: Proof of a New Concept for Cell Characterization. *Tissue Engineering*, 13, 1, 187.

Stamatialis, D.F., Papenburg B.J., Girones M., *et al.* (2008) Medical applications of membranes: Drug delivery, artificial organs and tissue engineering. *Journal of Membrane Science*, 308, 1.

Van de Kerkhove, M. P., Poyck, P. P., Deurholt, T. *et al.*, (2005), Liver support therapy: an overview of the AMC-bioartificial liver research. *Dig Surg*, 22, 4, 254.

Watanabe, F.D., Mullon, C.J.P., Hewitt, W.R., *et al.* (1997) Clinical Experience With a Bioartificial Liver in the Treatment of Severe Liver Failure. A Phase I Clinical Trial. *Annals of Surgery*, 225, 5, 484.

Wolf *et al.*, (1975) Bilirubin Conjugation by an Artificial Liver Composed of Cultured Cells and Synthetic Capillaries. *Trans. Amer. Soc. Artif. Int. Organs*, 21, 16.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Lors de ce travail, différentes géométries de foie bioartificiel (lit fluidisé, air lift, fibres creuses) ont été caractérisées physiquement et/ou biologiquement en étudiant le comportement de cellules hépatiques issues d'une lignée humaine immortalisée C3A.

Concernant le bioréacteur à lit fluidisé, les travaux ont porté sur différentes améliorations jugées utiles en vue d'une meilleure efficacité pour une future application clinique. Nous avons cherché dans un premier temps, à déterminer le diamètre des billes d'alginate permettant d'avoir un transfert de masse amélioré. En parallèle, nous avons testé deux types d'alginate pour étudier si la nature de l'alginate (composition, concentration) pouvait avoir une incidence sur le comportement cellulaire. Pour prendre en compte ces phénomènes, nous avons donc amélioré les productions de billes (différents diamètres et compositions) et adapté les protocoles par rapport aux techniques déployées précédemment dans le laboratoire. Puis nous avons suivi les transferts de masse avec une molécule de poids moléculaire connue, la vitamine B12. Nous avons ainsi déterminé des coefficients de transfert de matière quasiment identiques pour les deux diamètres extrêmes de billes (600 et 1000 μm) en prenant en compte la surface d'échange propre à chaque diamètre. Ces résultats ont été confirmés par les expériences menées avec les C3A afin d'étudier leur comportement (viabilité et fonctionnalités) au sein des deux types de billes placées dans le bioréacteur. Il est supposé que cette absence de différence provient de la gélification trop importante pour les billes de faible diamètre. Par la suite, il serait intéressant d'approfondir cette étude sur l'aspect chimique afin d'améliorer le protocole d'encapsulation pour ces billes de 600 μm , qui par principe devraient donner de meilleurs résultats, les trajets diffusifs étant réduits.

Afin de quantifier les transferts de masse au sein des billes, un modèle mathématique a été développé. Il permet également d'estimer les activités cellulaires et de prédire les concentrations de solutés dans le surnageant à des instants donnés. Nous avons pu démontrer que l'activité métabolique des cellules était différente dans la configuration des billes par rapport à la culture en flasque. Enfin, ce modèle peut être utilisé pour les changements d'échelle de bioréacteur, pour déterminer le nombre de cellules, le volume de billes d'alginate et de milieu de culture nécessaires au fonctionnement global.

Une nouvelle géométrie de foie bioartificiel appelé Airlift Reactor (ou gazo-siphon) a été également caractérisée. Ce type de réacteur, employé en Génie Chimique, met en mouvement

la phase fluide grâce à l'apport de gaz sous forme de bulles. Nous avons mis au point et testé un prototype de ce nouveau bioréacteur en plaçant les billes d'alginate dans le fluide mis en mouvement par les bulles d'air. Ce dispositif, avantageux par son régime de perfusion moins limité que dans le cas du lit fluidisé, a montré également des résultats encourageants en terme de transfert de masse. La comparaison avec le bioréacteur à lit fluidisé a permis de montrer que les transferts sont de meilleure qualité dans le Airlift Reactor, principalement car la différence de vitesse relative entre les billes et le fluide environnant y est beaucoup plus élevée. Il reste maintenant à définir les limites éventuelles en présence de cellules. En effet, si la vitesse du fluide est grande, et les transferts de masse optimisés, le comportement des cellules ne doit pas être altéré en termes de viabilité et de fonctions cellulaires essentielles à l'application d'un foie bioartificiel. Cette étude préliminaire laisse entrevoir une certaine pertinence au point de vouloir poursuivre les travaux avec des expériences *in vitro* en présence de cellules.

Nous avons enfin travaillé sur un microbioréacteur équipé de fibres creuses. Récemment, l'application des procédés membranaires dans le domaine biomédical s'est étendue peu à peu du traitement des maladies rénales vers les systèmes de suppléance hépatique. Ce type de géométrie reste donc une technologie prometteuse pour une future application au foie bioartificiel. Nous avons caractérisé les capacités des bioréacteurs en testant différentes membranes montrant des perméabilités et des seuils de coupure différents (MicroPES® classiquement utilisée pour séparer le plasma, une membrane Synclear® utilisée pour fractionner le plasma et une membrane pour l'hémodialyse appelée DiaPES®).

Il a été constaté que les cellules avaient une morphologie et des activités métaboliques quasiment identiques quelle que soit la nature des fibres creuses présentes dans le bioréacteur et quelque soit le débit appliqué (3 ou 10 ml/min). Un effet très net au niveau du seuil de coupure s'est avéré pour les molécules de haut poids moléculaire de type alpha-foetoprotéine. En effet, la DiaPES ne laisse pas passer ce soluté, tandis que la MicroPES reste « invisible » au passage de celui-ci. La Synclear montre un seuil de coupure intermédiaire.

Cette caractérisation, ainsi que la modélisation des transferts, a permis de déterminer un nombre de Péclet caractéristique à chaque soluté et pour chaque type de membrane. Ce nombre de Péclet a mis en évidence que l'effet prépondérant était convectif pour la MicroPES et diffusif pour la DiaPES quelle que soit la nature du soluté. Par contre, pour la Synclear, l'effet était plutôt diffusif pour les molécules de bas poids moléculaires (type ammoniac et lactate) et convectif pour les moyennes et hauts poids moléculaires (type vitamin B12 et alpha-foetoprotéine). Cette approche suggère de « mettre de côté » les membranes de type

MicroPES (qui a un seuil de coupure trop important risquant de laisser passer les facteurs immunitaires de type immunoglobulines) et DiaPES (qui, au contraire a un seuil de coupure trop faible entraînant le non passage de l'albumine). Par conséquent, à l'issue de cette étude, la membrane Synclear s'est montrée très prometteuse en vue d'une future application dans un système de foie bioartificiel. Nous avons également démontré que l'étude des écoulements et des transferts de masse était primordiale pour la compréhension des réponses d'un tel système à son environnement.

Les perspectives de cette étude sont multiples.

Du point de vue du bioréacteur à lit fluidisé :

Concernant l'encapsulation des cellules, il serait intéressant d'étudier l'influence de sphéroïdes au sein des billes d'alginate au lieu de séparer les cellules les unes des autres. En effet, cette configuration laisserait intègres les liaisons cellulaires et imiterait davantage l'organisation cellulaire au niveau du foie *in vivo*.

Dans le même état d'esprit, nous pourrions également tester l'encapsulation de cellules hépatiques au sein de capsules et non de billes, en favorisant leur prolifération, avec une membrane en chitosan par exemple, pour ainsi évaluer les transferts de masse et les réponses biologiques.

Au niveau du délai de culture, il nous semble percutant de prolonger les expériences jusqu'à 7 à 14 jours pour laisser le temps aux cellules de s'adapter à leur nouvel environnement afin qu'elles présentent un meilleur métabolisme. Cette prolongation a montré des résultats encourageants dans l'équipe du Docteur Selden et du Professeur Werynski. On pourrait alors discuter l'intérêt d'encapsuler un grand nombre de cellules pour une utilisation rapide versus la mise en place de cultures prolongées intra-billes avant l'application clinique.

Au niveau de l'optimisation du biomatériau, il serait également possible de procéder à un greffage de peptides type RGD ou de fibronectine ou de collagène de type I ou de galactose afin d'améliorer le revêtement de l'alginate pour une meilleure adhésion cellulaire.

Du point de vue du bioréacteur Airlift :

Pour compléter la caractérisation hydrodynamique et des transferts de masse avec la vitamine B12, il serait judicieux de poursuivre les investigations en cultivant les C3A au sein de ce dispositif pour connaître leur comportement (viabilité et fonctionnalités cellulaires) et ainsi fixer les paramètres physiques : principalement le débit d'air. On envisage ensuite une phase

de mise en place de protocoles pour déterminer la fraction d'alginate la plus adéquate par rapport au volume de fluide présent dans le système, ainsi que le nombre de cellules le plus prometteur. Les remarques pour le bioréacteur à lit fluidisé sont également valables pour cette géométrie.

Du point de vue des minibioréacteurs à fibres creuses :

Nous avons caractérisé les transferts se produisant à travers les membranes semi-perméables. Désormais, il serait intéressant d'étudier le comportement des C3A en utilisant le deuxième réseau permettant l'oxygénation des cellules via les membranes d'Oxyphan.

Au niveau de l'optimisation de la surface dans le compartiment cellulaire, nous avons déjà réfléchi à procéder à un « coating » de RGD ou de fibronectine ou de collagène de type I afin d'améliorer l'adhésion cellulaire voire les fonctionnalités.

Quelle que soit la géométrie des bioréacteurs et la méthode d'immobilisation des cellules, un certain nombre d'autres paramètres sont à prendre en compte. Ils concernent en particulier la source de cellules.

Il pourrait s'avérer pertinent de cultiver les hépatocytes avec d'autres types cellulaires: épithéliales et/ou fibroblastes... afin de reproduire fidèlement l'organisation cellulaire présente au niveau du foie. Une autre piste concerne la différenciation potentielle de cellules souches adultes ou embryonnaires dans les conditions d'encapsulation choisies, pour disposer d'un type cellulaire adéquat à l'application future.

En effet, nous ne perdons pas de vue notre objectif final : l'application clinique du système jugé le plus performant. Ces travaux pourront notamment se réaliser grâce à la collaboration mise en place avec l'équipe du Docteur Selden et du Professeur Hodgson, au Royal Free Hospital and University College Medical School de Londres.

REFERENCES

Agence de la biomédecine (2007) Bilan des activités de prélèvement et de greffe en France en 2006.

Allen, J. W., Bhatia, S. N., (2002) Improving the next generation of bioartificial liver devices. *Cell and Developmental Biology*, 13, 447.

Allen, J. W., Hassanein, T., Bhatia, S. N. (2001) Advances in bioartificial liver devices. *Hepatology*, 34, 447.

Aoki, T., Koizumi, T., Kobayashi, Y. *et al.* (2005) A novel method of cryopreservation of rat and human hepatocytes by using encapsulation technique and possible use for cell transplantation. *Cell Transplant.*, 14, 609.

Arkadopoulos, N., Detry, O., Rozga, J. *et al.*, (1998) Liver assist systems: state of the art. *Int. J. Artif. Organs*, 21, 781.

