



**HAL**  
open science

# 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.

Bertrand David

► **To cite this version:**

Bertrand David. 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.. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Technologie de Compiègne, 2002. Français. NNT: . tel-00003223

**HAL Id: tel-00003223**

**<https://theses.hal.science/tel-00003223>**

Submitted on 31 Jul 2003

**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.

**Université de Technologie de Compiègne**

**Mémoire de THESE**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE TECHNOLOGIE DE COMPIEGNE**

Discipline : Génie Biomédical

Présentée et soutenue publiquement

par

**Monsieur DAVID Bertrand**

Le 13 décembre 2002

**Titre**

**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**

---

Directeur de thèse : Melle LEGALLAIS Cécile

---

**JURY**

MME HOUSSET C.(Pr)

MME NAGEL M.D.(Pr)

M.NEUFELD R.(Pr)( Rapporteur)

M.PONCELET D.(Pr)(Rapporteur)

M.DE WEZ J-L.(Dr)







Ce travail a été effectué dans le laboratoire de Biomécanique et Génie Biomédical de l'UMR 6600 CNRS au sein de l'équipe « Procédés Membranaires et Organes Artificiels » dirigée par Michel Jaffrin. Il a été réalisé sous la responsabilité de Mademoiselle Cécile Legallais. Je la remercie ici pour son encadrement et pour toute l'attention qu'elle a montrée à mon égard durant ce travail de thèse.

Je suis très honoré de la présence de Monsieur Denis Poncelet dans ce jury. Qu'il accepte ma reconnaissance pour l'intérêt qu'il a montré à ce travail en acceptant de juger ce rapport. Je le remercie pour les discussions enrichissantes que nous avons eues à ce propos.

Je remercie Monsieur Ronald Neufeld pour l'attention qu'il a accordé à ce travail et pour avoir accepté d'assurer le rôle de rapporteur.

Je suis reconnaissant à Madame Marie-Danielle Nagel pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant de présider ce jury de thèse et pour son soutien dans notre collaboration à ce vaste projet.

Que Madame Chantal Housset reçoive ici mes remerciements pour sa présence dans ce jury et le vif intérêt qu'elle a montré pour ce travail de thèse.

Je remercie vivement Jean-Luc De Wez pour sa participation à ce jury et pour ses remarques pertinentes.



Aujourd'hui, la transplantation est le seul traitement efficace proposé aux patients souffrant d'une insuffisance hépatique aiguë ou fulminante. La pénurie actuelle de greffons se traduit par un taux de mortalité élevé chez les patients en attente urgente d'un organe. La nécessité de disposer d'un système de suppléance hépatique transitoire apparaît donc primordiale. Un organe bioartificiel exploitant les performances potentielles de cellules (hépatocytes dans le cas d'un foie bioartificiel) permettrait de suppléer le large éventail de ses fonctions métaboliques. Notre équipe propose le concept d'un bioréacteur à lit fluidisé contenant des hépatocytes, issus de la lignée cellulaire humaine C3a, immobilisés dans des billes d'alginate.

Dans ce travail l'objectif a été d'analyser le fonctionnement du système de suppléance hépatique extracorporel par la mise en place d'un modèle *in vitro* se rapprochant au mieux de la situation *in vivo*. La présence de cellules au sein des billes d'alginate n'a pas d'influence sur le comportement global du lit fluidisé alors que l'emploi de plasma, de masse volumique proche des billes, peut engendrer une instabilité. Ensuite, l'organisation, la viabilité et les fonctionnalités (synthèse d'albumine, production d'urée et capacité d'élimination de l'ammoniac) des hépatocytes à l'intérieur des billes d'alginate ont été étudiés en conditions statiques et dynamiques. Dans le bioréacteur, les hépatocytes gardent leurs pleines potentialités. Pour l'urée, l'encapsulation semble améliorer le métabolisme. Il apparaît que la sortie de l'albumine des billes est améliorée par la fluidisation. Enfin, nous avons montré que les contraintes dans le bioréacteur ne provoquent qu'une faible altération des propriétés mécaniques des billes après 6 heures d'utilisation.

Au vu des fonctions métaboliques assumées par les hépatocytes C3a encapsulés dans des billes d'alginate, l'emploi de ce dispositif en vue d'une suppléance hépatique pourra être envisagé.



Today, transplantation is the only effective treatment proposed to the patients suffering from fulminant or acute hepatic failure. There is a shortage of donors worldwide resulting in high mortality rate amongst patients awaiting transplants. Hence providing a hepatic replacement device seems original. A bioartificial organ exploiting the potential performances of cells (hepatocytes in the case of a bioartificial liver) would supply the wide range of its metabolic functions. Our team proposes the concept of a fluidized bed bioreactor containing hepatocytes, stemming from the C3a human cell line, immobilized in alginate beads.

The purpose of this study is to assess performances of the extra corporeal hepatic substitution device by the implementation of an *in vitro* model as close as possible to the *in vivo* situation. The presence of cells within the alginate beads has no influence on the global behavior of the fluidized bed while the use of plasma (density close to beads) can engender instability. Then, the organization, the viability and the features of hepatocytes (albumin synthesis, urea production and capacity of ammonia removal) inside the alginate beads were studied in static and dynamic conditions. In the bioreactor, hepatocytes keep their full potentialities. In the case of urea, the encapsulation seems to advance metabolism. With albumin, fluidization seems to slightly enhance the mass transfer between the encapsulated cells and the culture medium. Finally, we showed that constraints in the bioreactor only resulted in a weak alteration of the mechanical properties of beads after 6 hours of use.

The use of C3a hepatocytes encapsulated into alginate beads seems thus promising for the purpose of liver supply.



# SOMMAIRE

---



|   |           |
|---|-----------|
| <b>INTRODUCTION.....</b>  | <b>19</b> |
| <b>CHAPITRE I : BIBLIOGRAPHIE .....</b>                                 | <b>25</b> |
| <b>1.SUPPLEANCE HEPATIQUE .....</b>                                     | <b>27</b> |
| 1.1.LE FOIE.....  | 27        |
| 1.1.1.Présentation anatomique.....                                      | 27        |
| 1.1.2.Aspects cellulaires.....  | 29        |
| 1.1.2.1.Généralités.....  | 29        |
| 1.1.2.2.L'hépatocyte.....   | 30        |
| 1.1.3.Fonctions hépatobiliaires.....                                    | 31        |
| 1.1.4.La capacité de régénération du foie.....                          | 33        |
| 1.2.LES PATHOLOGIES HEPATIQUES .....                                    | 34        |
| 1.2.1.Approche clinique de la maladie hépatique.....                    | 34        |
| 1.2.1.1.L'ictère ou jaunisse .....                                      | 35        |
| 1.2.1.2.Hépatite virale aiguë.....                                      | 35        |
| 1.2.1.3.Hépatite fulminante.....  | 36        |
| 1.2.1.4.Hépatite chronique .....  | 37        |
| 1.2.1.5.Cirrhose du foie.....   | 37        |
| 1.2.1.6.Cholestase .....  | 37        |
| 1.2.2.Traitement de l'insuffisance hépatique aiguë voir fulminante..... | 38        |
| 1.3.LES SYSTEMES DE SUPPLEANCE HEPATIQUE.....                           | 38        |
| 1.3.1.Les systèmes artificiels.....                                     | 39        |
| 1.3.2.Les systèmes bioartificiels.....                                  | 40        |
| 1.3.2.1.Historique.....   | 41        |
| 1.3.2.2.Les foies bioartificiels basés sur la macroencapsulation .....  | 41        |
| 1.3.2.3.Les foies bioartificiels basés sur la microencapsulation.....   | 44        |
| <b>2.BIOENCAPSULATION : EVALUATION DES PROPRIETES DE LA BILLE .....</b> | <b>46</b> |
| 2.1.LA PERMEABILITE DE LA MEMBRANE POUR LES ECHANGES .....              | 47        |
| 2.2.LA CAPACITE DE PROTECTION VIS A VIS DU SYSTEME IMMUNITAIRE.....     | 48        |
| 2.3.LES PROPRIETES MECANIQUES .....                                     | 51        |
| 2.3.1.Généralités.....  | 51        |
| 2.3.2.Test de compression.....  | 52        |
| 2.3.3.Caractérisation du matériau.....                                  | 53        |
| 2.4.LA BIOCOMPATIBILITE DU MATERIAU .....                               | 54        |
| 2.4.1.Définitions.....  | 54        |
| 2.4.2.Les méthodes d'évaluation d'un biomatériau .....                  | 55        |
| 2.4.2.1.in vitro.....   | 55        |
| 2.4.2.2.in vivo .....   | 56        |
| 2.5.MICROENCAPSULATION DE CELLULES .....                                | 56        |
| 2.5.1.Choix du biomatériau formant la bille.....                        | 56        |
| 2.5.1.1.Définition .....  | 56        |
| 2.5.2.L'alginate.....   | 57        |
| 2.5.2.1.Généralités.....  | 57        |
| 2.5.2.2.Présentation biochimique .....                                  | 58        |
| 2.5.2.3.Réticulation de l'alginate .....                                | 59        |
| 2.5.2.4.Propriétés du gel alginate.....                                 | 60        |
| 2.5.3.Méthode de production de billes.....                              | 62        |
| 2.5.3.1.L'extrusion.....  | 62        |
| 2.5.3.2.L'émulsification .....  | 63        |
| <b>3.LE BIOREACTEUR A LIT FLUIDISE .....</b>                            | <b>64</b> |
| 3.1.DEFINITION DU LIT FLUIDISE.....                                     | 64        |
| 3.2.LE FOIE BIOARTIFICIEL A LIT FLUIDISE : ETAT DE L'ART .....          | 65        |
| <b>4.ETUDE DU METABOLISME DE CELLULES ENCAPSULEES .....</b>             | <b>67</b> |
| 4.1.CHOIX DU TYPE DE CELLULES .....                                     | 67        |
| 4.1.1.Les différents types cellulaires étudiés dans la littérature..... | 67        |

|  |           |
|--|-----------|
| 4.1.1.1. Les hépatocytes d'origine animale .....   | 67        |
| 4.1.1.2. Les hépatocytes d'origine humaine .....   | 68        |
| 4.1.2. La lignée C3a .....   | 69        |
| 4.2. EVALUATION DES PERFORMANCES D'UN FOIE BIOARTIFICIEL .....                                 | 70        |
| 4.2.1. En conditions « cliniques » .....   | 70        |
| 4.2.2. En conditions « expérimentales » .....  | 70        |
| 4.3. MARQUEURS DE L'ACTIVITE METABOLIQUE .....   | 72        |
| 4.3.1. Détoxication hépatique .....  | 72        |
| 4.3.2. Le métabolisme protidique .....   | 72        |
| 4.3.3. Produits d'élimination du métabolisme azoté .....                                       | 74        |
| 4.3.3.1. L'urée .....  | 74        |
| 4.3.3.2. L'ammoniac .....  | 74        |
| 4.3.4. Le métabolisme des lipides .....  | 75        |
| 4.3.5. Le métabolisme glucidique .....   | 76        |
| <b>CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES .....</b>   | <b>77</b> |
| <b>1. PROTOCOLE DE PRODUCTION DE BILLES D'ALGINATE SANS CELLULES .....</b>                     | <b>79</b> |
| <b>2. CULTURE D'HEPATOCYTES C<sub>3</sub>A .....</b>   | <b>80</b> |
| <b>3. PROTOCOLE DE BIOENCAPSULATION .....</b>  | <b>81</b> |
| 3.1. DISSOCIATION DES CELLULES .....   | 81        |
| 3.2. PREPARATION DU MELANGE ALGINATE-HEPATOCYTES .....   | 82        |
| 3.3. COULAGE DES BILLES .....  | 82        |
| 3.4. EVALUATION DU NOMBRE DE CELLULES ET DE LEUR VIABILITE .....                               | 83        |
| <b>4. CONTROLE DE LA QUALITE DES BILLES PRODUITES .....</b>                                    | <b>84</b> |
| 4.1. HOMOGENEITE DES LOTS DE BILLES PRODUITES .....  | 84        |
| <b>5. MORPHOLOGIE DES HEPATOCYTES ENCAPSULES PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE .....</b> | <b>84</b> |
| <b>6. MONTAGE EXPERIMENTAL « FOIE BIOARTIFICIEL » .....</b>                                    | <b>85</b> |
| 6.1. LES BIOREACTEURS A LIT FLUIDISE .....   | 85        |
| 6.1.1. Le bioréacteur taille 1 .....   | 85        |
| 6.1.2. Le bioréacteur taille ¼ .....   | 86        |
| 6.2. COMPORTEMENT DES BILLES EN LIT FLUIDISE .....   | 87        |
| 6.2.1. Caractérisation des phases .....  | 87        |
| 6.2.1.1. détermination expérimentale de la porosité initiale du lit tassé .....                | 87        |
| 6.2.1.2. Mesure de la porosité du lit fluidisé de billes .....                                 | 88        |
| 6.2.1.3. Mesure de la viscosité et de la masse volumique des phases employées .....            | 88        |
| 6.2.2. Fluide de perfusion .....   | 89        |
| 6.2.2.1. Solution physiologique .....  | 89        |
| 6.2.2.2. Milieu de culture complet (MEM SVF 10%) .....   | 90        |
| 6.2.2.3. Sérum de veau fœtal (SVF) .....   | 90        |
| 6.2.3. Effet de la présence de cellules dans les billes .....                                  | 90        |
| 6.3. ETUDE DES TRANSFERTS DE MASSE .....   | 92        |
| <b>7. ETUDE DU METABOLISME DES CELLULES ENCAPSULEES .....</b>                                  | <b>93</b> |
| 7.1. A. TROIS TYPES DE MISE EN CULTURE .....   | 94        |
| 7.1. B. ELIMINATION D'AMMONIAC PAR LES HEPATOCYTES C <sub>3</sub> A .....                      | 96        |
| 7.2. EXPLOITATION DES DOSAGES .....  | 96        |
| 7.3. PROTOCOLES DE DOSAGES DES MARQUEURS DE L'ACTIVITE METABOLIQUE .....                       | 98        |
| 7.3.1. Protéines totales .....   | 99        |
| 7.3.1.1. méthode de dosage .....   | 99        |
| 7.3.1.2. Protocole de dosage .....   | 99        |
| 7.3.2. Albumine .....  | 100       |
| 7.3.2.1. Principe et méthode de dosage .....   | 100       |
| 7.3.2.2. Protocole de dosage .....   | 100       |

|   |            |
|---|------------|
| 7.3.3. Urée.....  | 102        |
| 7.3.3.1 Principe et méthode de dosage .....   | 102        |
| 7.3.3.2. Protocole de dosage.....   | 103        |
| 7.3.4. Ammoniac.....  | 103        |
| 7.3.4.1. Principe et méthode de dosage .....  | 104        |
| 7.3.4.2. Protocole de dosage.....   | 104        |
| <b>8. ETUDE DES PROPRIETES MECANQUES DES BILLES D'ALGINATE .....</b>  | <b>105</b> |
| 8.1. BANC EXPERIMENTAL DE CHARGEMENT-DECHARGEMENT (COMPRESSION).....  | 105        |
| 8.2. DESCRIPTION DES MANIPULATIONS REALISEES .....  | 106        |
| 8.2.1. Les mesures préliminaires.....   | 107        |
| 8.2.2. Caractérisation du matériau .....  | 107        |
| 8.2.2.1. Test de chargement.....  | 107        |
| 8.2.2.2. Test de fatigue.....   | 108        |
| 8.2.3. Caractéristiques mécaniques de la bille d'alginate en lit fluidisé.....  | 108        |
| 8.3. INTERPRETATION DES COURBES FORCE DEPLACEMENT .....   | 109        |
| 8.3.1. Description des étapes de l'analyse des essais de compression.....   | 109        |
| 8.4. LES SOURCES D'ERREUR POUR L'EXPLOITATION DES RESULTATS .....   | 111        |
| 8.4.1. Mesure du rayon initial.....   | 111        |
| 8.4.2. Imprécision sur la mesure de la force et du déplacement .....  | 111        |
| <b>CHAPITRE III : CONCEPTION D'UN GENERATEUR DE BILLES D'ALGINATE.....</b>  | <b>113</b> |
| <b>CONCEPTION ET DEVELOPPEMENT .....</b>  | <b>115</b> |
| 1. INTRODUCTION .....   | 115        |
| 2. LES DIFFERENTS GENERATEURS DE BILLES D'ALGINATE BASES SUR L'EXTRUSION.....   | 115        |
| 2.1. Générateur basé sur le principe « flux d'air coaxial » .....   | 116        |
| 2.2. Générateur basé sur le principe dit de « force électrostatique » .....   | 116        |
| 2.3. Générateur basé sur le principe dit de « vibration » .....   | 117        |
| 2.4. Générateur de billes basé sur le principe dit de « rupture de jet ».....   | 118        |
| 2.5. Conclusion .....   | 119        |
| 3. CONCEPTION ET DEVELOPPEMENT.....   | 120        |
| 3.1. Premier prototype de production de billes d'alginate.....  | 120        |
| 3.1.1. Variation du diamètre de la bille en fonction du flux d'air coaxial.....   | 121        |
| 3.1.2. Limites du premier prototype.....  | 122        |
| 3.2. Second prototype de production de billes d'alginate.....   | 122        |
| 4. CONTROLE DE LA QUALITE DES BILLES PRODUITES .....  | 124        |
| 4.1. Homogénéité des lots de billes produites.....  | 124        |
| 5. CONCLUSION .....   | 127        |
| <b>CHAPITRE IV : ETUDE DU COMPORTEMENT EN LIT FLUIDISE DES BILLES D'ALGINATE ET DES TRANSFERTS DE MATIERE DANS LE BIOREACTEUR .....</b> | <b>129</b> |
| <b>GLOSSAIRE .....</b>  | <b>131</b> |
| <b>PARTIE I : COMPORTEMENT EN LIT FLUIDISE DES BILLES D'ALGINATE DANS LE BIOREACTEUR.....</b>   | <b>133</b> |
| 1. INTRODUCTION .....   | 133        |
| 2. LES DIFFERENTS REGIMES DE FLUIDISATION .....   | 134        |
| 3. LA FLUIDISATION HOMOGENE .....   | 137        |
| 3.1. Vitesse terminale de chute.....  | 139        |
| 3.2. Vitesse minimale de fluidisation.....  | 141        |
| 4. LES PRINCIPAUX MODELES D'ESTIMATION DE LA POROSITE EN FONCTION DE LA VITESSE D'ENTREE DU FLUIDE .....                                | 142        |
| 4.1. Modèles empiriques .....   | 142        |
| 4.2. Modèle semi-empirique.....   | 145        |
| 4.3. Modèle théorique .....   | 146        |
| 5. RESULTATS EXPERIMENTAUX .....  | 147        |
| 5.1. Caractérisation des phases .....   | 147        |
| 5.2. Evolution de la hauteur du lit de billes dans du milieu de culture.....  | 148        |

|   |            |
|---|------------|
| 5.2.1. Avec des billes d'alginate "vides".....  | 148        |
| 5.2.2. Avec des billes d'alginate hébergeant des cellules.....  | 149        |
| 5.3. Evolution de la hauteur du lit dans du sérum de veau fœtal (SVF).....  | 151        |
| 6. COMMENTAIRES ET ANALYSES.....  | 152        |
| 6.1. Evolution du modèle <i>in vitro</i> .....  | 152        |
| 6.2. Comparaison avec les modèles de la littérature.....  | 154        |
| 6.3. Redimensionnement.....   | 159        |
| 7. CONCLUSION.....  | 161        |
| <b>PARTIE II : ETUDE DES TRANSFERTS DE MATIERE EN FONCTION DU SOLUTE DANS DU PLASMA.....</b>  | <b>162</b> |
| 1. INTRODUCTION.....  | 162        |
| 2. TRANSFERTS DE MASSE POUR LA VITAMINE B <sub>12</sub> .....   | 162        |
| 3. TRANSFERTS DE MASSE POUR DU CYTOCHROME C.....  | 164        |
| 4. COMMENTAIRES ET ANALYSE.....   | 165        |
| 4.1. Etude de l'adsorption éventuelle de la vitamine B 12 et du Cytochrome C sur les billes.....  | 165        |
| 4.2. Calcul du coefficient de transfert de masse global dans le lit fluidisé.....   | 168        |
| 5. CONCLUSIONS.....   | 170        |
| <b>CONCLUSION CHAPITRE IV.....</b>  | <b>171</b> |
| <b>CHAPITRE V : ETUDE DE LA MORPHOLOGIE ET DE L'ACTIVITE METABOLIQUE DES HEPATOCYTES, ENCAPSULES OU SUR FOND DE BOITE DE CULTURE.....</b> | <b>173</b> |
| <b>AVANT PROPOS.....</b>  | <b>175</b> |
| <b>PARTIE I : ETUDE DE LA MORPHOLOGIE DES HEPATOCYTES ENCAPSULES PAR MEB.....</b>   | <b>177</b> |
| 1. INTRODUCTION.....  | 177        |
| 2. STRUCTURE D'UNE BILLE D'ALGINATE (CONCENTRATION DU GEL 2,2%) EN MEB.....   | 177        |
| 3. ETUDE DE LA MORPHOLOGIE DES HEPATOCYTES C3A SUR FOND DE BOITE DE CULTURE EN ESEM.....  | 178        |
| 4. ETUDE DE LA MORPHOLOGIE DES CELLULES C3A IMMOBILISEES DANS UNE BILLE D'ALGINATE (MEB).....   | 179        |
| 5. COMMENTAIRES ET ANALYSES.....  | 180        |
| 6. CONCLUSION.....  | 182        |
| <b>PARTIE II : ETUDE DE L'ACTIVITE METABOLIQUE DES HEPATOCYTES.....</b>   | <b>183</b> |
| 1. INTRODUCTION.....  | 183        |
| 2. EVALUATION DU FOIE BIOARTIFICIEL EN CONDITIONS EXPERIMENTALES <i>IN VITRO</i> .....  | 184        |
| 2.1. Sécrétion de protéines par les hépatocytes C3a.....  | 185        |
| 2.2. Sécrétion d'albumine par les hépatocytes C3a.....  | 186        |
| 2.3. Sécrétion d'urée par les hépatocytes C3a.....  | 187        |
| 2.4. Sécrétion d'ammoniac par les hépatocytes C3a.....  | 188        |
| 2.5. Elimination d'ammoniac par les hépatocytes C3a.....  | 189        |
| 2.6. Evolution du pH au sein du bioréacteur.....  | 190        |
| 3. COMMENTAIRES ET ANALYSES.....  | 191        |
| 5. CONCLUSION CHAPITRE V.....   | 199        |
| <b>CHAPITRE VI : ETUDE DES PROPRIETES MECANQUES DE LA BILLE D'ALGINATE.....</b>   | <b>201</b> |
| <b>AVANT PROPOS.....</b>  | <b>203</b> |
| <b>PARTIE I : CARACTERISATION DU MATERIAU.....</b>  | <b>205</b> |
| 1. INTRODUCTION.....  | 205        |
| 2. TEST DE CHARGEMENT.....  | 205        |
| 3. TEST DE FATIGUE.....   | 206        |
| 4. INFLUENCE DU DIAMETRE DES BILLES.....  | 208        |
| 5. INFLUENCE DU TEMPS DE RETICULATION.....  | 209        |
| 6. EVALUATION DU MODULE DE HERTZ.....   | 210        |
| 7. COMMENTAIRES ET ANALYSES.....  | 212        |

|  |            |
|--|------------|
| <b>PARTIE II : ETUDE DES CARACTERISTIQUES MECANIQUES DE LA BILLE D'ALGINATE EN LIT FLUIDISE.....</b> | <b>214</b> |
| 1.INTRODUCTION .....   | 214        |
| 2.DANS DU SERUM PHYSIOLOGIQUE.....   | 214        |
| 2.1. <i>Billes vides</i> .....   | 215        |
| 2.2. <i>Billes pleines</i> .....   | 216        |
| 3.DANS DU MILIEU COMPLET (MEM SVF 10%) .....   | 217        |
| 3.1. <i>Billes vides</i> .....   | 217        |
| 3.2. <i>Billes pleines</i> .....   | 218        |
| 4.DANS DU SERUM DE VEAU FETAL .....  | 219        |
| 4.1. <i>Billes vides</i> .....   | 219        |
| 4.2. <i>Billes pleines</i> .....   | 220        |
| 5.COMMENTAIRES ET ANALYSES.....  | 221        |
| 5.1. <i>Module de Hertz</i> .....  | 221        |
| 5.2. <i>Critère géométrique</i> .....  | 223        |
| 6.CONCLUSION CHAPITRE VI.....  | 228        |
| <b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....</b>  | <b>231</b> |
| <b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>  | <b>237</b> |
| <b>ANNEXES .....</b>   | <b>255</b> |



# INTRODUCTION

---



La perte des fonctions cellulaires hépatiques conduit à l'interruption de nombreuses fonctions métaboliques indispensables. Le pronostic vital est alors très réservé. Aujourd'hui, la transplantation hépatique est le seul traitement efficace proposé aux patients souffrant d'une insuffisance hépatique aiguë ou fulminante. La pénurie actuelle de greffons se traduit par un taux de mortalité élevé chez les patients en attente urgente d'un organe. De plus, à ces décès directement causés par l'hépatite fulminante, il faut adjoindre ceux dûs aux lésions cérébrales souvent irréversibles : si la régénération hépatique, théoriquement possible, ne se produit pas assez rapidement, elle entraîne des lésions du système nerveux par une accumulation de toxines normalement éliminées par les processus de détoxification assurés par le foie (encéphalopathie). La nécessité de disposer d'un système de suppléance hépatique transitoire apparaît donc primordiale. Celui-ci devrait permettre d'amener le patient vers la greffe ou l'aider à retrouver un organe sain.