Ash, S. R., Knab, W. R., Blake, D. E. *et al.*, (2000) Push-pull sorbent-based pheresis and hemodiabsorption in treatment of hepatic failure preliminary results of a clinical trial with the BioLogic-DTPF System. *Therapeutic Apheresis*, 4218.

Bajpai, S. K., Sharma, S., (2004) Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca^{2+} and Ba^{2+} ions. *Reactive and Functional Polymers*, 59, 129.

Bauer, E., Gendo, A., Madl, C. *et al.*, (2002) Effects of sorbent suspension dialysis on plasma amino acids levels in cirrhotic patients with refractory hepatic encephalopathy. *Int. J. Artif. Organs*, 25, 10, 923.

Behamou, J. P., Erlinger, S., *et al.* (2008) *Maladies du foie et des voies biliaires*. Médecine-Sciences Flammarion, 2.

Bertani, H., Gelmini, R., Del Buono, M. G. *et al.*, (2002) Literature overview on artificial liver support in fulminant hepatic failure: a methodological approach, *Int J. Artif Organs*, 25, 903.

Canaple, L., Nurdin, N., Angelova, N. *et al.*, (2001) Maintenance of primary murine hepatocyte functions in multi component polymer capsules – in vitro cryopreservation studies. *Journal of Hepatology*, 34, 11.

Cao, S., Esquivel, C. O., Keeffe, E. B., (1998) New approaches to supporting the failing liver. *Ann. Rev. Med.* 49, 85.

Catapano, G. (1996) Mass transfer limitations to the performance of membrane bioartificial liver support devices. *The International Journal of Artificial Organs*, 19, 1, 18.

Chang, T. M. S. (2005) Therapeutic applications of polymeric artificial cells. *Nat. Rev.: Drug Discov.*, 4; 221.

Chapman, R. W., Forman, D., Peto, R. *et al.*, (1990) Liver transplantation for acute hepatic failure ? *Lancet* 32.

Chen, S.C., Hewitt, W.R., Watanabe, F.D., *et al.* (1996) Clinical experience with a porcine hepatocyte-based liver support system. *The International Journal of Artificial Organs*, 19, 11, 664.

Clement, B., Desille, M., Fremond, B. *et al.*, (1998) Hepatocytes en therapie cellulaire. *Transfusion Clinique et Biologique*, 5, 80.

Coward, S. M., Legallais, C., David, B. *et al.*, (2006) Alginate-Encapsulated HepG2 Cells in a Pilot-Scale Fluidised Bed Bioreactor Maintain Performance in Human Liver Failure Plasma Making Them Suitable for Use in a Bioartificial Liver. *Journal of Hepatology*, 44, 2, 53.

Coward, S. M., Selden, C., Mantalaris, A. *et al.*, (2005) Proliferation rates of HepG2 cells encapsulated in alginate are increased in a microgravity environment compared with static cultures. *Artificial Organs*, 29, 2, 152.

David, B., (2002) Mise en place et validation d'un modèle in vitro pour l'étude des propriétés mécaniques, diffusives et métaboliques d'un foie bioartificiel à lit fluidisé. Thèse

David, B., Barbe, L., Legallais, C. *et al.*, (2006) Mechanical properties of alginate beads hosting hepatocytes in a fluidized bed bioreactor. *International Journal for Artificial Organs*, 29, 8, 756.

David, B., Doré, E., Jaffrin, M. Y. *et al.*, (2004) Mass transfer in a fluidized bed bioreactor using alginate beads for a future bioartificial liver. *International Journal of Artificial Organs*, 27, 4, 284.

David, B., Dufresne, M., Nagel, M. D. *et al.*, (2004) In vitro assessment of encapsulated C3A hepatocytes functions in a fluidised bed bioreactor. *Biotechnol Prog*, 20, 1204.

De Bartolo, L., Morelli, S., Lopez, L. C., *et al.* (2005) Biotransformation and liver-specific functions of human hepatocytes in culture on RGD-immobilized plasma-processed membranes. *Biomaterials*, 26, 4432.

Deckwer, W. D., (1992) *Reaktionstechnik in Blasensäulen*, Otto Salle Verlag.

Demetriou, A.A., Rozga J., Podesta L., *et al.* (1995) Early Clinical Experience with a Hybrid Bioartificial Liver. *Scand. J. Gastroenterol*, 208, 111.

Desille, M., Frémond, B., Mahler, S. *et al.*, (2001) Improvement of the neurological status of pigs with acute liver failure by hepatocytes immobilized in alginate gel beads inoculated in an extracorporeal bioartificial liver. *Transplantation Proceedings*, 33, 1932.

De Vos, P., Faas, M. M., Strand, B. *et al.*, (2006) Alginate-based microcapsules for immunoisolation of pancreatic islets. *Biomaterials*, 27, 5603.

Dixit, V., Gitnick, G., (1996) Artificial liver : State of the art, *Scand J Gastroenterol*, 31, 220, 101.

Dixit, V., Arthur, M., Reinhardt, R. *et al.*, (1992) Improved Function of Microencapsulated Hepatocytes in a Hybrid Bioartificial Liver Support System, *Artificial Organs*, 16, 4, 336.

Dore, E., (1999) Conception d'un foie bioartificiel à lit fluidise. Thèse

Dore, E., Legallais, C., (1999) A new concept of bioartificial liver based on a fluidized bed bioreactor. *Ther. Apher.*, 3, 264.

Ellis, A. J., Hughes, R. D., Wendon, J. A. *et al.*, (1996) Pilot-controlled trial of the extracorporeal liver assist device in acute liver failure. *Hepatology*, 24, 1446.

Emerson, T. E., (1989) Unique features of albumin : a brief review. *Crit Care Med*, 17, 7, 690.

Fassnacht, D., Pörtner, R. (1999) Experimental and theoretical considerations on oxygen supply for animal cell growth in fixed-bed reactors. *Journal of Biotechnology*, 72, 169.

Fassnacht, D., Rössing, S., Stange, J. *et al.* (1998) Long-term cultivation of immortalised mouse hepatocytes in a high cell density, fixed-bed reactor. *Biotechnology Techniques*, 12, 1, 25.

Foscolo, P. U., Gibilaro, L. G., Waldram, S. P., (1983) A unified model for particulate expansion of fluidised beds and flow in fixed porous media. *Chem Eng Sci*, 38, 8, 1251.

Fremont, B., Joly, A., Desille, M. *et al.*, (1996) Cell-based therapy of acute liver failure: the extracorporeal bioartificial liver. *Cell Biol. Toxicol.*, 12, 325.

Fremont, B., Malandain, C., Guyomard, C. *et al.*, (1993) Correction of bilirubin conjugation in the Gunn rat using hepatocytes immobilized in alginate gel beads as an extracorporeal bioartificial liver. *Cell Transplant.*, 2, 453.

Fruhauf, N. R., Oldhafer, K. J., Holtje, M. *et al.*, (2004) A bioartificial liver support system using primary hepatocytes: a preclinical study in a new porcine hepatectomy model. *Surgery*, 136, 1, 47.

Ganguly, U. P., (1980) Direct method for the prediction of expanded bed height in liquid-solid fluidization. *Can J Chem Eng*, 58, 559.

Gao, Y., Jiang, H. C., Xu, J. *et al.*, (2005) Microencapsulating hepatocytes. *Transplantation Proceedings*, 37, 4589.

Gao, Y., Xu, J., Sun, B. *et al.*, (2004) Microencapsulated hepatocytes and islets as in vivo bioartificial liver support system. *World Journal of Gastroenterology*, 10, 14, 2067.

Garbayo, I., Leon, R., Vilchez, C., (2002) Diffusion characteristics of nitrate and glycerol in alginate. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 25, 1.

Gautier, A., Carpentier, B., Legallais, (2007) Microencapsulation d'hépatocytes pour la suppléance hépatique. *Microencapsulation : des sciences aux technologies* (Lavoisier), T. Vandamme, D. Poncelet, P. Subra-Paternault, ed, pp 295-312.

Gerlach, J. C., (2006) Bioreactors for extracorporeal liver support. *Cell Transplant*, 15, 1, 91.

Gloeckner, H., Jonuleit, T., Lemke, H.D., (2001) Monitoring of cell viability and cell growth in a hollow - fiber bioreactor by use of the dye Alamar Blue™. *Journal of Immunological Methods*, 252, 131.

Gloeckner, H., Lemke, H.D., (2001) New miniaturized hollow-fiber bioreactor for in vivo like cell culture, cell expansion, and production of cell-derived products. *Biotechnol. Prog.*, 17, 828.

Griffiths, B. J., Evans, P.J., (2000) Ultrastructural changes in hypothermically preserved hepatocytes. *Cryobiology*, 40, 176.

Guénard, H., Boisseau, M. R., Carré, F. *et al.*, (1996) *Physiologie humaine*. Editions Pradel, 2ème édition, 389.

Hanada, S., Kayano, H., Jiang, J. *et al.* (2003) Enhanced in vitro maturation of subcultivated fetal human hepatocytes in three dimensional culture using poly-L-lactic acid scaffolds in the presence of oncostatin M. *Int J Artif Organs*, 26, 943.

Haque, T., Chen, H., Ouyang, W. *et al.*, (2005) Investigation of a new microcapsule membrane combining alginate, chitosan, polyethylene glycol, poly-L-lysine for cell transplantation applications. *Regenerative medicine*, 28, 6, 641.

Hartman, M., Trnka, O., Svoboda, K., (1994) Free settling of nonspherical particules. *Ind Eng Chem Research*, 33, 1979.

Highleyman, L., (2004) Artificial liver support systems. *HCV advocate*, 7, 11.

Hirata, A., Bulos, F. B., (1990) Predicting bed voidage in solid-liquid fluidization. *J Chem Eng Japan* 23, 5, 599.

Holt, A. W., (1999) Acute Liver Failure, *Critical Care and Resuscitation*, 1, 25.

Hughes, R. D., Williams, R., (1996) Use of bioartificial and artificial liver support devices. *Semin Liver Dis*, 16, 4, 435.

Hui, T., Rozga, J., Demetriou, A. A., (2001) Bioartificial liver support. *J. Hepatobiliary Pancreat Surg*, 8, 1.

Hwang, H. J., Kim, Y. I., Lee, J. G. *et al.*, (2000) Development of bioartificial liver system using a fluidized bed bioreactor. *Transplantation Proceedings*, 32, 2349.

Inderbitzin, D., Muggli, B., Ringger, A. *et al.*, (2005) Molecular Absorbent Recirculating System for the Treatment of Acute Liver Failure in Surgical Patients, *The Society for Surgery of the Alimentary Tract*, 1091.

Indlekofer, M., Brotz, F., Bauer, A. *et al.* (1996) Stereoselective bioconversion in continuously operated fixed bed reactors: modeling and process optimization. *Biotechnol. Bioeng.* 52, 459.

Iseki, J., Touyama, K., Nakagami, K. *et al.*, (1995) Plasma adsorption to charcoal and ion-exchange resin for treating postoperative hepatic failure. *Hepatology*, 42, 4, 394.

Jaffrin, M. Y., Reach, G., Netelet, D. (1988) Analysis of Ultrafiltration and Mass transfer in a Bioartificial Pancreas. *Journal of Biomechanical Engineering*, 110, 1.

Jasmund, I., Langsch, A., Simmoteit, R. *et al.*, (2002) Cultivation of primary porcine hepatocytes in an OXY-HFB for use as a bioartificial liver device. *Biotechnol Prog*, 18, 4, 839.

Kamlot, A., Rozga, J., Watanabe, F. D. *et al.* (1996) Review: artificial liver support systems, *Biotechnol. Bioeng.*, 50, 382.

Kessler, W. R., Popovic, M. K., Robinson, C. W. (1993) Xanthan production in an external-circulation-loop airlift fermenter. *Can. J. Chem. Eng.*, 71, 101.

Khalil, M., Shariat-Panahi, A., Tootle, R. *et al.*, (2001) Human hepatocyte cell lines proliferating as cohesive spheroid colonies in alginate markedly upregulate both synthetic and detoxificatory liver function. *J. Hepatol.*, 34, 68.

Kinasiewicz, A., Gautier, A., Lewinska, D. *et al.*, (2007) Culture of C3A Cells in Alginate Beads for Fluidized Bed Bioartificial Liver. *Transplantation Proceedings*, 39, 2911.

Kinasiewicz, A., Gautier, A., Lewinska, D. *et al.*, (2008) Three-dimensional growth of human hepatoma C3A cells within alginate beads for fluidized bioartificial liver. *The International journal of Artificial Organs*, 31, 340.

Klammt, S., Stange, J., Mitzner, S. R. *et al.*, (2002) Extracorporeal liver support by recirculating albumin dialysis: analysing the effect of the first clinically used generation of the MARSsystem, *Liver*, 22, 2, 30.

Koivusalo, A. M., Vakkuri, A., Höckerstedt, K. *et al.*, (2005) Experience of MARS Therapy With and Without Transplantation in 101 Patients With Liver Insufficiency, *Transplantation Proceedings*, 37, 3315.

Kramer, L., Bauer, E., Gendo, A. *et al.*, (2002) Influence of hydroxy ethyl starch infusion on serum bilirubin levels in cirrhotic patients treated with artificial liver support. *Int J Artif Organs*, 25, 10, 918.

Krisper, P., Haditsch, B., Stauber, R. *et al.*, (2005) In vivo quantification of liver dialysis: Comparison of albumin dialysis and fractionated plasma separation. *Journal of Hepatology*, 43, 451.

Kunii, D., Levenspiel O., (1991) (Eds) *Fluidization Engineering*, second. ed., Butterworth-Heinemann, Boston.

Kurosawa, H., Matsumura, M., Tanaka H. (1989) Oxygen diffusivity in gel beads containing viable cells. *Biotechnol. Bioeng.*, 34, 926.

Legallais, C., David, B., Dore, E., (2001) Bioartificial livers (BAL) : current technological aspects and future developments. *J. Membrane Sci.*, 181, 1, 81.

Legallais, C., Dore, E., Paullier, P., (2000) Design of a Fluidized Bed Bioartificial Liver. *Artificial Organs*, 24, 7, 519.

Legallais, C., Gautier, A., Dufresne, M. *et al.*, (2008) The place of adsorption and biochromatography in extracorporeal liver support systems. *J. Chromatography B*, 861, 171.

Legallais, C., Vijayalakshmi, M. A., Moriniere, P., (2002) in M.A. Vijayalakshmi (Eds), *Biochromatography and Biomedical Applications*. In *Biochromatography Theory and Practice*, Taylor and Francis, London and New York, 496.

Lewinska, D., Rosinski, S., Hunkeler, D. *et al.*, (2002) Mass transfer coefficient in characterization of gel beads and microcapsules. *Journal of Membrane science*, 209, 533.

Lewinska, D., Rosinski, S., Werynski, A., (2004) Influence of process conditions during impulsed electrostatic droplet formation on size distribution of hydrogel beads. *Artif.Cells Blood Substit.Immobil.Biotechnol.*, 32, 41.

Maguire, T., Novik, E., Schloss, R. *et al.*, (2006) Alginate-PLL Microencapsulation : effect of the differentiation of embryonic stem cells into hepatocytes. *Biotechnol. Bioeng.*, 93, 3, 58.

Martinsen, A., Skjak-Braek, G., Smidsrod, O., (1989) Alginate as immobilization material: I. Correlation between chemical and Physical properties of alginate gel beads. *Biotechnology and bioengineering*, 33, 79.

Matthew, H. W., Salley, S. O., Peterson, W. D. *et al.*, (1991) Microencapsulated hepatocytes. Prospects for extracorporeal liver support. *ASAIO Trans.*, 37, 3, 328.

Matsushita, M., Nosé, Y., (1986) Artificial liver. *Artif. Organs*, 10, 5, 378.

Miura, Y., Akimoto, T., Yoshikawa, N. *et al.*, (1990) Characterization of immobilized hepatocytes as liver support. *Biomat. Art. Cells Art. Org.*, 18, 549.

Mizumoto, H., Funatsu, K., (2004) Liver regeneration using a hybrid artificial liver support system. *Artif Organs*, 28, 1, 53.

Morsiani, E., Pazzi, P., Puviani, A. C. *et al.*, (2002), Early experiences with a porcine hepatocyte-based bioartificial liver in acute hepatic failure patients. *Int J Artif Organs*, 25, 3, 192.

Mueller-Klieser, W., (1997) Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications. *Am J Physiol*, 273, C1109.

Mullon, C. (1999) Bioartificial organs may help reduce risk of zoonosis in xenotransplantation. *Artificial Organs*, 23, 4, 366.

Mullon, C., Pitkin, Z., (1999) The HepatAssist bioartificial liver support system: clinical study and pig hepatocyte process. *Expert Opin Investig Drugs*, 8, 3, 229.

Murtas, S., Capuani, G, Dentini, M. *et al.*, (2005) Alginate beads as immobilization matrix for hepatocytes perfused in a bioreactor : a physico-chemical characterization. *J. Biomater. Sci. Polymer. Edn.*, 16, 7, 829.

Nath, S., Chand, S. (1996) Mass transfer and biochemical reaction in immobilized cell packed bed reactors: correlation of experiment with theory. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 66, 286.

Nyberg, S. L., Misra, S. P., (1998) Hepatocyte liver-assist systems--a clinical update. *Mayo Clin. Proc.*, 765.

Nyberg, S. L., Shatford, R. A., Peshwa, M. V. *et al.* (1993) Evaluation of a hepatocyte-Entrapment Hollow fiber bioreactor: A potential bioartificial liver. *Biotechnology and Bioengineering*, 41, 194.

Orive, G., Tam, S. K., Pedraz, J. L. *et al.*, (2006) Biocompatibility of alginate-poly-l-lysine microcapsules for cell therapy. *Biomaterials*, 27, 3691.

Orive, G., Hernandez, R. M., Rodriguez Gascon, A. *et al.*, (2004) History, challenges and perspectives of cell microencapsulation. *Trends in Biotechnology*, 22, 2, 87.

Paez, A., Martinez, N., (2000) *Le corps humain*. Könemann, 60.

Park, J. K., Lee, D. H., (2005) Bioartificial Liver Systems: Current Status and Future Perspective. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99, 4, 311.

Patzer, J. F., Mazariegos, G. V., Lopez, R., (2002) Preclinical evaluation of the Excorp Medical, Inc, Bioartificial Liver Support System. *J Am Coll Surg*, 195, 3, 299.

Pessione, F., Cantrelle, C., Savoye, E. *et al.*, (2007) Activité de prélèvement et de greffe d'organes en France en 2006. *Medecine-Sciences*, 8-9, 23, 761.

Polson, J., Lee, W. M., (2005) AASLD Position Paper: The Management of Acute Liver Failure, *Hepatology*, 41, 5.

Quek, C. H., Li, J., Sun, T. *et al.*, (2004) Photo-crosslinkable microcapsules formed by polyelectrolyte copolymer and modified collagen for rat hepatocyte encapsulation. *Biomaterials*, 25, 3531.

Rahman, T. M., Selden, C., Khalil, M. *et al.*, (2004) Alginate-encapsulated human hepatoblastoma cells in an extracorporeal perfusion system improve some systemic parameters of liver failure in a xenogeneic model. *Artif Organs*, 28, 476.

Richardson, J. F., Zaki, W. N., (1954) Sedimentation and fluidization. *Trans Inst Chem Eng*, 32.

Ringel, M., Von Mach, M. A., Santos, R. *et al.*, (2005) Hepatocytes cultured in alginate microspheres : an optimized technique to study enzyme induction. *Toxicology*, 206, 153.

Ritchie, B. J., Hill, G. A. (1995) Biodegradation of phenol-polluted air using external-loop air lift bioreactor. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 62, 339.

Rozga, J., (2006) Liver support technology : an update. *Xenotransplantation*, 13, 5, 380.

Santoro, A., Faenza, S., Mancini, E. *et al.*, (2006) Prometheus System : A Technological Support in Liver Failure Transplant. *Proc.*, 38, 4, 1078.

Sauer, I. M., Schwartlander, R., Schmid, J. *et al.* (2005) The SlideReactor-A Simple Hollow Fiber Based Bioreactor Suitable for Light Microscopy. *Artificial Organs*, 29, 3, 264.

Sauer, I. M., Goetz, M., Steffen, I. *et al.*, (2004) In vitro comparison of the molecular adsorbent recirculation system (MARS) and single-pass albumin dialysis (SPAD). *Hepatology*, 39, 5, 1408.

Schwartlander, R., Schmid, J., Brandenburg, B. *et al.* (2007) Continuously Microscopically Observed and Process-Controlled Cell Culture Within the SlideReactor: Proof of a New Concept for Cell Characterization. *Tissue Engineering*, 13, 1, 187.

Selden, C., Khalil, M., Hodgson, H., (2000) Three dimensional culture upregulates extracellular matrix protein expression in human liver cell lines – a step towards mimicking the liver in vivo ? *The International Journal of Artificial Organs*, 23, 11, 774.

Selden, C., Roberts, E., Stamp, G. *et al.*, (1998) Comparison of three solid phase supports for promoting three-dimensional growth and function of human liver cell lines. *Int J Artif Organs*, 22, 308.

Selden, C., Shariat, A., McCloskey, P. *et al.*, (1999) Three-dimensional in vitro cell culture leads to a marked upregulation of cell function in human hepatocyte cell lines--an important tool for the development of a bioartificial liver machine. *Ann. N. Y. Acad. Sci*, 875, 353.

Seo, S. J., Akaike, T., Choi, Y. J. *et al.*, (2005) Alginate microcapsules prepared with xyloglucan as a synthetic extracellular matrix for hepatocyte attachment. *Biomaterials*, 26, 3607.

Seo, S. J., Kim, I. Y., Choi, Y. J. *et al.*, (2006) Enhanced liver functions of hepatocytes cocultured with NIH 3T3 in the alginate/galactosylated chitosan scaffold. *Biomaterials*, 27, 1487.

Shiraha, H., Koide, N., Hada, H. *et al.*, (1996) Improvement of serum amino acid profile in hepatic failure with the bioartificial liver using multicellular hepatocyte spheroids. *Biotechnology and Bioengineering*, 50, 416.

Shirai, Y., Hashimoto, K., Irie, S., (1989) Formation of effective channels in alginate gel for immobilization of anchorage-dependent animal cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 31, 342.

Shirai, Y., Hashimoto, K., Kawahara, H. *et al.*, (1989) Production of erythropoietin by BHK cells growing on the microcarriers trapped in alginate gel bands. *Cytotechnology*, 2, 141.