Depuis 20 ans, plusieurs dispositifs ont été proposés. On peut les scinder en 2 catégories : les organes purement artificiels basés sur des méthodes classiques comme l'hémodialyse ou la plasmaphérèse, et les organes bioartificiels. Le foie assurant de multiples et complexes fonctions (détoxification, transformations, synthèses), il est évident que des principes purement mécaniques ou chimiques ne sont pas adaptés à sa suppléance complète.

En revanche, un organe bioartificiel exploitant les performances potentielles de cellules (hépatocytes dans le cas d'un foie bioartificiel) permettrait de suppléer le large éventail de fonctions métaboliques. Les principaux obstacles à la réalisation d'un système de suppléance sont de disposer d'un matériel cellulaire suffisant, d'un environnement matriciel permettant la survie de ces cellules et enfin d'une enceinte biocompatible, c'est à dire ne provoquant pas, notamment, l'activation des défenses immunitaires du patient. Plusieurs sources d'hépatocytes sont disponibles tels que les hépatocytes porcins et les lignées continues humaines. La plupart des systèmes de foie bioartificiels développés repose sur l'utilisation de fibres creuses pour héberger les cellules et assurer une barrière immunologique.

Notre équipe au sein de l'UMR CNRS 6600 Biomécanique et Génie Biomédical, Université de Technologie de Compiègne), en collaboration avec l'unité INSERM U 456 « Détoxification et réparation tissulaire » de Rennes, a proposé un concept original d'un bioréacteur contenant des hépatocytes immobilisés dans des billes d'alginate. Le support est

l'alginate, biopolymère, qui encapsule les hépatocytes sous forme de billes sans pour autant interdire les échanges entre l'intérieur et le milieu environnant. Le confinement et le déplacement permanent des billes dans un bioréacteur à lit fluidisé doit favoriser les échanges entre intérieur et extérieur des billes.

La faisabilité de ce concept a été précédemment évaluée *in vitro* au sein de notre équipe, avec des billes d'alginate sans cellules et du sérum physiologique comme fluide de perfusion. Dans cette configuration, le comportement du lit de billes soumis au flux ascendant de fluide, ainsi que les transferts de masse de solutés modèles avaient été caractérisés.

L'unité INSERM de Rennes qui a mis au point un modèle d'insuffisance hépatique porcine a évalué ce système *in vivo*. Des différences de comportement ont été mises en évidence par rapport à l'étude *in vitro*. Cependant, sur des critères médicaux (stabilisation de la pression intracrânienne et de l'ammoniémie), le concept semble montrer des résultats encourageants pour la suppléance hépatique transitoire.

Dans le cadre de l'application animale, nous avons constaté l'impossibilité de caractériser les performances intrinsèques du bioréacteur, qui se trouve inclus dans une circulation extracorporelle complexe.

Pour une application chez l'homme, un bioréacteur à lit fluidisé contenant environ 400 ml de billes, doit fonctionner pendant une période minimale de 6 heures. Pour prouver l'efficacité de notre dispositif, il est alors apparu indispensable de disposer au laboratoire d'un modèle *in vitro* de foie bioartificiel, aussi proche que possible des conditions cliniques et permettant le suivi de nombreux paramètres. Cette approche a nécessité de mettre en place de nouvelles compétences en terme de culture de cellules de lignée cellulaire d'hépatocytes humains C3a, d'encapsulation de ces cellules, d'évaluation de leur fonctions, et enfin d'analyse des propriétés mécaniques des billes ainsi formées.

Ces travaux ont pu être menés à bien grâce à une collaboration avec l'équipe du professeur M.D.Nagel, et ont été reconnus comme un projet horizontal au sein de notre UMR. Ce mémoire s'articule autour de 6 chapitres relatant la validation du foie bioartificiel à lit fluidisé. Dans un premier temps, une étude bibliographique est menée sur les différents éléments constituant les systèmes de suppléance hépatique bioartificiels et sur la

bioencapsulation dans le but d'en tirer des enseignements. Dans un second temps, les méthodologies mises en œuvre pour cette étude sont décrites. Les chapitres 3 à 6 présentent les résultats obtenus. Le premier porte sur la conception d'un générateur de bille d'alginate permettant de disposer au laboratoire d'hépatocytes encapsulés. Le chapitre 4 a pour but de présenter l'étude du comportement en lit fluidisé des billes d'alginate dans différents fluides de perfusion et des transferts de matière dans du plasma au sein du bioréacteur. Le chapitre 5 porte sur l'étude de la morphologie et de l'activité métabolique des hépatocytes encapsulés. Enfin, le chapitre 6 présente l'étude de l'altération éventuelle des propriétés mécaniques de la bille d'alginate en lit fluidisé, à l'aide d'un banc de mesure initialement mis au point pour d'autres applications par l'équipe du professeur D. Barthès-Biesel.



# Chapitre I : Bibliographie

---



# 1. Suppléance hépatique

Avant de traiter des systèmes de suppléance, il nous semble nécessaire de présenter l'organe et ses fonctions, puis les pathologies qu'il peut rencontrer et enfin les traitements proposés actuellement pour l'insuffisance hépatique.

Si certains aspects peuvent paraître triviaux ou simplifiés aux spécialistes, ces notions nous semblent utiles à aborder pour des lecteurs du domaine du Génie Biomédical.

## 1.1. Le Foie

### 1.1.1. Présentation anatomique

Le foie est un organe abdominal traversé par le sang issu de l'intestin. Il est de couleur rouge brun, de consistance ferme mais très fragile (Figure 1). Son poids moyen est de 2 kg (vide de sang), ce chiffre étant très variable. Il mesure de 28 à 30 cm transversalement, 16 cm d'avant en arrière et 8 cm de haut en bas. Il est moulé sur les parois de l'abdomen. Sa moitié droite est arrondie, volumineuse et sa partie gauche est mince et effilée. Il occupe la partie antérieure de la cavité abdominale, immédiatement au contact du diaphragme. Il est relié au duodénum par un ou plusieurs canaux hépatiques excréant la bile (2).

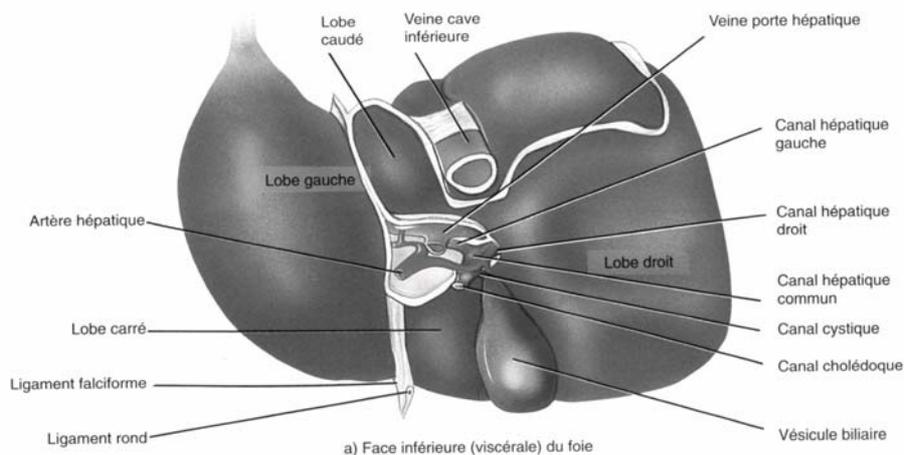
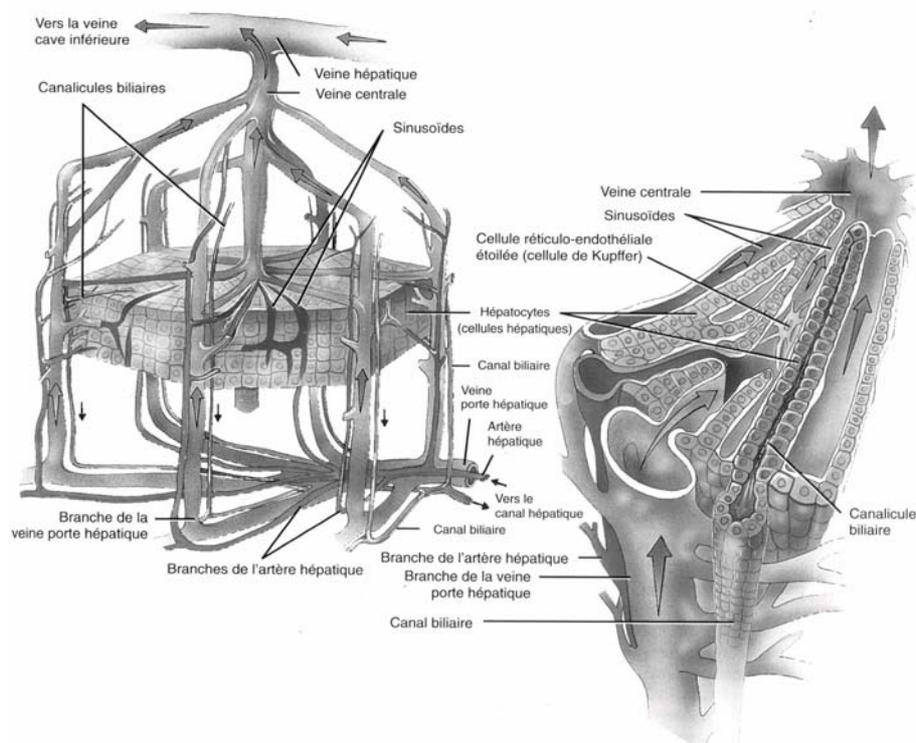


Figure 1 : Description anatomique du foie (3)

Sur le plan anatomique, il est formé de deux lobes principaux, le droit et le gauche, séparés par un ligament rond et falciforme, et de deux petits lobes, le lobe caudé, situé à la face postérieure, et le lobe carré, situé à la face inférieure. Sur le plan fonctionnel, le foie est divisé en huit segments correspondant à la distribution des veines porte et hépatique. Chaque segment reçoit un pédicule de la veine porte et hépatique. Le lobe caudé diffère des autres segments en ce qu'il est irrigué par les branches droite et gauche de la veine porte, et qu'il se draine directement dans la veine cave inférieure.

Du point de vue microscopique, le foie consiste en une myriade d'unités fonctionnelles individuelles, traditionnellement appelées lobules (Figure 2). Chacun est limité par quatre ou cinq espaces portes (irrigués par la veine porte et l'artère hépatique) et possède une veinule hépatique terminale centrale (veine centrale du lobule hépatique ou veine centrolobulaire).



**Figure 2 : Description anatomique du lobule hépatique (3)**

L'apport sanguin au foie est double. La veine porte draine la circulation splanchnique (réseau de vaisseaux sanguins qui dessert le système digestif) et fournit 75 % du débit sanguin

total (1500 mL/min). L'artère hépatique apporte les 25 % restants. Des petites branches de chaque vaisseau (la veinule portale terminale et l'artériole hépatique terminale) pénètrent dans l'acinus au niveau de l'espace porte. Puis le sang circule dans les sinusoides entre les lames d'hépatocytes vers la veinule hépatique terminale où le sang de plusieurs acini adjacents se rejoint. La paroi sinusoidale est fenêtrée; cette porosité permet aux nutriments d'atteindre l'espace de Disse intermédiaire et, de là, l'hépatocyte. Les veinules hépatiques terminales convergent pour former les veines sus-hépatiques qui transportent tout le sang efférent vers la veine cave inférieure. Un vaste réseau de vaisseaux lymphatiques draine également le foie.

Cette description anatomique met en évidence la complexité de l'organe à travers son organisation spatiale et la richesse de sa vascularisation. Il est important de souligner que les besoins en oxygène de cet organe sont élevés. Ces paramètres doivent être pris en compte lors de la définition des différents éléments nécessaires à l'élaboration d'un foie bioartificiel.

## **1.1.2.Aspects cellulaires**

### **1.1.2.1.GENERALITES**

Les hépatocytes constituent le type cellulaire le plus important de l'organe (70 % en nombre et 60 % en volume). Ils sont disposés en lames qui irradient de chaque espace porte vers les veines centrales adjacentes.

Les canalicules biliaires (Figure 2) sont constitués de sillons ménagés entre les faces accolées d'hépatocytes adjacents. La bile est sécrétée dans ces canalicules et se déverse progressivement dans les ductules, les conduits biliaires interlobulaires et enfin les canaux hépatiques plus gros. En dehors du sillon transverse du foie, les branches hépatiques droite et gauche se fusionnent au canal hépatique commun, lequel rejoint le canal cystique drainant la vésicule biliaire pour former le canal cholédoque qui s'ouvre dans le duodénum.

Les cellules de la paroi des capillaires sinusoides sont de quatre types : cellules endothéliales, cellules de Kupffer, cellules périnusoidales riches en graisses et cellules à granulation. Les cellules endothéliales du sinusoides diffèrent de celles des autres

endothéliums vasculaires de l'organisme en ce qu'elles n'ont pas de membrane basale et sont fenêtrées, assurant aux hépatocytes un accès facile aux nutriments et aux macromolécules du plasma. Les cellules endothéliales interviennent aussi dans l'endocytose, c'est à dire le phénomène par lequel les cellules captent puis internalisent des molécules et des particules, et dans le métabolisme des lipoprotéines.

Des interactions coordonnées et réciproques existent entre les différentes populations d'hépatocytes pour le maintien du glucose, de l'ammoniac et du bicarbonate afin d'assurer l'homéostasie.

Si les nombreuses fonctions du foie sont remplies principalement par les hépatocytes, il ne faut cependant pas négliger les autres populations cellulaires comme les cellules de Kupffer qui jouent un rôle dans le système immunitaire. Il convient donc de décider quelles fonctions doivent être prises en charge par le système de suppléance hépatique bioartificiel. Les capacités de biosynthèse et de détoxification sont sans doute les plus importantes. En cela, l'utilisation des hépatocytes s'impose pour la conception d'un foie bioartificiel.

### 1.1.2.2.L'HEPATOCYTE

L'hépatocyte est de nature épithéliale. Les épithéliums sont des structures polaires. Une cellule polarisée est une cellule dont la membrane plasmique est organisée en deux régions, l'une apicale et l'autre basale, ayant des propriétés bien distinctes. Le système de liaison entre cellules grâce aux jonctions serrées leur est également spécifique. Leur noyau est volumineux, nucléolé. Certaines cellules sont binucléées.

Leur membrane plasmique comporte 3 domaines :

**Le domaine apical** (ou canaliculaire), hautement spécialisé, est riche en microvillosités et représente 10 – 15 % de la surface membranaire totale de l'hépatocyte. Les canalicules biliaires sont formés par des dépressions de deux hépatocytes voisins unis par des jonctions de type « zonula occludens » empêchant le passage de la bile dans les espaces intercellulaires. Ces jonctions serrées sont complétées par des « zonula adherens », des jonctions communicantes et des desmosomes. La lumière des canalicules biliaires, de 0,5 à

1,5 micromètres de diamètre, contient des microvillosités d'origine hépatocytaire. Au niveau des canalicules biliaires, la composition de la membrane plasmique hépatocytaire est différente du reste de la cellule (abondance de l'acide sialique, rapports cholestérol /phospholipides plus élevé et phospholipides/sphingomyline plus bas que pour le reste de la membrane plasmique) ce qui la rend plus résistante à l'action détergente de la bile.

**Le domaine latéral** est lisse et représente environ 15 % de la surface membranaire totale de l'hépatocyte.

**Le domaine basal** (ou sinusoidal), riche en microvillosités, représente au moins 70 % de la surface membranaire totale de l'hépatocyte. Il est au contact des espaces de Disse, eux même directement en contact avec les capillaires sinusoides. C'est à ce niveau que s'effectuent les échanges entre hépatocytes et courant sanguin. Ces échanges sont très importants, car la cellule hépatique, du fait de l'étendue de ses possibilités enzymatiques et de sa situation stratégique au contact du sang d'origine digestive, intervient dans la plupart des métabolismes intermédiaires.

Leur cytoplasme est riche en péroxysomes. Le réticulum endoplasmique lisse intervient dans les mécanismes de détoxication et dans la synthèse du cholestérol et de la partie lipidique des lipoprotéines ; son abondance varie selon l'activité métabolique de la cellule. L'appareil de Golgi est particulièrement développé. D'autres organites sont également importants : lysosomes concentrés aux pôles biliaires, réticulum endoplasmique granulaire, amas de pigment, dépôts de glycogène, vacuoles lipidiques.

### **1.1.3.Fonctions hépatobiliaires**

On distingue (4):

- Le métabolisme glucidique

Le foie stabilise les taux de glucose dans le sang en captant et en entreposant le glucose sous forme de glycogène (glycogénèse), en dégradant le glycogène en glucose

(glycogénolyse), au besoin, ainsi qu'en formant du glucose à partir de substances non glucidiques telles que les acides aminés (glyconéogenèse). L'hypoglycémie ne survient que tard dans l'évolution d'une hépatopathie grave. En effet, le foie a une réserve fonctionnelle considérable qui lui permet d'assurer l'homéostasie du glucose même si son fonctionnement est réduit à 20 %.

- Le métabolisme protidique

Le foie synthétise la majeure partie des protéines qui circulent dans le plasma, y compris l'albumine et la plupart des globulines autres que les gammaglobulines. L'albumine assure en grande partie la pression oncotique du plasma et sert au transport des médicaments et des composés hydrophobes endogènes comme la bilirubine non conjuguée. Le taux d'albumine ne s'abaisse en général qu'en cas de dysfonction hépatique grave, le plus souvent de cirrhose avancée, traduisant dans ces conditions un pronostic sombre. L'albuminémie demeure normale dans l'hépatite aiguë; si elle diminue, elle reflète une évolution particulièrement sérieuse de la maladie. Les globulines comprennent les facteurs de coagulation suivants : le fibrinogène, la prothrombine (facteur II) et les facteurs V, VII, IX et X, dont l'activité dépend de la vitamine K. Or la disponibilité de la vitamine K, liposoluble, exige la présence de sels biliaires qui assurent son absorption. Les facteurs de coagulation décroissent en cas de malabsorption des graisses (comme lorsqu'il y a cholestase prolongée) et au moment d'un ralentissement de la fonction de synthèse des cellules hépatiques (en cas d'atteinte des hépatocytes, l'administration de vitamine K par voie parentérale ne corrige pas les déficiences en facteurs de coagulation.).

- Le métabolisme lipidique

Le foie capte les acides gras et les estérifie en triglycérides. Il lie les triglycérides avec le cholestérol, les phospholipides et une apoprotéine, ce qui donne une lipoprotéine. Celle-ci passe dans le sang où elle est utilisée ou mise en réserve dans les adipocytes. La synthèse du cholestérol se fait en majeure partie dans le foie. Les sels biliaires sont le principal produit du catabolisme hépatique.

- Pouvoir de détoxification du foie

Le foie est doté d'un système enzymatique très riche qui assure le métabolisme de nombreuses drogues, y compris l'alcool (5). Il détoxique les substances nocives qui arrivent de la circulation splanchnique et les empêche de passer dans la circulation générale. Cela rend le foie particulièrement vulnérable aux lésions d'origine médicamenteuse. Le foie convertit certains composés lipophiles en agents plus hydrophiles pour en faciliter l'excrétion dans l'urine ou la bile. Il en métabolise d'autres en agents moins actifs.

Le foie est aussi le siège de la plus grande partie du catabolisme et des interconversions des acides aminés. Ces derniers sont catabolisés en urée. Pendant ce processus, l'ammoniaque, un produit du métabolisme de l'azote et peut-être une neurotoxine, est utilisé et par conséquent détoxiqué.

- Formation de la bile

La bile fournit la principale voie d'excrétion des métabolites toxiques, du cholestérol et des déchets lipidiques. Elle est aussi nécessaire à la digestion et à l'absorption efficace des graisses alimentaires. Les sels biliaires, synthétisés en exclusivité par le foie à partir du cholestérol, sont responsables de la formation de la bile. Après son excrétion par le foie, la bile est emmagasinée dans la vésicule biliaire durant les périodes de jeûne.

#### **1.1.4. La capacité de régénération du foie**

Pour avoir dérobé le feu aux dieux de l'Olympe, Prométhée fut condamné à avoir une partie du foie dévorée chaque jour par un aigle. Comme son foie régénérait chaque nuit, l'aigle disposait d'une nourriture éternelle et Prométhée subissait une éternelle torture (2).

Alors que certains organes ou tissus (comme la moelle osseuse ou la peau) se réparent à partir de la prolifération d'un petit groupe de cellules souches ou de cellules progénitrices, le foie régénère par prolifération de toutes les populations cellulaires matures qui composent l'organe intact. Les hépatocytes prolifèrent pour reconstruire le tissu hépatique perdu.

Le foie possède une capacité presque illimitée de régénération. Chez le rat, après une séquence de 12 hépatectomies partielles des 2/3, le foie se régénère encore. Le potentiel

clonogénique de l'hépatocyte lui-même est également quasiment illimité : un unique hépatocyte de foie de rat peut, en culture, donner lieu à 34 divisions aboutissant à  $1,7 \cdot 10^{10}$  hépatocytes ce qui représente environ 50 foies de rat (puisque un foie normal de rat possède environ  $3 \cdot 10^8$  hépatocytes). Ainsi les hépatocytes matures ne sont pas des cellules en fin de différenciation.

Plus remarquable encore est le fait que cette capacité des hépatocytes à proliférer se manifeste alors que simultanément les cellules hépatiques continuent à assurer leurs différentes fonctions (régulation du glucose, synthèse de nombreuses protéines plasmatiques...). Cette capacité pourrait être mise en relation avec le fait que la plupart des hépatocytes matures sont polyploïdes (cellule possédant plus de deux génomes de base).

De nombreuses cytokines et facteurs de croissance interviennent dans le déclenchement du signal mitotique qui va permettre le processus de régénération hépatique : HGF (Hepatocyte Growth Factor) représente le signal mitogène majeur pour les hépatocytes, les cytokines pro inflammatoires TNF alpha (Tumor Necrosis Factor alpha) et IL 6 (InterLeukine 6), la noradrénaline et l'insuline jouent également un rôle (6).

Ces mécanismes naturels de régénération de l'organe viendront s'ajouter aux bénéfiques potentiels apportés par un système de suppléance hépatique bioartificiel.

## **1.2. Les pathologies hépatiques**

### **1.2.1. Approche clinique de la maladie hépatique**

A cause de la complexité du foie, la maladie hépatique se reflète souvent dans des anomalies des diverses composantes de l'organe, c'est-à-dire des hépatocytes (dysfonction hépatocellulaire), de l'appareil biliaire excréteur (cholestase) et du système vasculaire (hypertension portale) (7).

Il est possible de reconnaître les diverses hépatopathies en observant les anomalies fonctionnelles présentes. Ainsi, l'hépatite à virus se manifeste de manière caractéristique par

la dysfonction hépatocellulaire, la cirrhose biliaire primitive par la prédominance d'une cholestase, et enfin, la cirrhose alcoolique, par des troubles fonctionnels de l'un ou l'autre des trois systèmes évoqués précédemment.

#### **1.2.1.1.L'ICTERE OU JAUNISSE**

L'ictère, communément dénommé "jaunisse" en raison de la coloration prise par la peau et surtout par la conjonctive des yeux, correspond à une surcharge du sang en bilirubine. À l'état normal, cette substance se trouve essentiellement dans la bile, en provenance du foie. L'ictère n'est pas une maladie mais le symptôme d'une atteinte infectieuse du foie (hépatite virale) ou d'une obstruction mécanique des voies biliaires (lithiase ou calculs).

Le signe majeur demeure la teinte jaune qui gagne l'ensemble des tissus cutanés. La plupart des ictères s'accompagne d'une fatigue de plus en plus intense et d'un amaigrissement parfois rapide.

#### **1.2.1.2.HEPATITE VIRALE AIGUË**

Le terme hépatite désigne tout processus inflammatoire du foie (8). La cause la plus fréquente d'hépatite aiguë est l'infection virale : Les virus dit de l'hépatite A,B et C sont les causes les plus courantes d'hépatite virale.