Shiraishi, F., Miyakawa, H., Hasegawa, T., *et al.* (1996) A computational method for determination of the mass transfer coefficient in packed-bed immobilized enzyme reactors. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 66, 405.

Smidsrød, O., Skjak-Bræk, G. (1990) Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends Biotechnol.*, 8, 71.

Stamatialis, D.F., Papenburg B.J., Girones M., *et al.* (2008) Medical applications of membranes: Drug delivery, artificial organs and tissue engineering. *Journal of Membrane Science*, 308, 1.

Stange, J., Mitzner, S., (1996) Cell sources for bioartificial liver support. *Int.J.Artif.Organs*, 19, 1, 14.

Stange, J., Mitzner, S. R., Klammt, S., (2000) Liver support by extracorporeal blood purification: a clinical observation, *Liver Transpl.*, 6, 603.

Sussman, N. L., Chong, M. G., Koussayer, T. *et al.*, (1992) Reversal of fulminant hepatic failure using an extracorporeal liver assist device. *Hepatology*, 16, 60.

Sussman, N. L., Gislason, G. T., Kelly, J. H., (1994) Extracorporeal liver support: application to fulminant hepatic failure. *J Clin Gastroenterol*, 18, 320.

Tan, H. K., (2004) Molecular Adsorbent Recirculating System, *Annals academy of medicine*, 33, 3.

Tompkins, R. G., Carter, E. A., Carlson, J. D. *et al.*, (1988) Enzymatic function of alginate immobilized rat hepatocytes. *Biotech. Bioeng.*, 31, 1, 11.

Ueyama, Y., Ishikawa, K., Mano, T. *et al.*, (2002) Usefulness as guided bone regeneration membrane of the alginate membrane. *Biomaterials*, 23, 2027.

Van de Kerkhove, M. P., Poyck, P. P., Deurholt, T. *et al.*, (2005), Liver support therapy: an overview of the AMC-bioartificial liver research. *Dig Surg*, 22, 4, 254.

Vienken, J., Christmann, H., (2006) *Therapeutic Apheresis and Dialysis*, 10, 125.

Wang, Y., McNeil, B. (1995) Production of the fungal exopolysaccharide scleroglucan by cultivation of *Sclerotium* in an airlift reactor with an external loop. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 63, 215.

Wanner, O., Reichert, P. (1996) Mathematical modelling of mixed-culture biofilms. *Biotechnol. Bioeng.*, 49, 172.

Watanabe, F.D., Mullon, C.J.P., Hewitt, W.R., *et al.* (1997) Clinical Experience With a Bioartificial Liver in the Treatment of Severe Liver Failure. A Phase I Clinical Trial. *Annals of Surgery*, 225, 5, 484.

Wells, G. D., Fisher, M. M., Sefton, M. V., (1993) Microencapsulation of viable hepatocytes in HEMA-MMA microcapsules: a preliminary study. *Biomaterials*, 14, 615.

Wikstrom, J., Elomaa, M., Syvajarvi, H. *et al.*, (2008) Alginate-based microencapsulation of retinal pigment epithelial cell line for cell therapy. *Biomaterials*, 29, 869.

Willaert, R.G., Baron, G.V., De Backer, L. *et al.* (1996) *Immobilized Living Cell Systems: Modelling and Experimental Methods*. Wiley, Chichester.

Wolf *et al.*, (1975) Bilirubin Conjugation by an Artificial Liver Composed of Cultured Cells and Synthetic Capillaries. *Trans. Amer. Soc. Artif. Int. Organs*, 21, 16.

Yang, J., Goto, M., Ise, H. *et al.* (2002) Galactosylated alginate as a scaffold for hepatocytes entrapment.. *Biomaterials*, 23, 471.

Zhou, X. M., Miao, J. Y., Yang, Y. *et al.*, (2004) Clinical Experience with Molecular Adsorbent Recirculating System (MARS) in Patients with Drug-induced Liver Failure, *Artificial Organs*, 28, 5, 483.

Zhou, Y., Sun, T., Chan, M. *et al.*, (2005) Scalable encapsulation of hepatocytes by electrostatic spraying. *Journal of Biotechnology*, 117, 99.

Zimmermann, H., Wehlisch, F., Baier, C. *et al.*, (2007) Physical and biological properties of barium cross-linked alginate membranes. *Biomaterials*, 28, 1327.

Zmora, S., Glicklis, R., Cohen, S., (2002) Tailoring the pore architecture in 3-D alginate scaffolds by controlling the freezing regime during fabrication. *Biomaterials*, 23, 4087.

ANNEXES

ANNEXE 1 : MATERIEL ET METHODES DETAILLES

Culture cellulaire

Les cellules de foie humain C3A (CRL-10741) fournies par ATCC (American Type Culture Collection) sont cultivées dans des flasques avec du milieu Minimum Essential Medium Earles salts, L-glutamine (MEM) (Gibco) complétement avec 0,2 % de glutamine, 1 % de solution 100 × concentrée de pénicilline-streptomycine, 1 % de solution de Non-essential Amino Acids (Gibco), 1 % de Hepes Buffer solution 1 M (Gibco), 1 % sodium pyruvate 100 mM (Gibco) et de 10 % de sérum de veau fœtal (Gibco) sous hotte à flux laminaire. Les cultures sont incubées dans une étuve humide à 5 % de dioxyde de carbone à 37 °C.

L'ensemencement initial est de 3 millions de cellules par flask T75 (soit 40000 cellules/cm²). Le milieu de culture doit être renouvelé tous les 3 jours. Pour une prolifération favorable, il convient de mettre 20 ml de milieu de culture pour une boîte de 75 cm².

Les passages se font à partir d'une boîte mère à pré confluence c'est-à-dire à une densité suffisante d'environ 23 millions de cellules par boîte de 75 cm² pour assurer une reprise des cellules après repiquage.

Protocole de culture des C3A en billes d'alginate et mise en perfusion en bioréacteur à lit fluidisé (valable pour une flasque T75)

- Dissociation des cellules

Les hépatocytes C3A, arrivés à confluence, (soit environ 25 millions par boîte Falcon 75 cm²), adhèrent à la boîte de culture. Ils sont rincés une première fois avec 2 ml d'une solution de Trypsine-EDTA (50%-50%) à 37°C puis placés dans l'incubateur à 37 °C (5% CO₂) avec 3 ml de cette même solution pendant 5 à 10 min. La dissociation est suivie régulièrement sous microscope. Puis l'effet de la trypsine est inhibé avec 7 ml de milieu de culture complet. Enfin, les cellules sont dissociées par pipetage mécanique jusqu'au stade de 3 cellules environ. Un comptage est alors effectué à l'aide d'une cellule de Malassez.

- Préparation du mélange alginate – hépatocytes

Produits utilisés lors de la production de billes d'alginate en présence de cellules

Composition de la solution d'alginate :

NaCl	154 mM
Hepes	10 mM
Alginate	2,2 %

Composition de la solution de bain de gélification :

NaCl	154 mM
Hepes	10 mM
CaCl ₂	115 mM

Composition de la solution de NaCl :

NaCl	154 mM
Hepes	10 mM

Toutes les solutions seront ajuster au physiologique c'est-à-dire 7,4. Puis stérilisées à l'autoclave excepté la solution d'alginate qui sera stérilisée par filtration sur filtre de 0,45 µm.

Milieu de culture complet à partir du Minimum Essential Medium Earles salts,

L-glutamine (Gibco) :

Glutamine	0,2 %
Pénicilline-Streptomycine	0,5 %
Hepes Buffer (Gibco)	1%
Sodium Pyruvate (Gibco)	1 %
Non-essential Amino Acids (Gibco)	1 %
Sérum de veau fœtal (Gibco)	10 %
Minimum Essential Medium Earles salts, L-glutamine (Gibco)	86,5 %

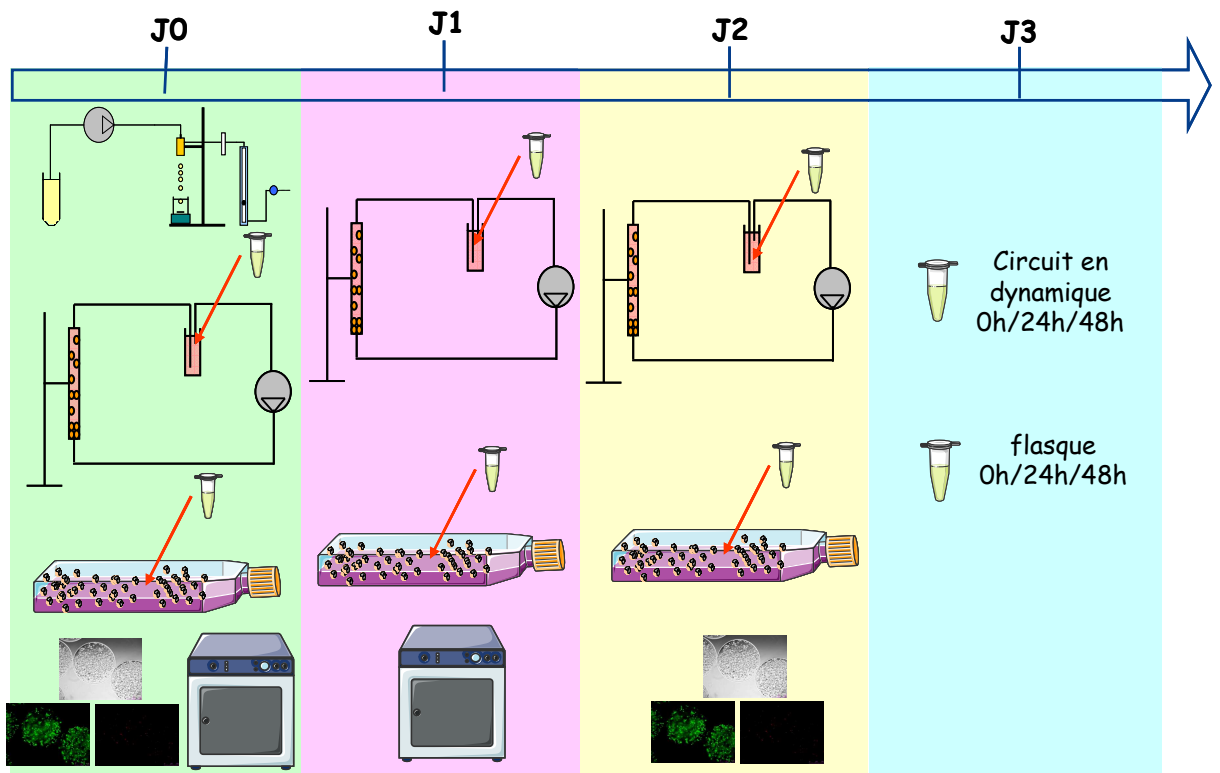
La solution d'alginate utilisée de référence est 0682 de chez Sigma Aldrich à 2,2% de concentration. La densité cellulaire nécessaire est de 5 millions de cellules par mL d'alginate (soit 50 millions de cellules pour 10 mL d'alginate dans le cas du bioréacteur à lit fluidisé). Le nombre de cellules adéquat est alors transféré dans un tube à centrifuge puis centrifugé à 1000 tours pendant 5 min à 4°C. Le culot cellulaire est suspendu dans 1 ml de solution de NaCl (154 mM) et Hepes (10 mM) puis mélangé dans 9 ml d'alginate. La solution résultante est homogénéisée délicatement en évitant la formation de bulle.