L'hépatite virale aiguë cause une inflammation du foie touchant principalement le parenchyme (ensemble de cellules constituant le tissu fonctionnel d'un organe). Il y a des signes de dégénérescence hépatocellulaire (ballonnements, corps acidophiles, nécrose discontinue), d'inflammation (infiltration mononucléaire lobulaire et portale) et de régénération hépatocytaire.

Le traitement de l'hépatite virale aiguë n'a pas progressé. Le traitement de base consiste encore en soins de soutien parce que dans la plupart des cas, l'inflammation est spontanément résolutive. Le foie se reconstitue complètement par régénération des hépatocytes. L'hépatite virale aiguë peut aussi évoluer vers l'insuffisance hépatique fulminante qui exige une greffe du foie.

- **Le virus de l'hépatite A**

L'hépatite A est une affection qui par le passé était connue sous le nom d'hépatite infectieuse. Elle est due au virus de l'hépatite A (HAV) et est fréquente. Des anticorps anti-HAV peuvent être décelés chez 30 % à 40 % des habitants des pays industrialisés et chez 90 % des habitants des pays en voie de développement, ce qui signifie que ces personnes ont été en contact avec le virus.

- **Le virus de l'hépatite B**

Le virus de l'hépatite B se transmet par le sang et les autres liquides biologiques, par voie sexuelle et de manière verticale (mère/enfant). Le risque de contamination après exposition au sang est 10 fois supérieur au risque lié au virus de l'hépatite C. L'infection est cliniquement muette dans plus des deux tiers des cas et peut donc passer inaperçue. Le sujet porteur chronique constitue ainsi une source possible de contamination secondaire.

Les connaissances épidémiologiques sur l'hépatite B sont imparfaites. Les estimations sur la prévalence en France sont les plus fiables. On estime que 100 000 personnes seraient porteurs chroniques (9).

- **Le virus de l'hépatite C**

L'hépatite C est une maladie relativement fréquente. On estime que 3 % de la population mondiale a une infection chronique par le virus de l'hépatite C et que celui-ci est responsable d'environ 20 % des cas d'hépatites aiguës et de 70 % des cas d'hépatites chroniques. En outre, la cirrhose liée à l'hépatite C est la première cause de transplantation hépatique en Europe (10).

### **1.2.1.3. HEPATITE FULMINANTE**

Cette forme d'hépatite se manifeste par des lésions hépatocytaires aiguës évoluant en moins de huit semaines vers une insuffisance et une encéphalopathie hépatique. L'encéphalopathie peut évoluer vers un coma profond. A ce stade, le taux de mortalité est supérieur à 50%(11-14).

#### **1.2.1.4. HEPATITE CHRONIQUE**

L'hépatite virale aboutit la plupart du temps à un rétablissement complet. La complication la plus importante est l'évolution vers la chronicité qui peut suivre les hépatites B, C.

L'hépatite est dite chronique si elle dure depuis plus de six mois. Sur le plan histologique, l'hépatite chronique est caractérisée par l'infiltration des espaces portes par des cellules inflammatoires. L'hépatite chronique est une complication rare de l'hépatite B aiguë chez l'adulte mais survient dans plus de 75 % des cas d'hépatite C. L'hépatite A ne devient jamais chronique (15).

#### **1.2.1.5. CIRRHOSE DU FOIE**

La cirrhose est une maladie du foie diffuse et chronique qui se caractérise par la fibrose et la formation de nodules. Cette affection est le résultat d'une nécrose des cellules hépatiques et de l'affaissement des lobules du foie, attribuables à de nombreux facteurs tels que l'inflammation ou l'ischémie.

#### **1.2.1.6. CHOLESTASE**

La cholestase correspond à un arrêt de l'écoulement de la bile (7). Elle peut avoir pour cause de nombreuses atteintes des voies biliaires, depuis les cellules hépatiques jusqu'à l'ampoule de Vater (petite cavité où s'abouche le canal excréteur de la bile (canal cholédoque) et le canal principal excréteur du pancréas (canal de Wirsung). La toxicité médicamenteuse représente la principale cause de la cholestase d'origine cellulaire. La plupart des hépatopathies aiguës et chroniques provoque de la cholestase. Il arrive que l'hépatite virale aiguë comporte une phase cholestatique. La cholestase guérit généralement en quelques semaines. Cette complication survient surtout dans les cas d'hépatite A.

### **1.2.2. Traitement de l'insuffisance hépatique aiguë voir fulminante**

En 1963, Starzl a réalisé la première greffe du foie chez un humain, à savoir chez un garçonnet âgé de trois ans. La première greffe réussie n'a pas été effectuée avant 1967, chez une petite fille d'un an et demi. La patiente est morte d'une récurrence de la tumeur, après 17 mois. Le taux de survie à un an signalé durant les premières années de pratique de cette intervention était de 25 % à 35 %. Toutefois, grâce à l'introduction de la cyclosporine au début des années 1980, la greffe du foie est devenue une réalité clinique et offre maintenant des taux de survie à un an et à cinq ans supérieurs à 80 % et à 60 % respectivement (2).

Avec l'amélioration spectaculaire des résultats, la greffe du foie est devenue le traitement reconnu pour l'hépatopathie terminale. L'étape limitante dans l'application de la greffe pour les hépatopathies est maintenant la disponibilité des donneurs (16).

Comme nous venons de le voir, l'insuffisance hépatique fulminante et l'hépatite chronique sont associées à un taux de mortalité élevé (17-19). La transplantation d'un organe sain est le seul traitement reconnu pour améliorer la survie du patient (20). Mondialement, il y a un nombre de greffons insuffisant (21-23), ce qui induit un taux de mortalité d'environ 50 % chez les patients en attente d'un greffon (24). On estime qu'aux Etats Unis en 1996, sur 1700 demandes urgentes de transplantation, 1000 d'entre elles n'ont pu être satisfaites, ceci conduisant au décès du patient. Le coût d'une greffe, aux Etats Unis, se monte en moyenne à 250000 dollars (25).

### **1.3. Les systèmes de suppléance hépatique**

Le but d'un système de suppléance hépatique est de maintenir en vie le patient jusqu'à ce qu'un organe soit disponible. Cependant, une vision plus optimiste consiste à réduire le nombre de transplantations grâce à une régénération spontanée du foie du patient en insuffisance hépatique (26).

De nombreuses thérapies ont été évaluées comme l'hémodialyse associée à l'hémofiltration (27; 28), l'échange plasmatique (29; 30), l'hémoperfusion et la circulation croisée (31). Cependant, aucune n'a permis d'améliorer la survie du patient de façon significative.

On distingue deux catégories de systèmes de suppléance artificielle :

1. **Foie artificiel** n'utilisant pas de composantes biologiques et ne traitant que l'aspect détoxification.
2. **Foie bioartificiel** utilisant des hépatocytes afin d'assurer les fonctions de détoxification et métaboliques.

### 1.3.1. Les systèmes artificiels

L'ammoniaque, les acides aminés, la bilirubine et les acides biliaires peuvent être évacués par dialyse ou encore être adsorbés par du charbon activé ou des résines spécifiques. Avec le charbon, les meilleurs résultats sont observés pour les substrats hydrosolubles comme l'ammoniaque mais le glucose, les oligo et polypeptides (les acides aminés, les acides biliaires, la bilirubine sont liés à des protéines) et l'urée ne sont pas adsorbés. Ces résultats sont positifs mais doivent être relativisés à cause de la faible hémocompatibilité, qui nécessite de protéger le patient contre la dégradation de ses plaquettes (32).

A ce jour, un système composé d'une colonne de charbon activé associé à une colonne d'absorption spécifique (bilirubine et acides biliaires) offre le meilleur compromis (système Asahi) (33; 34). Il est utilisé après hépatectomie partielle, ce qui facilite une régénération spontanée.

Un autre système basé sur l'utilisation de deux filtres est décrit dans la littérature (système Frésenius). Le premier filtre dispose d'une membrane de dialyse en polysulfone pour évacuer les métabolites hydrosolubles alors que le second filtre dispose d'une membrane hydrophobe liquide qui élimine les substances lipophiliques (35); les molécules amenées par les protéines sont relarguées et diffusent dans la phase liquide de la membrane pour être réceptionnées et évacuées du côté dialysât dans lequel elles deviennent hydrosolubles par réaction avec NaOH. Ce système ne présente pas de problèmes d'hémocompatibilité et semble très sélectif (pas de pertes hormonales).

On peut aussi combiner adsorption et dialyse en maintenant le charbon en suspension dans le dialysât. C'est le principe du Biologic DT sorbent de la société Hemocleanse (36). Ce système évite le contact direct entre absorbant et sang ce qui élimine les problèmes d'hémocompatibilité (37). Le système MARS (Molecular Absorbent Recycling System) permet lui aussi une élimination des toxines mais, cette fois, grâce à une membrane prétraitée à l'albumine. Ce système permet l'élimination de nombreuses toxines. Il est commercialisé par la société Teraklin (38).

Le relatif échec de ces systèmes artificiels est attribué au fait qu'ils ne peuvent pas remplacer les nombreuses fonctions métaboliques et de synthèses normalement assurées par le foie. Le but des nouvelles thérapies doit donc être la prise en charge des fonctions biologiques de l'organe.

### **1.3.2. Les systèmes bioartificiels**

Beaucoup de spécialistes considèrent les systèmes de suppléance hépatique bioartificiels ou foies bioartificiels comme la thérapie la plus prometteuse pour le traitement des insuffisances hépatiques. Dans cette optique, des cellules hépatiques sont maintenues en vie dans un bioréacteur qui sera inclus dans un circuit de circulation extra corporelle.

La bioencapsulation, ou piégeage de cellules de mammifères dans une membrane, est pratiquée depuis 1950. Introduite comme un outil de recherche, la méthode a, depuis, été améliorée avec l'espoir de sa possible utilisation thérapeutique dans la transplantation de tissu. L'encapsulation isole, au sein d'un matériau poreux, une masse cellulaire d'un environnement externe et a pour but de maintenir la physiologie normale de la cellule en lui fournissant une matrice. Cette matrice permet non seulement aux cellules d'exprimer leurs différentes fonctions mais les aide aussi à s'organiser afin d'obtenir une viabilité optimale (81)(53). De plus, le matériau constitue une barrière de perméabilité définie et assure l'immuno protection des cellules. Ces techniques sont généralement classifiées en deux catégories, la macroencapsulation et la microencapsulation.

La plupart des travaux portent sur des systèmes de suppléance extracorporel. Cependant, certaines équipes envisagent une implantation pour un traitement à plus long terme (39; 40).

### **1.3.2.1.HISTORIQUE**

Le concept de foie bioartificiel est apparu pour la première fois il y a 50 ans (41). Plus tard, en 1963, Nosé et al rapportent le premier traitement clinique avec un foie bioartificiel basé sur un hémodialyseur contenant des tissus hépatiques canins (42). En 1975, Wolf et Munkelt décrivent la conjugaison de la bilirubine dans un bioréacteur contenant des cellules hépatiques de rats (43).

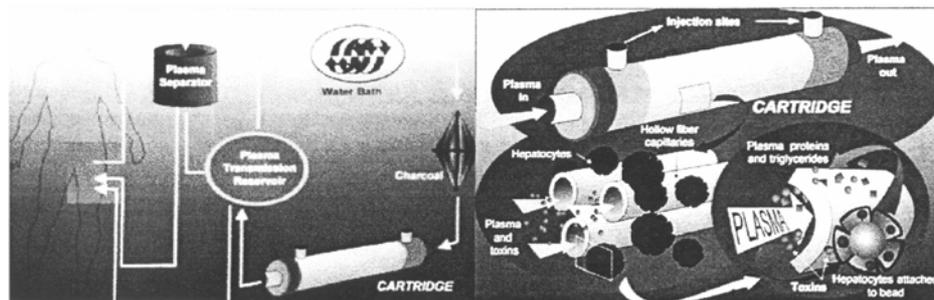
Matsumara et al ont été les premiers à expérimenter sur l'homme le traitement de l'insuffisance hépatique grâce à un bioréacteur contenant des hépatocytes (44). Ils utilisaient un module de filtration rempli avec des hépatocytes de lapin. Un patient, atteint d'une insuffisance hépatique provoquée par un cancer inopérable, fut traité. Les auteurs décrivent une amélioration anecdotique de l'état général du patient après deux séances de traitement.