- Coulage des billes

La pompe péristaltique (ISMATEC IPC) alimente le circuit de production de billes (5,65 ml/min) placé sous la hotte à flux laminaire. Le débit du flux d'air coaxial est contrôlé par une mesure de pression grâce à un manomètre. Pour former une bille de 1 mm de diamètre, le débit du flux d'air coaxial est de 3L/min. La distance de chute est de 10 cm. Le temps d'immersion est de 15 minutes dans un bain de CaCl₂ de 50 mL. Les billes sont ensuite rincées 2 fois avec du milieu de culture complet. Puis, elles sont placées dans le bioréacteur à lit fluidisé à 37°C et 5% de CO₂ avec 42 mL de milieu de culture.

- Mise en perfusion en bioréacteur à lit fluidisé

La pompe utilisée pour la perfusion est une Watson Marlow réglée au débit de 10 mL/min. On amorce la pompe avec du milieu de culture, on place les billes préparées la veille dans le bioréacteur à lit fluidisé puis on complète avec du milieu de culture. Le volume total de milieu de culture du circuit est de 42 mL. On ferme le système et on met en route la pompe pendant 5 min dans le but de chasser l'air qui se trouve à l'intérieur du circuit. Au bout de cinq minutes, on arrête la fluidisation et on note la hauteur du lit une fois tassé. C'est à ce moment que les premiers échantillons doivent être pris au niveau du flacon de milieu de culture (volume total prélevé 1 ml) et la fluidisation est ensuite remise en route. Au bout de 24h et 48h, les hauteurs du lit fluidisé sont notées, suivi des prélèvements qui sont tout de suite analysés. Pour la flasque témoin, deux rinçages de la flasque T75 hébergeant les hépatocytes à confluence sont effectués avec 20 ml de milieu de culture à chaque fois et on place 20 ml de milieu de culture. A ce moment, les échantillons de la flasque témoin sont prélevés pour marquer le temps zéro et directement analysés. Au bout de 24h et 48h, les échantillons de la flasque témoin sont prélevés. Un autre témoin utilisé est le milieu de culture complet seul avec des prélèvements à ces mêmes heures. Au niveau du bioréacteur et de la flasque témoin, à chaque volume prélevé, le même volume de milieu de culture neuf est rajouté pour rester à volume constant. Les échantillons sont ensuite analysés pour déterminer les concentrations d'albumine, alpha-foetoprotéine, glucose, lactate, ammoniac et urée.



Protocole de culture des C3A en minimodule à fibres creuses et mise en circuit des minimodules (valable pour une flasque T75)

- Dissociation des cellules

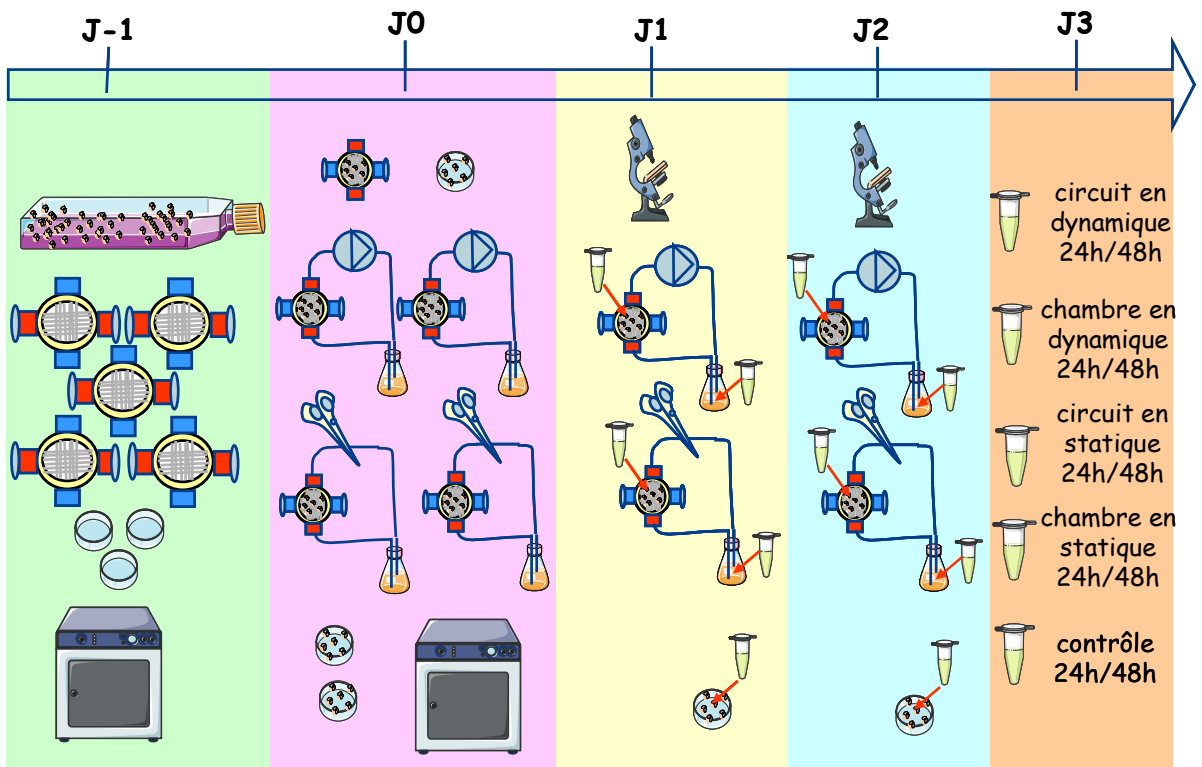
Les hépatocytes C3A, arrivés à confluence, (soit environ 25 millions par boîte Falcon 75 cm²), adhèrent à la boîte de culture. Ils sont rincés une première fois avec 2 ml d'une solution de Trypsine-EDTA (50%-50%) à 37°C puis placés dans l'incubateur à 37 °C (5% CO₂) avec 3 ml de cette même solution pendant 5 à 10 min. La dissociation est suivie régulièrement sous microscope. Puis l'effet de la trypsine est inhibé avec 7 ml de milieu de culture complet. Enfin, les cellules sont dissociées par pipetage mécanique jusqu'au stade de 3 cellules environ. Un comptage est alors effectué à l'aide d'une cellule de Malassez.

- Mise en place des cellules en minimodule

La densité cellulaire nécessaire est de 0,5 millions de cellules C3A par minimodule. Le nombre de cellules adéquat est alors transféré dans un tube à centrifuge puis centrifugé à 1000 tours pendant 5 min à 4°C. Le culot cellulaire est suspendu dans 1 ml de milieu de culture puis placé dans la chambre du minimodule. Le volume total de milieu de culture de la chambre est de 2 mL. Les cellules sont ensuite incubées à 37°C avec 5% de CO₂ pendant 24h pour les laisser sédimenter. Des boîtes de Pétri sont également utilisées comme contrôle avec le même ensemencement de cellules que les minimodules et le même volume de milieu de culture. A chaque temps (0h, 24h, 48h), une boîte de Pétri sera arrêtée : le milieu de culture sera alors recueilli et un comptage de cellules sera effectué.

- Mise en circuit des minimodules

A chaque expérience, 5 minimodules avec le même type de membrane sont utilisés. Après 24h, les minimodules sont incorporés dans les circuits avec 3 mL de milieu de culture par circuit et placés dans l'incubateur à 37°C et 5% CO₂ : 2 pour la culture en dynamique avec un débit de 3 ou 10 mL/min et 2 pour la culture en statique avec un clamp. Après 24h, 48h, un bioréacteur de chaque condition est arrêté et le milieu de culture de chaque compartiment (chambre et circuit) est recueilli indépendamment pour être analysé. Les échantillons sont ensuite analysés pour déterminer les concentrations d'albumine, alpha-foetoprotéine, glucose, lactate, ammoniac et urée.



Dosages

Chaque échantillon est dosé trois fois pour obtenir une moyenne plus précise.

- Urée

La concentration d'urée est mesurée par l'automate de biochimie KONELAB (Thermo Electron) dont la programmation a été adaptée. L'automate prélève 30 µL de spécimen dilué avec 10 µL d'eau ultrapure et l'ajoute à 100 µL de réactif dilué avec 30 µL. L'incubation dure 300 secondes à 37°C puis la lecture se fait à 340 nm.

L'urée est hydrolysée en présence d'eau et d'uréase pour donner naissance à de l'ammoniac et à du dioxyde de carbone. En présence de glutamate déhydrogénase (GLDH) et de nicotinamide adénine dinucléotide sous forme réduite (NADH), l'ammoniac se combine à l' α -cétoglutarate (α -CG) pour former du L-glutamate.

La diminution de l'absorbance à 340 nm qui en résulte, suite à la conversion du NADH en NAD, est proportionnelle à la concentration en urée dans l'échantillon.



- Ammoniac

La concentration d'ammoniac est mesurée par un automate de biochimie KONELAB de chez Thermo. L'automate prélève 20 µL de spécimen dilué avec 10 µL d'eau ultrapure et ajoute dans 125 µL de réactif 1 dilué avec 20 µL d'eau ultrapure. L'incubation à 37°C dure 300 secondes. Puis l'échantillon est repris et distribué dans 25 µL de réactif 2 dilué avec 10 µL d'eau distillée. Cette incubation dure 300 secondes puis la lecture se fait à 340 nm. Le dosage doit être pratiqué rapidement après décongélation de l'échantillon sinon la glutamine est hydrolysée et libère de l'ammoniac qui fausse le dosage.

L'ammoniac se combine avec α -ketoglutarate et NADPH en présence de glutamate déhydrogénase (GLDH) pour former glutamate et NADP⁺. La diminution de l'absorbance à 340 nm est proportionnelle à la concentration d'ammoniac dans le plasma.



- *Albumine*

1ère étape : Sensibilisation

Préparer la solution de sensibilisation :

50 ml de tampon carbonate (0,1 M, pH= 9,5) + 25 µL de solution mère anti IgG albumine humaine Cappel (réf. : 55028, lot : 03284) (dilution 1/2000)

- Mettre 100 µL de cette solution par puits
- Recouvrir la plaque de Parafilm ou d'aluminium
- Laisser la plaque incuber la nuit à 4°C dans le tupperweare

Laver la plaque avec la solution de lavage (PBS + caséine (0,2%) + tween 20 (0,1%)) 3 fois, 200 µL par puits

2ème étape : Passivation

Préparer une solution de passivation :

PBS + gélatine (2%) + tween 20 (0,1%)

- Mettre 200 µL de la solution de passivation par puits
- Recouvrir la plaque de Parafilm ou d'aluminium
- Laisser la plaque incuber 2 h à 37°C

Laver la plaque avec la solution de lavage (PBS + caséine (0,2%) + tween 20 (0,1%)) 3 fois, 200 µL par puits

3ème étape : Préparation des spécimens

o *gamme étalon*

- Aller chercher de la glace au LTE
- Prendre la solution mère d'albumine à 1 mg/ml
- Préparer 40 ml de milieu de culture complet (MEM SVF 10%) et rajouter tween 20 (0,1%)
- Préparer une solution C1, de concentration 10000 ng/ml (step 0) puis faire les dilutions appropriées step par step comme dans le tableau suivant :

Step	Concentration (ng/ml)	Volume de la solution C1 (μ L)	Milieu de culture complet + tween 20 (μ L)
0	10000	60	5940
1	400	48	1152
2	200	24	1176
3	100	12	1188
4	50	6	1194
5	25	3	1197
6	12,5	1,5	1198,5
7	6,25	0,75	1199,25

o *échantillons*

- Décongeler les échantillons
- Faire les dilutions avec du milieu complet (MEM + SVF 10%) + tween 20 (0,1%)
- Vortexer les échantillons et les placer dans la glace en attendant que tous les échantillons soient prêts
- Une fois les échantillons prêts, les revortexer avant de les placer dans les puits
- Mettre 100 μ L de spécimen par puits
- Recouvrir la plaque de Parafilm ou d'aluminium
- Laisser la plaque incuber 1 h 30 min à 37°C

Laver la plaque avec la solution de lavage (PBS + caséine (0,2%) + tween 20 (0,1%)) 3 fois, 200 μ L par puits

4ème étape : Introduction du conjugué

Préparer 16 ml de PBS + tween 20 (0,1%) + caséine (0,2%) + 2 μ L de solution anti IgG albumine humaine HRP Cappel (réf. : 55235, lot : 03806) (dilution : 1/8000)

- Mettre 100 μ L de cette solution par puits
- Recouvrir la plaque de Parafilm ou d'aluminium
- Laisser la plaque incuber 1 h à 37°C

Laver la plaque avec la solution de lavage (PBS + caséine (0,2%) + tween 20 (0,1%)) 3 fois, 200 µL par puits

5ème étape : Introduction du substrat

Préparer la solution du substrat :

12,5 ml tampon citrate (0,05M, pH=7,4) + 5 µL H₂O₂ 30% + 1 pastille OPD (5mg)

Placer cette solution à l'obscurité dans de l'aluminium

Préparer la solution d'arrêt de la réaction 2N :

10 ml acide sulfurique 98% + 80 ml d'eau milliQ

- Mettre 100 µL de la solution de substrat par puits
- Attendre jusqu'à ce que la coloration jaune de la gamme soit satisfaisante
- Mettre 100 µL de la solution d'acide sulfurique 2N par puits pour arrêter la réaction

Lecture à 492 nm

- *Alpha-foetoprotéine*

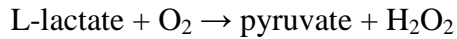
Méthode « sandwich ».

- 1ère incubation : une prise d'essai de l'antigène dans 10 µl d'échantillon est mise en présence d'un anticorps monoclonal anti-AFP spécifique marqué à la biotine et d'un anticorps monoclonal anti-AFP spécifique marqué au ruthénium. Il se forme un « sandwich ».
- 2ème incubation : les microparticules tapissées de streptavidine sont ajoutées dans la cuvette réactionnelle. Le complexe immunologique est fixé à la phase solide par une liaison streptavidine-biotine.
- Le mélange réactionnel est transféré dans la cellule de mesure, les microparticules sont maintenues au niveau de l'électrode par un aimant. L'élimination de la fraction libre est effectuée par le passage de ProCell. Une différence de potentiel appliquée à l'électrode déclenche la production de luminescence qui est mesurée par un photomultiplicateur.
- Les résultats sont obtenus à l'aide d'une courbe de calibration. Une courbe de référence est mémorisée dans le code-barres du réactif et est réajustée, pour l'analyseur utilisé, par une calibration en deux points.

- *Lactate*

Test colorimétrique.

Le L-lactate est oxydé par l'oxydase lactique (LOD), enzyme spécifique, pour former du pyruvate. La peroxydase (POD) est utilisée pour générer un colorant avec l'eau oxygénée résultant de la première réaction.



L'intensité de la coloration formée est directement proportionnelle au taux de L-lactate. Elle est déterminée en mesurant l'augmentation de l'absorbance.

- *Glucose*

Cette méthode utilise la glucose oxydase (GOD) et une réaction colorée de Trinder modifiée catalysée par la peroxydase (POD). Le glucose est oxydé en D-gluconate par la glucose-oxydase avec formation d'une quantité équimolaire de peroxyde d'hydrogène. En présence de peroxydase, la 4-aminoantipyrine et le phénol subissent une réaction d'oxydation par le peroxyde d'hydrogène pour donner naissance à un colorant quinoné-imine de couleur rouge. L'intensité de la coloration engendrée par cette réaction est mesurée à 510 nm et est proportionnelle à la concentration en glucose dans l'échantillon.



Evaluation de la viabilité cellulaire

Pour évaluer la viabilité cellulaire, la solution d'Orange Acridine est utilisée. La solution de stockage est à préparer en reconstituant 15 mg de cette poudre avec de l'éthanol à 95% et y ajouter 49 ml d'eau distillée. Aliquoter la solution en échantillons de 1 mL et les placer au congélateur. Pour utiliser cette solution directement, décongeler un échantillon de 1 mL et le diluer au 1/100 avec du PBS et mélanger. Pour conserver cette solution pendant 1 mois, placer la dans l'obscurité dans une feuille d'aluminium à 4°C.

Pour évaluer l'apoptose des cellules, la solution d'iodure de propidium est utilisée. La solution de stockage est à préparer à une concentration de 1mg/mL dans de l'eau distillée. Aliquoter la solution en échantillons de 1 mL et les placer au congélateur. Pour utiliser cette solution directement, décongeler un échantillon de 1 mL, prélever un volume de 500 µL et le diluer avec 9,5 mL de PBS puis mélanger. Pour conserver cette solution pendant 1 mois, placer la à 4°C.

L'analyse de la viabilité cellulaire s'effectue en ajoutant chacune de ces deux solutions à même volume que la suspension cellulaire. Mélanger délicatement. Attendre 5 minutes et observer au microscope à fluorescence.

ANNEXE 2 : ARTICLE SUPPLEMENTAIRE

The International Journal of Artificial Organs / Vol. 31 / no. 4, 2008 / pp. 340-347

Liver Assist Devices

Three-dimensional growth of human hepatoma C3A cells within alginate beads for fluidized bioartificial liver

A. KINASIEWICZ¹, A. GAUTIER², D. LEWIŃSKA¹, A. ŚMIETANKA¹, C. LEGALLAIS², A. WERYŃSKI¹

¹Institute of Biocybernetics and Biomedical Engineering, Polish Academy of Sciences, Warsaw - Poland

²Université de Technologie de Compiègne, Biomechanics and Biomedical Engineering, Compiègne - France

ABSTRACT: Objectives: Alginate beads allow cultivation of cells in a 3-dimensional environment. The aim of our study was to assess the influence of a 3-dimensional culture in alginate microbeads, on hepatic cell metabolism.

Methods: We used 2 types of alginate: low viscosity (LV) and medium viscosity (MV). The hepatic cell line C3A was encapsulated in alginate beads. Cells were cultured for 2 weeks. Using scanning electron microscopy, the morphology of 3D structures and the surfaces of cells were analyzed. Fluidized bed bioartificial liver experiments were performed 24 hours, 7, and 14 days after bead formation. Results: Two different cell growth types in alginate beads were observed: channel-like structures and spherical aggregates characteristic of LV and MV alginate, respectively. A significant increase in albumin synthesis was observed in long-term culture. Formation of characteristic hepatic cell microvilli on cell surfaces was observed under scanning electron microscopy for both types of alginate. Prolonged static cultivation of C3A cells within the alginate beads in both types of alginates caused significant increases in albumin production in the fluidized bioreactor.

Conclusions: Cultivation of the hepatic C3A cells within the alginate microbeads significantly improved bioreactor effectiveness in albumin production. The presence of extensions of cell membranes on the surface of hepatoma cells in 3-dimensional culture within the alginate beads indicated formation of microvilli-like structures characteristic of normal hepatocytes. (Int J Artif Organs 2008; 31: 340-7)

KEY WORDS: Albumin, Bioartificial liver, Bioreactor, Hepatic cell, Three-dimensional culture

INTRODUCTION

The metabolism of isolated hepatic cells is crucial for the efficiency of extracorporeal liver devices for liver support. Bioartificial liver devices (BALs) are being developed for patients suffering from acute or acute on chronic liver failure. There are different approaches with these devices regarding use of 3-dimensional hepatic cell cultures (1, 2). One of them is the BAL with hepatic cells encapsulated in alginate microbeads (3, 4). Three-dimensional environments are closely related to the intact liver, where hepatic cells are packed in high density. The alginate beads allow cultivation of cells in a 3-dimensional environment (5). In our previous work, static cultivation of human hepatoma

C3A cells facilitated restoration of hepatic cell function and increased albumin production in fluidized bioreactors when compared with static incubation (6). The fluidized bioreactor with alginate beads was shown to be easy to handle and to scale up, and mass transfers between the perfusion fluid and the alginate beads were enhanced in the fluidized bed configuration (7).

An open question concerning the BAL is the cell's source for the cellular component of the device. The quantity of hepatic cells from human livers for bioreactor is limited because of the shortage of donors; therefore, improvement of cell metabolism in BALs is essential for success in clinical liver support. Alternative cell sources for BALs are cell lines derived from human hepatoma,

which have been already used in clinically tested BALs (8, 9). The C3A cell line can be grown *in vitro*, stored, and shipped worldwide. Even though C3A cells reveal low detoxification activity, the high proliferation rate of C3A cells makes them very interesting as a cellular component of the BAL. In the clinically tested, extracorporeal liver assist device (ELAD; Hepatix Inc.) developed by Sussmann et al, C3A cells were grown in the extracapillary space of a dialysis cartridge. The cutoff of the dialysis membranes used in the BAL significantly limited transport of proteins across the membrane. If the flux of albumin from the patient's blood to the extracapillary cell compartment is limited to about 5% of the plasma concentration, it will impair the detoxification capacity of the device for protein-bound substances (10). The transfer problem of large proteins between cellular and plasma/blood compartments can be avoided in fluidized bioreactors with alginate beads hosting hepatic cells.

The aim of our study was to assess the influence of a 3-dimensional culture in the alginate microbeads, on hepatic cell metabolism. In our study, human hepatic cells C3A were encapsulated in the alginate microbeads to promote cell proliferation and optimize the cell environment in the beads for a fluidized bed bioartificial liver.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

The C3A cells (ATCC, LGC Promochem, Lomianki, Poland) were cultured in 75-cm² polystyrene flasks (Corning, USA) in standard culture conditions (atmosphere of 5% CO₂ at 37°C and humidified) in culture medium consisting of minimal essential medium (MEM) supplemented with 10% fetal calf serum, nonessential amino acids, penicillin/ampicillin, glutamine, and pyruvate and buffered with HEPES (all from Gibco). The medium was changed 3 times per week. The cells were cultured to over 90% confluence before bead formation.