La première étude de grande ampleur est décrite par Margulis et al en 1989 (45). Au total, 59 patients ont été traités par un système associant hémoperfusion à travers du charbon activé et une petite masse d'hépatocytes porcins. Une amélioration significative de la survie des patients traités, comparée à un groupe de patients n'ayant reçu que des soins intensifs, a été observée. Cependant, il n'est pas certain que cette amélioration soit attribuable au foie bioartificiel.

### **1.3.2.2.LES FOIES BIOARTIFICIELS BASES SUR LA MACROENCAPSULATION**

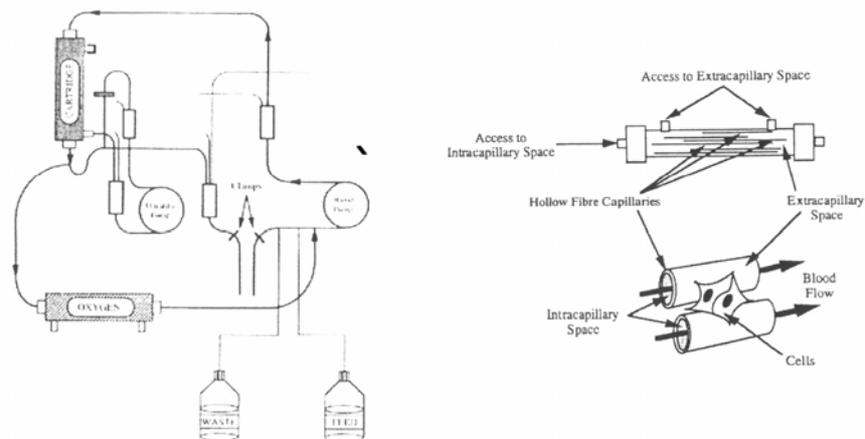
La macroencapsulation désigne le piégeage de composés biologiques (tissus) dans des fibres creuses ou entre des membranes planes. La majorité des systèmes bioartificiels développés actuellement repose sur ce principe, issu des techniques d'hémodialyse ou de plasmaphérèse par filtration. Nous avons effectué une revue de la littérature publiée dans Journal of Membrane Science (46) disponible en annexe. Les systèmes les plus avancés sont brièvement repris ci dessous.

Demetriou et al ont mis au point un système basé sur un filtre à fibres creuses dont l'espace extra capillaire est rempli d'hépatocytes porcins attachés sur des micro porteurs afin d'accroître la surface d'échange (Figure 3) (47). En amont du bioréacteur est placée, dans le circuit, une colonne d'absorption de charbon activé lié à la cellulose et saturé avec 5 % de dextrose améliorant de façon significative la détoxification. Ce système, développé par la société GRACE Medical sous le nom de Hepatassist 2000, est en phase III d'essais cliniques.



**Figure 3 : Système extra corporel de Demetriou et al (47)**

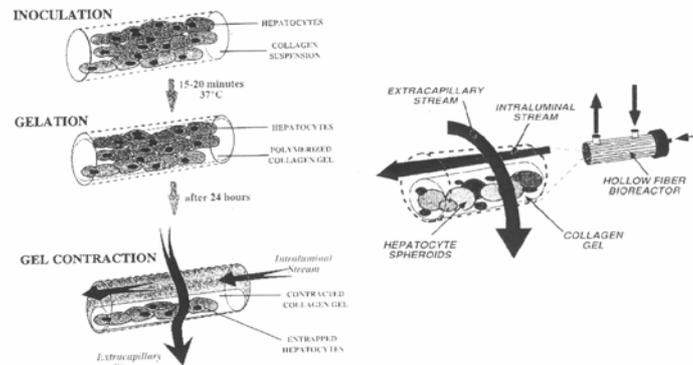
Sussman et al décrivent un système (Figure 4) dans lequel le sang du patient passe au travers d'un filtre d'hémodialyse standard à fibres creuses dont l'espace extra capillaire est rempli de 200 grammes d'hépatocytes humains provenant d'une lignée cellulaire adhérente aux fibres (48). L'efficacité du système peut être accrue en branchant deux modules en série.



**Figure 4 : Système extracorporel de Sussman et al (48)**

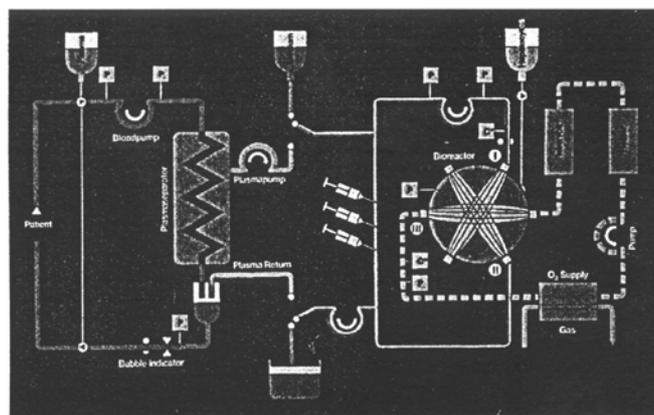
Nyberg et al, quant à eux, utilisent le même protocole expérimental mais les hépatocytes sont piégés dans du collagène à l'intérieur des fibres (seuil de coupure=100 kDa )

perfusées avec un milieu de culture (figure 5) (49) (50). Les résultats obtenus in vitro sont encourageants.



**Figure 5 : Système extracorporel de Nyberg et al (49)**

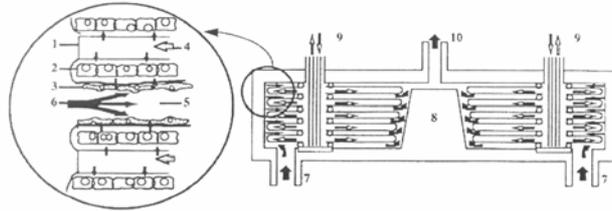
Gerlach et al ont mis au point un bioréacteur dans lequel sont disposés des hépatocytes porcins en culture sous forme d'agrégats (Figure 6) (51; 52). Un module de plasmaphérèse est placé en amont du bioréacteur. Le module est traversé de trois systèmes capillaires de fibres creuses permettant la distribution, le drainage du plasma et l'oxygénation des cellules. Les essais cliniques de phase I sont concluants (52). Les phases II et III permettront de confirmer ce résultat positif.



**Figure 6 : Système extracorporel de Gerlach et al (52)**

Bader et al, pour leur part, utilisent des hépatocytes en couches successives prises en sandwich entre deux couches de collagène (Figure 7) (53). Celles ci sont attachées, d'une part, à une membrane plane permettant l'oxygénation des cellules bordées, d'autre part par une

couche de cellules non parenchymateuses. Le sang traverse le bioréacteur entre les couches de cellules.



**Figure 7 : Système extracorporel de Bader et al (53)**

### **1.3.2.3.LES FOIES BIOARTIFICIELS BASES SUR LA MICROENCAPSULATION**

La microencapsulation désigne le piégeage de composés biologiques (cellules) dans une microparticule, microcapsule, microsphère ou bille de taille comprise entre 0,3 et 1,5 mm (54). Il faut faire la distinction entre les capsules et les billes. Les capsules sont des structures comprenant une paroi ou membrane entourant un espace interne rempli d'un milieu liquide et sont donc « creuses ». Au contraire, les billes ont une structure tridimensionnelle car elles sont pleines, le même matériau constituant la paroi et l'espace interne. Ces géométries offrent une grande surface membranaire par rapport à leurs volumes. Ceci est considéré comme un avantage pour les mécanismes d'échange entre milieu intérieur et extérieur (55-57).

De nombreuses techniques et applications sont décrites dans la littérature, dans le domaine des biotechnologies principalement (55; 58; 59). Indépendamment de la technique, un processus « doux » d'encapsulation est vital pour les cellules fragiles incapables de proliférer ou de se régénérer. Seules les cellules capables de prolifération sont appropriées pour l'encapsulation dans des conditions plus sévères qui aboutissent à des billes plus résistantes du point de vue mécanique. Toutes les techniques reposent sur un procédé capable de générer des gouttes de taille contrôlée, suivi d'un processus interfacial afin de stabiliser la goutte primitive et d'obtenir une membrane solide autour d'elle. La bille est constituée d'un polysaccharide gélifié et doit être considérée comme une protection pour le composé biologique qu'elle renferme.

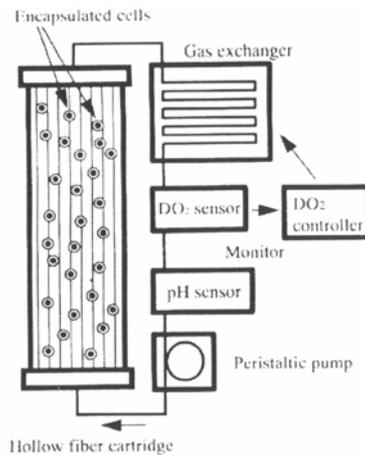
Les matériaux (alginate, alginate poly-lysine (60), alginate chitosan et agarose (61) utilisés pour former des microbilles sont très hydrophiles, ce qui a pour conséquence d'éliminer les phénomènes de tension interfaciale avec les fluides environnants et les tissus. Ceci réduit l'adsorption des protéines et l'adhésion cellulaire. La combinaison de ces deux facteurs conduit à une biocompatibilité élevée pour l'utilisation qui en est faite (54).

Dans le domaine des organes bioartificiels, la bioencapsulation a été utilisée par exemple pour traiter le diabète en implantant des capsules dans la cavité péritonéale (60). L'avantage est la grande capacité de stockage, mais les cellules ainsi encapsulées ont une viabilité limitée et à long terme, les capsules se brisent, levant ainsi la protection vis à vis du système immunitaire.

En ce qui concerne le foie, différentes approches de circulation extracorporelle ont été envisagées :

Dixit et al ont développé l'idée d'incorporer des hépatocytes encapsulés dans un bioréacteur à lit fixe hémoperfusé. Les premiers résultats obtenus ont conduit à l'abandon du projet dans un premier temps à cause d'un bris trop élevé de capsules sous l'action de contraintes dues à l'écoulement (62). Le projet a été ensuite repris après modification de la composition des capsules (63). Des essais sur rats ont montré un taux de survie accru (47 % pour les traités contre 6 % pour les témoins) et une bonne tolérance sans affecter la circulation (64).

Shiraha et al développent un système de suppléance extracorporelle basé sur l'encapsulation associée à la filtration (Figure 8) (65). Les hépatocytes se présentent sous forme d'agrégats et sont encapsulés dans une solution d'agarose puis placés dans le compartiment extracapillaire d'un filtre de plasmaphérèse à fibres creuses. Il apparaît que le métabolisme des acides aminés et la synthèse protéique sont améliorés. Ces résultats prometteurs encouragent à poursuivre dans cette voie pour la conception d'un bioréacteur.



**Figure 8 : Système extracorporel de Shikaha et al (65)**

Frémont et al ont placé dans un bioréacteur des hépatocytes de rat encapsulés dans des billes d'alginate en lit fixe (66). Les résultats sont positifs concernant la conjugaison de la bilirubine. Cette étude est la base de notre projet. Le passage au modèle porcine d'insuffisance hépatique implique un redimensionnement du bioréacteur. Le lit fixe est abandonné au profit d'un lit fluidisé (1; 67). Une des préoccupations principales est la qualité de l'échange plasma-hépatocytes qui est à la base de l'efficacité de la suppléance. Dans cette optique la mise au point d'un système avec lit fluidisé présente de nombreux avantages. Ainsi il a été établi avec du sérum physiologique et des billes vides que les échanges intérieur/extérieur sont de meilleure qualité (efficacité) grâce à une surface d'échange accrue et se font plus rapidement. La géométrie du bioréacteur doit être optimisée de façon à répondre aux contraintes physiques liées aux billes d'alginate (biopolymère choisi pour encapsuler les hépatocytes porcins sous forme d'agrégats) qui sont souples et déformables ; elles ne doivent pas former d'amas dans la colonne qui constitueraient alors une résistance à l'écoulement et pourraient ainsi aboutir à la rupture des billes et au relargage des hépatocytes.