Alginate bead formation

Alginate beads were formed using 2 types of alginates (both from Sigma, USA): low viscosity (LV; 2% solution in water, at 25°C has viscosity of 250 mPa·s) and medium viscosity (MV; 2% solution in water, at 25°C has viscosity of 3,500 mPa·s) alginate sodium salt. All chemicals used

were of analytical grade. Before the alginate bead formation, C3A cells were trypsinized with 3 mL trypsin/EDTA solution, washed with the culture medium, counted using a hemacytometer, and then suspended in alginate solution. Cell concentrations in the experiments performed were 1×10⁶ cells/mL of alginate and 5×10⁶ cells/mL of alginate. Alginate droplets were formed using 2 methods: an electrostatic droplets generator designed in the Institute of Biocybernetics and Biomedical Engineering PAS in Warsaw, Poland (11) and the air-extrusion method (12). Parameters of the process including electrical field, air, and alginate flow to obtain the beads of expected diameter were experimentally chosen after trials without cells. Calcium chloride (115 mM in 0.9% NaCl) buffered with HEPES (10 mM) was used as a gellification bath. After 15 minutes of gellification, the beads were washed with the culture medium and divided into the wells of the culture plate (Corning, USA). The beads hosting hepatic cells were cultured for over 2 weeks in sterile conditions. The culture medium was changed 3 times per week, and pictures of the beads were taken at the same time. Samples of the medium were taken and frozen for subsequent analysis of albumin concentration. The diameter of the alginate beads was measured on pictures taken under an inverted microscope using CellP software (Olympus, Japan).

To assess the influence of encapsulated particle size on the formation of channels within the beads and type of the alginate, beads with glass particles were prepared. Glass beads with a diameter ranging from 10 to 50 μm were suspended in 2 types of alginate (LV and MV) solution, and subsequently dropped into the gellification bath, as described above. After gellification, the beads were observed under an inverted microscope.

Microscopic analysis

For fluorescence microscopy, the beads were dissolved in citrate, and the cells were fixed and stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) to visualize the cell nuclei.

Assessment of cell viability

Hepatic C3A cell viability was assessed using fluorescence staining with propidium iodide (which stains dead cells red) and with acridine orange (stains live cells green) as previously described (6).

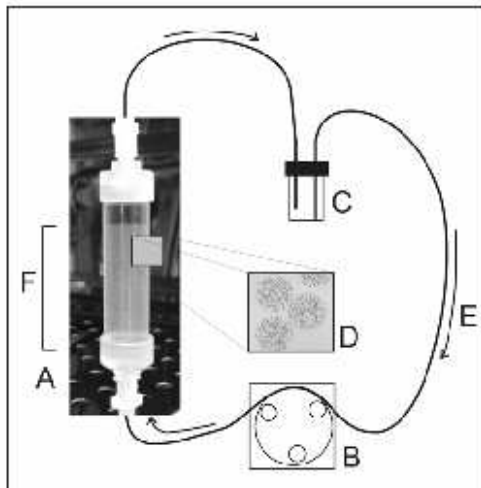


Fig. 1 - Setup of the fluidized bed bioartificial liver. A) Fluidized bio-reactor; B) peristaltic pump; C) medium reservoir; D) alginate beads with hepatoma C3A cells; E) culture medium flow; F) alginate beads in fluidized phase.

Scanning electron microscopy

The cultured cells were fixed in glutaraldehyde, dehydrated in ethanol, dried in a critical-point dryer, and coated with a gold layer before scanning electron microscopy (SEM) examination (XL30; Philips, Suresnes, France).

Assessment of albumin production

Albumin concentration was determined by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Briefly, 96-well plates (Nunc, USA) were coated with goat antibody against human albumin (Bethyl, USA) overnight at 4°C. The plates were washed, and nonspecific interactions were subsequently blocked. After washing, samples and standards of human albumin (in duplicate) were placed in wells and incubated. The wells were then washed and incubated with an antibody against human albumin produced in goat and horseradish peroxidase (HRP)conjugated (Bethyl, USA). The wells were incubated after washing, adding H₂O₂ and substrate tetramethylbenzidine (TMB) for the HRP. The reaction was stopped by addition of 2 N sulfuric acid H₂SO₄. The absorbance of the

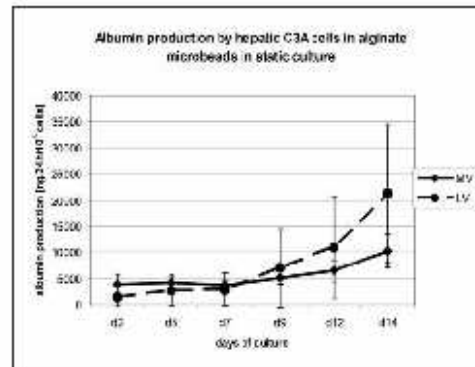


Fig. 2 - Production of albumin by hepatic C3A cells encapsulated in alginate beads composed of 2 types of alginate (LV: low viscosity alginate, n=9, and MV: medium viscosity alginate, n=6) during static culture for 2 weeks.

wells was measured at 450 nm using an ELISA microplate reader (BIOTEK).

Fluidized bioreactor experiments

Bioreactor experiments lasting for 24 hours were carried out 24 hours, 7, and 14 days after the bead formation and static culture. The bioreactor setup consisted of the bioreactor, prepared from autoclavable polycarbonate (9.6 mm internal diameter and 50 mm length), medium reservoir, and peristaltic pump (Ismatec), as shown in the Figure 1 (7). The volume of alginate beads within the bioreactor was 1 mL, and the total volume of the circuit was 15 mL. All tubing made of silicone was autoclavable. The bioreactor was perfused with MEM culture medium at a flow rate of 3 ml/min.

Statistical analysis

Results were expressed as mean ± standard deviation. Statistical comparisons were made with the Student's test. P < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

The alginate beads were formed using 2 methods: electrostatic and extrusion. The electrostatic method,

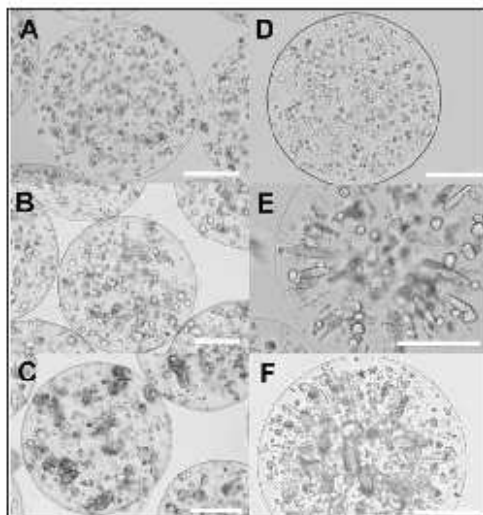


Fig. 3 - Comparison of hepatic cell growth in the alginate beads. A-C) hepatic C3A cells in alginate beads composed of low viscosity alginate; D-F) hepatic cells in alginate beads composed of medium viscosity alginate (bars = 200 nm); A, D) 24 hours after bead formation; B, E) after 7 days of static culture; C, F) after 14 days of static culture. (Light microscopy. Objective magnification: 10x).

which gives more a homogenous fraction of the beads, was applied for long-term culture of hepatic cells within alginate beads. The type of alginate used in the experiments performed did not influence the cell viability. The mean hepatic cell viability measured using fluorescence staining did not differ between alginates and produce $90.1\% \pm 4.1\%$ viable cells after the encapsulation process for LV alginate, versus $93.1\% \pm 0.9\%$ for MV alginate.

The alginate beads hosting C3A hepatic cells were cultured in MEM for the subsequent 2 weeks. During the culture the bead diameter did not change significantly, indicating the stability of beads composed of either LV or MV alginate for 2-week culture. Albumin concentration in the medium was measured in the samples of culture. A significant increase in albumin synthesis was observed in long-term culture. The values of albumin concentration measured in the medium are summarized in Figure 2.

The formation of 2 types of multicellular structures was observed in long-term culture. The first was characterized

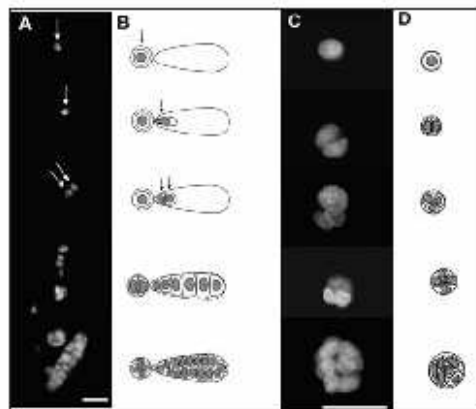


Fig. 4 - Fluorescence microscopy pictures of DAPI-stained cell nuclei in 3-dimensional culture of hepatic C3A cells within the alginate beads, and schematic drawings of cell nuclei. A, B) Channel-like structures formed in medium viscosity alginate; C, D) spherical aggregates formed in low viscosity alginate.

as regular spherical aggregates (Fig. 3B, C), whereas the other had a channel-like structure (Fig. 3E, F). Two distinguishable cell growth types were observed in the following days after bead formation. The channel-like structures were observed much more frequently in the alginate beads formed using MV alginate, whereas they were almost absent in beads formed using LV alginate (Fig. 3B, F). The relative frequency of channel-like structures in LV alginate was $4.48\% \pm 9.16\%$ of the frequency of channel-like structures in the MV alginate ($p < 0.01$; $n = 20$).

The cell proliferation process within the alginate beads composed of 2 types of alginate (LV and MV) is summarized in Figure 4. The initial cell distribution within the alginate beads produced from both types of alginate was similar (Fig. 3A, D; LV and MV alginate, respectively). The hepatic C3A cells proliferating in the MV alginate formed multicellular channel-like structures. Pictures of the proliferating cell nuclei stained with DAPI and corresponding schematic drawings of the cells in the aggregates are presented in Figure 4. In the channel-like structures the cells began to proliferate first in the empty space of the alginate bead and subsequently divided in the filled channel, whereas aggregate spheroids were formed with limited free volume (Fig. 4).

Experiments with the beads formed with glass beads

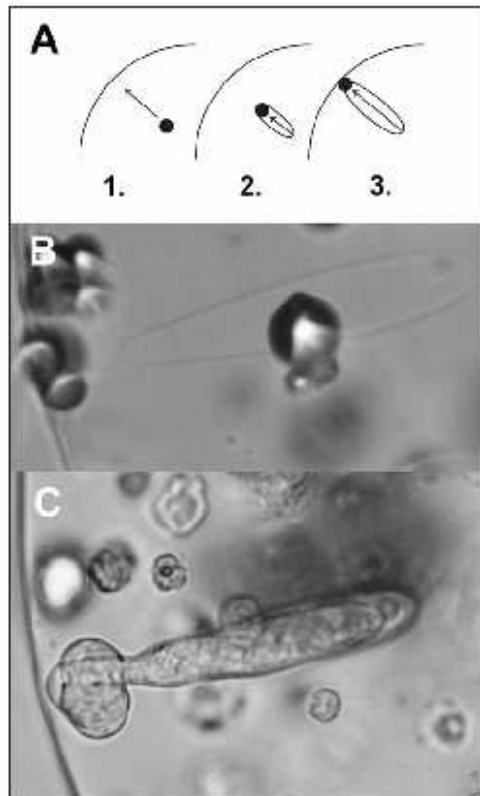


Fig. 5 - Formation of the channel in the alginate bead. A) schematic drawing of particle movement in the gelling alginate bead; B) picture of empty channel in the alginate bead formed by the glass bead of 10 µm in diameter; C) channel-like structure formed by the hepatic C3A cells grown in the channel. (Light microscopy. Objective magnification 40x).

were performed to observe whether formation of the channels in the alginate beads is related to living particles and if the particles' size influences formation of the channels. The glass beads with a diameter ranged from 10 to 50 µm were encapsulated in the alginate beads prepared from LV and MV alginates. The formation of visible channels in the alginate beads was observed mainly in MV alginate and was characteristic of the small (10-µm) glass beads (Fig. 5B).