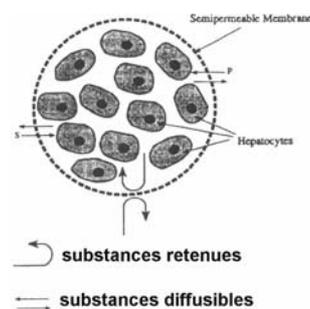
## **2.Bioencapsulation : évaluation des propriétés de la bille**

L'efficacité de l'encapsulation dépend de quatre critères :

1. La perméabilité de la membrane externe
2. La capacité de protection vis a vis du système immunitaire
3. Les propriétés mécaniques
4. La biocompatibilité du matériau formant la membrane

## 2.1. La perméabilité de la membrane pour les échanges

L'encapsulation de cellules a pour but de piéger des cellules viables à l'intérieur d'une membrane semi-perméable. La perméabilité sélective doit promouvoir aussi bien le métabolisme que la prolifération ou la différenciation cellulaire. Cette barrière sélective doit donc permettre l'entrée de molécules indispensables à la survie des cellules ainsi que la sortie des différents métabolites cellulaires (Figure 9). Ces deux mécanismes sont à la base d'une bonne viabilité des cellules encapsulées.



**Figure 9 : Encapsulation d'hépatocytes**

La taille des pores membranaires est considérée fixe mais peu d'informations sont disponibles sur la répartition réelle de la taille de ces pores. Une méthode expérimentale simple pour déterminer la perméabilité est d'effectuer des échanges avec un soluté de poids moléculaire connu et de quantifier aussi bien le flux de soluté entrant que sortant en fonction du temps (68) (69). Afin de déterminer l'effet du poids moléculaire des molécules sur leur taux de transfert au sein des billes, des éléments dont la méthode d'analyse est simple sont choisis afin de définir une gamme de tailles de pores (70). Les composés les plus couramment utilisés sont la vitamine B12 (PM=1355 Da), le cytochrome C (PM=12400 Da) et l'albumine bovine (PM=67000 Da). Ce type de travaux a déjà été effectué dans notre laboratoire par E.Doré (1). Un lot de billes (dont le nombre est connu) est placé dans une cuve pour spectrophotomètre. Un volume déterminé de soluté est ensuite versé dans cette cuve. Par une mesure en continu de l'absorbance, on pourra observer l'évolution de la concentration du soluté considéré dans le surnageant. Une baisse de la concentration du soluté traduit la quantité de matière a priori entrée dans les billes et ainsi, théoriquement, le seuil de coupure de celles-ci. Il est cependant difficile de déterminer le nombre optimum de billes nécessaire

pour ce genre de test. Le résultat repose à la fois sur la sensibilité de la technique de détection utilisée pour mettre en évidence les variations de concentration du soluté considéré mais aussi sur la perméabilité de la bille à ce même soluté. Cette méthode permet de déterminer un taux de transfert pour un soluté qui pourra ensuite être utilisé pour déterminer la perméabilité membranaire.

L'évaluation du seuil de coupure, c'est à dire la taille des pores présents sur la membrane, est presque impossible avec cette méthode à cause de la lenteur de pénétration de la molécule dont le poids moléculaire est voisin de la taille limite de passage utilisée comme traceur (1; 67).

Une technique alternative visant à déterminer le seuil de coupure de la membrane, est de mesurer le poids moléculaire des protéines produites par les cellules encapsulées. Elles passent à travers la membrane et se retrouvent dans le fluide environnant. Toutes les cellules relâchent une gamme de protéines de poids moléculaires variables. De nombreux auteurs utilisent cette technique (71; 72). Une des sources d'erreur est l'adsorption potentielle de la protéine d'intérêt sur la membrane des billes étudiées. Ceci aboutissant à une estimation plus faible du taux de sécrétion. Cet handicap peut être levé par la mise en culture des billes dans un milieu contenant déjà les protéines d'intérêt.

Il est courant de comparer la sécrétion de cellules encapsulées par rapport à celle de cellules non encapsulées. Le niveau d'expression des protéines peut être différent de celui des cellules en culture. L'environnement tri-dimensionnel peut favoriser l'expression de certaines protéines. Il faudrait avoir accès à la concentration intracapsulaire de la protéine étudiée pour estimer l'influence de l'encapsulation sur son taux de sécrétion (73).

## **2.2.La capacité de protection vis a vis du système immunitaire**

La possibilité de transplanter des cellules sans recourir à un traitement immunosuppresseur est à l'origine du développement de cette technique (74; 75). La transplantation de tissu se heurte à certaines barrières définies par la disparité génétique entre donneur et receveur (76). Les autogreffes sont prélevées et greffées sur le même organisme, elles n'induisent pas de réaction de rejet. L'allogreffe est la situation habituelle en

transplantation clinique, où un organe est prélevé sur un donneur pour être greffé à un receveur génétiquement différent. Dans ce cas, la greffe est allogénique (c'est à dire effectuée entre individus d'une même espèce). La plus grande disparité génétique correspond à la xéno greffe, où donneur et receveur appartiennent à des espèces différentes. Ces xéno greffes sont rejetées rapidement. Le rejet est déterminé par la présence sur le greffon d'antigènes, molécules responsables de l'activation des cellules à l'origine du rejet, qui n'appartiennent pas à l'organisme du receveur.

On distingue 2 voies de présentation, c'est à dire de mise en contact, des antigènes du greffon (donneur) avec les cellules de l'immunité du receveur, l'une directe et l'autre indirecte.

- La voie directe désigne la mise en contact directe d'une cellule provenant du greffon avec une cellule de l'immunité du receveur, un lymphocyte T.
- La voie indirecte désigne le mécanisme par lequel des antigènes relargués par le greffon sont captés par des cellules du receveur puis présentés par celles-ci aux lymphocytes T du receveur.

Dans le cas d'une allogreffe, la voie indirecte est secondaire, c'est la voie directe qui est responsable du rejet.

Dans le cas de cellules encapsulées, la bille doit être considérée comme une véritable protection vis à vis du système immunitaire du receveur. La bille se comporte comme une barrière sélective empêchant la rencontre des différents éléments conduisant à la réaction de rejet. En pratique, seule une rupture de la membrane des billes peut amener les cellules encapsulées à être libérées puis exposées aux cellules de l'immunité du receveur, ceci provoquant l'activation de la voie directe. Il en résulte une expansion clonale, c'est à dire une multiplication à l'identique, des lymphocytes T spécifiques aux cellules libérées. La possibilité d'interaction entre cette population de lymphocytes activés avec les cellules présentes dans des billes intactes n'est pas claire. Certains auteurs pensent que cette interaction pourrait se traduire par la libération d'agents cytotoxiques et inflammatoires comme IL1, TNF (77; 78).

Le complément (ensemble de protéines plasmatiques dont la fonction est le contrôle de la réaction inflammatoire) peut aussi être activé par contact avec des billes. Il est important de savoir si l'activation du complément aboutit à une lyse cellulaire (79).

La perméabilité diffusive aux anticorps est difficile à évaluer par les méthodes d'étude de transferts de matière. La perméabilité membranaire aux grosses molécules, comme les immunoglobulines, tend à être lente même si on met en présence un anticorps dirigé spécifiquement contre des cellules encapsulées dans une bille (80), ce qui normalement, facilite le transport transmembranaire (augmentation de la force motrice). De même, la perméabilité des protéines du complément peut aussi être évaluée en utilisant des protéines purifiées (81; 82). Cependant, il serait préférable d'évaluer l'activité du complément. L'évaluation de la protection d'un composant biologique vis à vis du système immunitaire du receveur peut aussi être menée en culture mixte de lymphocytes et de cellules encapsulées (83). Il est possible, dans ces conditions, de quantifier la prolifération cellulaire ou bien d'étudier le profil de production des cytokines (même en l'absence de contacts directs cellules- cellules)

Ces tests *in vitro* ont pour but de connaître l'importance relative de chacune des voies de la réponse immunitaire contre les cellules encapsulées. Néanmoins, l'évaluation ultime de la protection immunitaire viendra des expérimentations *in vivo*.

La possibilité d'employer des cellules dans de telles structures immunosuppressives est envisagée pour traiter certaines maladies endocriniennes comme l'anémie (84), l'hémophilie B (85), l'insuffisance rénale (86) et hépatique (87), des anomalies du système nerveux central (88) ou encore le diabète (60). En effet, on peut imaginer l'utilisation de cette technique d'encapsulation afin de stimuler des cellules pour produire de l'insuline via les cellules du pancréas ou de la dopamine via celles de la glande médullo surrénale.

Cette technique est aussi utilisée dans des domaines variés comme la chimie (film photo) (89) (90), la pharmacie (relargage de médicaments) (91) ou encore l'agriculture (pesticide) (92) quand apparaît le besoin d'isoler une population cellulaire spécifique d'un environnement particulier.

## 2.3. Les propriétés mécaniques

### 2.3.1. Généralités

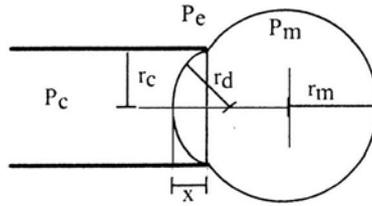
Les propriétés mécaniques dépendent du choix du matériau pour former la bille et des conditions de formation de celle-ci. Les propriétés de la microbille devront convenir à une application particulière. Afin d'étudier les propriétés mécaniques, il est essentiel de disposer d'un procédé d'encapsulation reproductible (54).

L'évaluation des propriétés mécaniques de la bille est importante afin de déterminer la qualité des billes pendant la production et la manipulation.

Bien que les propriétés mécaniques soient reconnues comme un facteur limitant pour les application *in vivo* (93) et que de nombreuses études aient été menées afin d'améliorer la robustesse (94-96), des valeurs quantitatives sont rapportées pour seulement quelques cas (94).

Pour les capsules, l'épaisseur de la membrane a été utilisée comme indicateur de la robustesse de la capsule entière (97; 98). Un moyen simple de tester la robustesse de billes ou capsules est d'en soumettre un lot à un écoulement de cisaillement. La fraction endommagée peut alors être utilisée comme une simple mesure de la robustesse mécanique (95; 99). L'effort mécanique subi par la bille sera dépendant du taux de cisaillement et de la viscosité du fluide utilisé. Bien qu'un critère visuel de rupture puisse être employé aussi bien pour les billes que les capsules, la précision de la méthode peut être améliorée pour une capsule, en utilisant un marqueur dont la fuite extracapsulaire sera interprétée comme une mesure quantitative de rupture des capsules (100). Du fait de sa simplicité, la méthode décrite est utilisée en routine afin d'évaluer l'effet d'un changement dans le processus de fabrication sur la robustesse mécanique de billes et de capsules.

Une autre technique est décrite dans la littérature pour tester les propriétés mécaniques des capsules : une pression négative est appliquée sur une partie de la surface de la membrane d'une capsule à l'aide d'un capillaire relié à une seringue. Sous microscope optique, on peut mesurer la déformation de la membrane en fonction de la pression appliquée (Figure 10) (172).

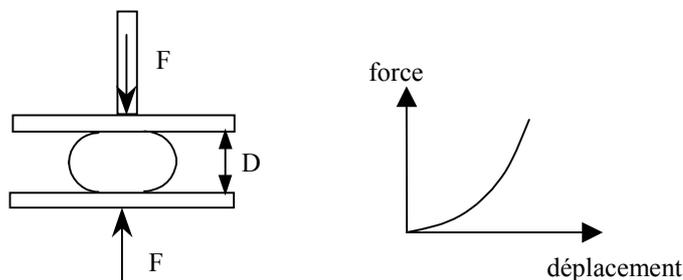


**Figure 10 : Représentation de la déformation de la membrane d'une microcapsule sous une pression négative**

### 2.3.2. Test de compression

Une autre approche est de mesurer la déformation des billes sous un chargement uni axial (Figure 11). Il est possible de réaliser l'expérimentation sur une seule bille et non plus sur un lot de billes comme précédemment et donc d'avoir accès aux propriétés mécaniques de celle-ci (94)(173)(174). La force nécessaire à la rupture d'une capsule a été estimée grâce à cette méthode. Deux aspects pratiques requièrent une attention particulière. D'une part la vitesse à laquelle le chargement uniaxial est réalisé et d'autre part le moyen de détecter la rupture à un chargement donné. La force de rupture, pour une capsule, dépend de l'épaisseur de la membrane aussi bien que des propriétés du noyau de celle ci (en terme de viscosité). Aucune information n'est disponible, à ce jour, quant à la contribution relative de chacune des deux composantes à la robustesse globale de la capsule.

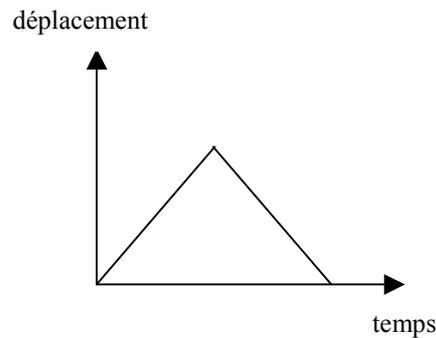
L'évolution de la force  $F$  s'exerçant sur la bille est suivie en fonction de la distance  $D$  comprise entre les plaques. La bille est placée entre deux plaques planes parallèles.