The multicellular aggregates formed by the growing hepatic C3A cells were fixed after cultivation and released from the beads to observe their structures under SEM. The multicellular structures were observed, and detailed cell surfaces were visible. The SEM pictures indicated that human C3A hepatoma cells cultured in the alginate beads form surface modifications which function as microvilli in normal hepatocytes (Fig. 6C). The presence of the cell surface extensions was found on the spherical and channel-like structures (Fig. 6C, D).

After static cultivation for 24 hours, 7, and 14 days, the fluidized bioreactor experiments were performed. Albumin production was assessed. As shown in Figure 7, prolonged cultivation of C3A cells within the alginate beads in both types of alginates caused significant increases in albumin production. Seven days after encapsulation, albumin production rose to the level of 761 ± 102 ng/h per 10^6 cells for LV alginate, whereas after 14 days of cultivation, production of albumin by C3A cells in the fluidized bioreactor reached the value of $2,059 \pm 585$ ng/24 hours per 10^6 cells. We did not observe any differences in albumin production by C3A cells encapsulated within the alginate beads in the fluidized bioreactor, between the 2 types of alginates (LV and MV) used.

DISCUSSION

There are many types of 3-dimensional cultures of cells (13). One of the approaches to these types of culture is encapsulation of cells within alginate hydrogel (12). Using the droplet generation method, microbeads of alginate may be gelled in a bath of calcium chloride (or other divalent cations) forming 3-dimensional hydrogel structures for the cells. The advantage of such a culture system is that mass transfer between the medium and the cells within the microbeads is facilitated, and the nutrition of the cells is enhanced (14).

As previously described, hepatic cells cultured and grown in alginate 3D conditions may be used as a cellular component of a bioartificial liver device for patients suffering from liver failure. The cells in the bioreactor are expected to perform liver-specific functions (especially synthetic) with high efficiency. Improvement of the functioning of human hepatoma C3A cells may be carried out in 3D culture in alginate microbeads before bioartificial liver perfusion (4). In the clinical application of hepatoma cells, leakage of these tumor cells

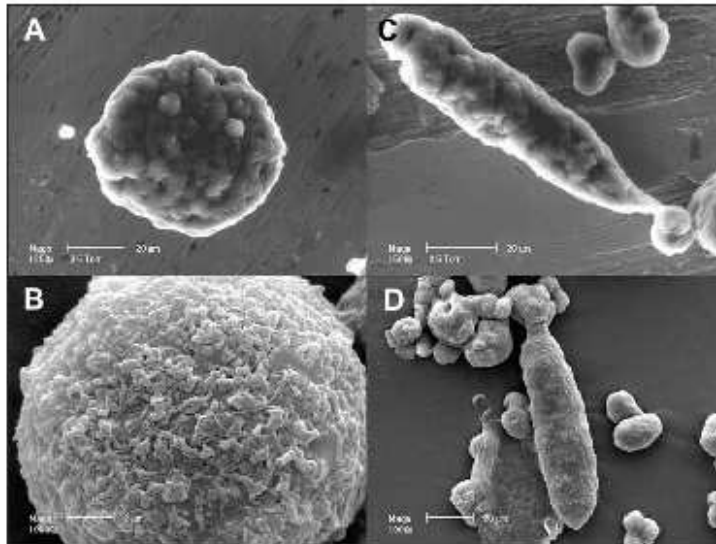


Fig. 6 - Scanning electron microscopy (SEM) pictures of 2 types of 3-dimensional structures: A, C) spherical aggregates; B, D) channel-like structures. A, B) Environmental SEM; C, D) pictures obtained after coating of the sample with gold. Extended surface microvilli-like structures are visible. (Magnification: 1000-1500x).

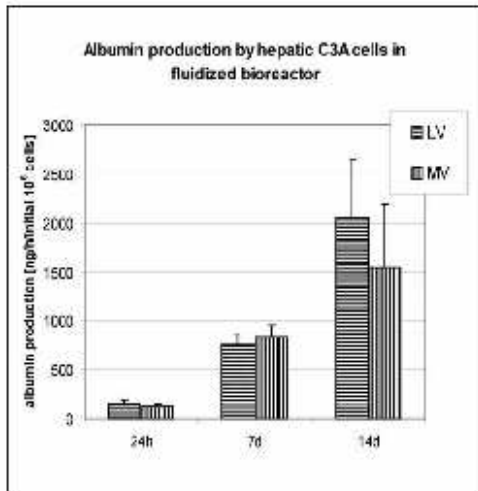


Fig. 7 - Comparison of albumin production by hepatic C3A cells in the fluidized bioreactor experiment carried out testing for 24 hours, after 1, 7, and 14 days of static culture (LV: low viscosity alginate, n=3; MV: medium viscosity alginate, n=3).

into the patient's blood remains a major concern (15).

Our experiments were performed with human hepatoma C3A cells which were encapsulated in the microbeads produced from 2 types of sodium alginate: low and medium viscosity. The experiments proved that the process and composition of the alginate microbeads that were formed influenced the type of growth of hepatic cells within the beads. Channel-like structures were characteristic for MV alginate (Fig. 3D, E, F), whereas regular spherical aggregates dominated in the LV alginate (Fig. 3A, B, C). The process of empty channel formation is caused presumably by movement of the particles (cells) during bead formation in the gellification bath (Fig. 5A). To assess the cell growth process, the cell nuclei were stained during the culture. The formation of channel-like structures was forced by the channels originated from a single particle (cell) movement (16). The empty channel facilitated multiplication of cells and formation of the elongated structure, whereas the spherical structures were formed by cells dividing in the same place with limited space for 3D structure development. The phenomenon of channel formation depends on the mannuronic to guluronic ratio and the molecular weight of the alginate (17). In our experiments with glass beads with a diameter

of 10 to 50 μm , the channels were formed only with the small diameter beads (10 μm), indicating the influence of particle size on the ability of the channel formation.

The SEM pictures taken after bead degellification indicated that the human C3A hepatic cell surfaces were undulating, and the structures formed were functioning as extensions of the surface area characteristic for differentiated epithelial cells (18). The shape of the cell surface may be influenced by the presence of the hydrogel that hampers the free movement and formation of normal microvilli. We did not observe significant differences in the cell surfaces of the aggregates in the form of spheres or the channel-like structures. The presence of surface extensions similar to microvilli, which is characteristic for differentiated cells, did not differ between the 2 types of human hepatic C3A cell aggregates, indicating that alginate type does not influence hepatic cell surface morphology.

Albumin production significantly increased over time in long-term static culture in both types of beads: those composed of LV or MV alginates. Using Student's *t*-test, no significant differences in albumin production were observed between LV and MV alginates, although a tendency to higher albumin production was observed for cells encapsulated in LV alginate. That might be caused by the molecular mass of alginate as a result of shorter polysaccharide chains.

CONCLUSIONS

Cultivation of hepatic C3A cells within alginate microbeads significantly improved bioreactor effectiveness in albumin production. Formation of 2 types of 3-dimen-

sional structures – spheroids and channel-like structures – depended on the properties of the alginate used, but did not significantly influence cell activity. The presence of extensions of cell membranes on the surfaces of the hepatoma cells in 3-dimensional culture within the alginate beads indicated formation of microvilli-like structures characteristic of normal hepatocytes. From our experiments, both types of alginates – low and medium viscosity – may be effectively used in preparation of microbeads for fluidized bed bioreactors, but static cultivation for at least 7 days is recommended before treatment.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was carried out within the framework of the Polish-French cooperation project "Polonium", PAN-CNRS cooperation and COST Action 866, and in part supported by state research grant no. 3T11E 001 28 from the Polish Ministry of Science and Higher Education.

Address for correspondence:
Andrzej Kinasiewicz, PhD
Institute of Biocybernetics and Biomedical Engineering
Polish Academy of Sciences
Trojdena 4
02-109 Warsaw, Poland
e-mail: kinas@bib.waw.pl

REFERENCES

1. Legallais C, David B, Dore E. Bioartificial livers (BAL): current technological aspects and future developments. *J Membr Sci* 2001; 181: 81-95.
2. Jasmund I, Bader A. Bioreactor developments for tissue engineering applications by the example of the bioartificial liver. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2002; 74: 99-109.
3. Legallais C, Dore E, Paullier R. Design of a fluidized bed bioartificial liver. *Artif Organs* 2000; 24: 519-25.
4. Rahman TM, Selden C, Khalil M, Diakanov I, Hodgson HJ. Alginate-encapsulated human hepatoblastoma cells in an extracorporeal perfusion system improve some systemic parameters of liver failure in a xenogenic model. *Artif Organs* 2004; 28: 476-82.
5. Selden C, Roberts E, Stamp G, Parker K, Winlove P, Ryder T, Platt H, Hodgson H. Comparison of three solid phase supports for promoting three-dimensional growth and function of human liver cell lines. *Int J Artif Organs* 1998; 22: 308-19.

6. Kinasiewicz A, Gautier A, Lewinska D, Bukowski J, Legallais C, Werynski A. Culture of C3A cells in alginate beads for fluidized bed bioartificial liver. *Transplant Proc* 2007; 39: 2911-3.
7. Dore E, Legallais C. A new concept of bioartificial liver based on a fluidized bed bioreactor. *Ther Apher* 1999; 3: 264-7.
8. Ellis AJ, Hughes RD, Wendon JA, Dunne J, Langley PG, Kelly JH, Gislason GT, Sussman NL, Williams R. Pilot-controlled trial of the extracorporeal liver assist device in acute liver failure. *Hepatology* 1996; 24: 1446-51.
9. Sussman NL, Gislason GT, Kelly JH. Extracorporeal liver support: application to fulminant hepatic failure. *J Clin Gastroenterol* 1994; 18: 320-4.
10. Sussman NL, Chong MG, Koussayer T, He DE, Shang TA, Whisenand HH, Kelly JH. Reversal of fulminant hepatic failure using an extracorporeal liver assist device. *Hepatology* 1992; 16: 60-5.
11. Lewinska D, Rosinski S, Werynski A. Influence of process conditions during impulsed electrostatic droplet formation on size distribution of hydrogel beads. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2004; 32: 41-53.
12. David B, Dufresne M, Nagel MD, Legallais C. *In vitro* assessment of encapsulated C3A hepatocytes functions in a fluidized bed bioreactor. *Biotechnol Prog* 2004; 20: 1204-12.
13. Mueller-Klieser W. Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications. *Am J Physiol* 1997; 273: C1109-23.
14. David B, Dore E, Jaffrin MY, Legallais C. Mass transfers in a fluidized bed bioreactor using alginate beads for a future bioartificial liver. *Int J Artif Organs* 2004; 27: 284-93.
15. Hul T, Rozga J, Demetriou AA. Bioartificial liver support. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2001; 8: 1-15.
16. Shirai Y, Hashimoto K, Kawahara H, Sasaki R, Hitomi K, Chiba H. Production of erythropoietin by BHK cells growing on the microcarriers trapped in alginate gel beads. *Cytotechnology* 1989; 2: 141-5.
17. Shirai Y, Hashimoto K, Irie S. Formation of effective channels in alginate gel for immobilization of anchorage-dependent animal cells. *Appl Microbiol Biotechnol* 1989; 31: 342-5.
18. Griffiths BJ, Evans PJ. Ultrastructural changes in hypothermically preserved hepatocytes. *Cryobiology* 2000; 40: 176-81.