**Figure 11 : Principe d'écrasement  
(avec  $F$ , la force exercée sur la bille et  $D$  la distance entre les deux plateaux)**

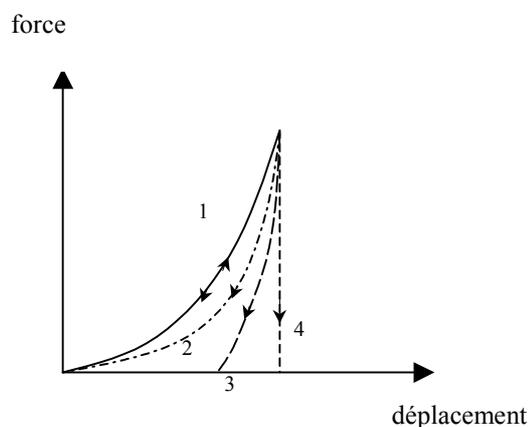
### 2.3.3. Caractérisation du matériau

Une déformation à vitesse constante (afin de ne pas prendre en compte les effets d'inertie) est appliquée à la bille selon le cycle suivant (Figure 12) :



**Figure 12 : Déformation appliquée à la bille**

On mesure l'évolution de la force en fonction du déplacement du piston. L'analyse des courbes force/déplacement permet de mettre en évidence différents types de comportement mécanique caractérisant le matériau étudié. La figure 13 illustre les différents types de déformations que l'on peut obtenir :



**Figure 13 : Types de comportement mécanique caractérisant le matériau**

**Le cas 1** est représentatif de la déformation élastique, le chemin emprunté par la courbe est le même lors du chargement et du déchargement du matériau : l'énergie accumulée lors de la compression est entièrement restituée lors du retour du piston.

**Le cas 2** illustre une déformation viscoélastique. Les chemins aller et retour sont différents, cependant, les points correspondant au début de chargement et à la fin de

déchargement sont confondus. La viscoélasticité est la conséquence d'une dissipation d'énergie au sein d'un matériau sans que la structure de celui-ci soit affectée (cette dissipation est proportionnelle à l'aire comprise entre les deux courbes).

**Le cas 3**, quant à lui, représente une déformation élasto-plastique, le matériau reprend partiellement sa taille d'origine : une déformation résiduelle persiste, elle se traduit, lors du retour, par un déplacement non nul pour une force nulle.

**Le cas 4** est typique d'une déformation plastique rigide, le matériau se déforme de façon définitive au fur et à mesure qu'il subit un écrasement. Ainsi, lorsque la force appliquée est supprimée, il reste déformé.

## **2.4. La biocompatibilité du matériau**

### **2.4.1. Définitions**

La biocompatibilité est définie comme « la capacité d'un matériau à être utilisé avec une réponse de l'hôte appropriée dans une application spécifique » (101). C'est l'ensemble des propriétés que doit posséder un matériau qui va être mis en contact avec un tissu vivant. Celui-ci ne doit pas être toxique, n'entraîner aucune réaction allergique. Un matériau peut engendrer deux types de réponses de la part d'un tissu : on distingue la biocompatibilité passive (pas de réponse du tissu vivant) et la biocompatibilité active (caractérisée par une réaction souhaitée du tissu hôte).

Cette définition est facile à interpréter avec les applications conventionnelles des organes artificiels comme les hanches, seins ou genoux. Avec les systèmes bioartificiels employant des cellules encapsulées, l'interprétation est loin d'être simple.

Un système entièrement biocompatible est considéré comme étant un dispositif ne provoquant pas, ou le moins possible, de réactions indésirables de la part de l'hôte. De nombreux facteurs comme la taille du dispositif, la morphologie externe, le matériau influence la réaction de l'hôte. Dans le cas de la bioencapsulation, l'implantation chirurgicale est connue pour limiter les performances du système et la réaction du receveur est similaire à

celle observée après l'implantation de n'importe quel dispositif biomédical (102; 103). L'amplitude de la réponse varie en fonction du site d'implantation.

Dans le cas de billes hébergeant des cellules, en plus de la réaction entre le biomatériau et le tissu hôte, il existe une autre interaction non négligeable entre le biomatériau et les cellules encapsulées (104; 105). De Vos et al et d'autres auteurs (106; 107) ont montré que l'encapsulation interfèrerait directement avec les fonctions et la viabilité des cellules encapsulées. Cet aspect n'est pas couvert par la définition actuelle de la biocompatibilité.

De plus, lors de l'utilisation d'une circulation extra corporelle dans un dispositif biomédical, il est indispensable de s'assurer de l'innocuité du matériau formant la tubulure.

L'utilisation d'un séparateur plasmatique permet d'éviter des problèmes de coagulation et d'hémocompatibilité dans le bioréacteur. La tolérance d'une circulation extra corporelle prolongée (plus de 17 heures) a été testée avec succès (108).

## **2.4.2. Les méthodes d'évaluation d'un biomatériau**

### **2.4.2.1. IN VITRO**

Elles sont basées sur la culture de cellules adhésives isolées. Cette technique permet d'évaluer la cytotoxicité et la cytocompatibilité d'un matériau. Les cellules utilisées sont issues de lignées cellulaires pour garantir une bonne reproductibilité des résultats, ou de cultures primaires dérivant d'explants correspondant au site d'implantation (norme ISO 10993-5 1992) (109).

La première étape de l'évaluation est la détermination de la cytotoxicité. On étudie la libération possible par le biomatériau d'éléments chimiques capables de tuer les cellules par contact direct ou indirect. La mort cellulaire peut être évaluée en particulier par une coloration vitale au rouge neutre, le test d'exclusion du bleu trypan, la libération de lactate deshydrogénase (LDH), une mesure de l'activité mitochondriale (tests MTT ou XTT) (110).

La biocompatibilité tissulaire, plus spécifique à l'application ultérieure de notre projet, représente les réactions des tissus ou cellules mis en contact avec un matériau. Les paramètres analysés au cours de la culture, sont, la morphologie (absence de vacuoles intracytoplasmiques, forme des cellules à confluence), l'adhésion (étude des récepteurs de surface), la prolifération (incorporation de thymidine tritiée) et les fonctionnalités métaboliques (étude de la synthèse de protéines matricielles). Ces tests doivent, de préférence, être effectués avec le même type de cellules que celles qui seront en contact avec le matériau lors de son utilisation finale car chaque type cellulaire réagit différemment.

#### **2.4.2.2.IN VIVO**

L'expérimentation animale est en général inévitable. Un aspect important de l'évaluation de la biocompatibilité *in vivo* est la recherche de la production d'agents cytotoxiques par les cellules de l'hôte et les cellules encapsulées en réponse au matériau formant la bille. Des études ont été menées pour connaître la nature de ces agents cytotoxiques. Ils font partie de la famille des cytokines (111). Ces dernières sont stables et peuvent facilement passer à travers la membrane de la bille. La production de cytokines est dépendante du biomatériau utilisé. Les alginates riches en régions M (acide mannuronique) et G (acide guluronique) peuvent être différenciés en se référant aux quantités de cytokines pro inflammatoires secrétées (112), la seconde forme étant moins inductive. Une réponse satisfaisante du biomatériau dans le cadre d'expérimentations animales permettra d'envisager des essais cliniques.

### **2.5.Microencapsulation de cellules**

#### **2.5.1.Choix du biomatériau formant la bille**

##### **2.5.1.1.DEFINITION**

Un biomatériau est une substance ou combinaison de substances d'origine synthétique ou naturelle qui entre en contact avec un système biologique pour évaluer, traiter, améliorer ou remplacer certains tissus, organes ou fonctions du corps humain (113).

Dans le domaine de l'encapsulation, l'alginate (114) et l'agarose (61) sont principalement utilisés pour former des microbilles. L'alginate est tout particulièrement utilisé. En effet, ce polymère d'origine naturelle, a pour avantage une grande possibilité de mise en forme (par moulage ou extrusion) et une relative inertie chimique mais a pour désavantage son manque de solidité, une possible déformation avec le temps et une possibilité de dégradation.

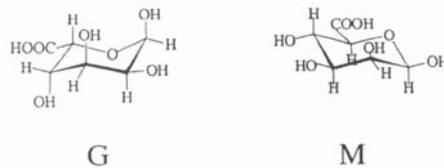
## **2.5.2.L'alginate**

### **2.5.2.1.GENERALITES**

Découverte en 1881, la production commerciale de l'alginate débute vers 1930. Elle se trouve dans les parois cellulaires et les espaces intracellulaire des algues brunes. Cette molécule confère à la fois flexibilité et rigidité à la plante. Elle peut être comparée à la cellulose. Elle est synthétisée dans certaines bactéries comme Azotobacter (116). Son champ d'application est large (gel, film par exemple). Seules quelques algues brunes sont utilisées pour la production commerciale de l'alginate : laminaria hyperborea, laminaria digitala, japonica, ascophyllum nodosum et macrocystis pyrifera. Les algues brunes requièrent une eau propre à 18 ° C. Les bonnes conditions de culture sont trouvées dans quelques régions côtières : côtes nord et ouest de l'Europe, côte ouest du continent américain (sauf zone équatoriale ou la température est trop élevée). On en trouve aussi en Nouvelle Angleterre, autour du Japon, Australie, Nouvelle Zélande. Des 5 principales algues brunes, on utilise surtout Laminaria hyperboréa et Ascophyllum nodosum pour produire de l'alginate. Comme l'alginate ne représente qu'un faible pourcentage de la plante (2,5 à 3,5 % de son poids), sa production est longue et techniquement compliquée : 20 étapes sont nécessaires avant que l'alginate soit prêt (89) (90). La pureté de l'alginate est considérée comme étant un facteur majeur dans sa biocompatibilité. De nombreuses procédures de purification des alginates sont décrites dans la littérature. Elles font appel à la filtration, la précipitation et l'extraction. Cette purification diminue de façon significative la réponse de l'hôte (114; 115).

### 2.5.2.2. PRESENTATION BIOCHIMIQUE

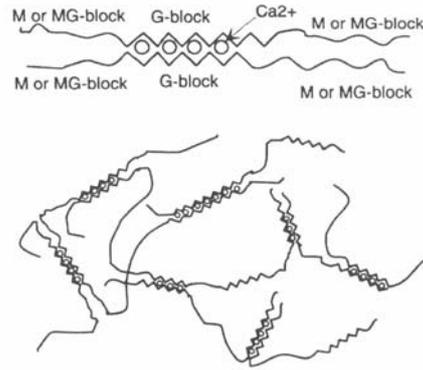
L'acide alginique ou alginate est un carbohydate. C'est un biopolymère composé de 2 types de blocs (monomères) : l'acide  $\beta$  1-4 D mannuronique (bloc M) et son épimère en C<sub>5</sub> l'acide  $\alpha$  L guluronique (bloc G) (Figure 14). Les sels de ces polysaccharides sont généralement nommés alginates.



**Figure 14 : acides guluronique (G) et mannuronique (M)**

La composition biochimique est, dans une certaine mesure, diverse selon l'espèce, la partie considérée d'une même plante et selon la saison (89) (90). La synthèse d'alginate est à la fois sous contrôle génétique mais aussi environnemental.

La proportion et la distribution de ces monomères déterminent en grande partie les propriétés physico-chimiques de l'alginate. L'acide alginique est composée de plusieurs (100 à 3000) blocs liés entre eux dans une chaîne particulièrement flexible (117). La viscosité de l'alginate dépend de la longueur de la molécule, une longue molécule a une viscosité forte. Les résidus M et G sont joints, aussi peut-on rencontrer 3 types d'assemblages, homopolymère M ou G ( MMM ou GGG ) et hétéropolymères (blocs MG) (Figure 15).



**Figure 15 : Assemblage en “boîte d’œufs”**

### **2.5.2.3. RETICULATION DE L’ALGINATE**

Pour former un gel, l’alginate doit contenir une certaine proportion d’acide guluronique. Des régions d’acide guluronique peuvent être liées à une région similaire dans une autre molécule d’alginate via le  $\text{Ca}^{++}$  ou un autre cation multivalent. L’ion  $\text{Ca}^{++}$  divalent se glisse dans la structure de l’acide comme des œufs dans une boîte (117). On peut comparer ceci à une colle intermoléculaire joignant les polymères d’alginate les uns aux autres ce qui conduit à une réticulation de la solution.

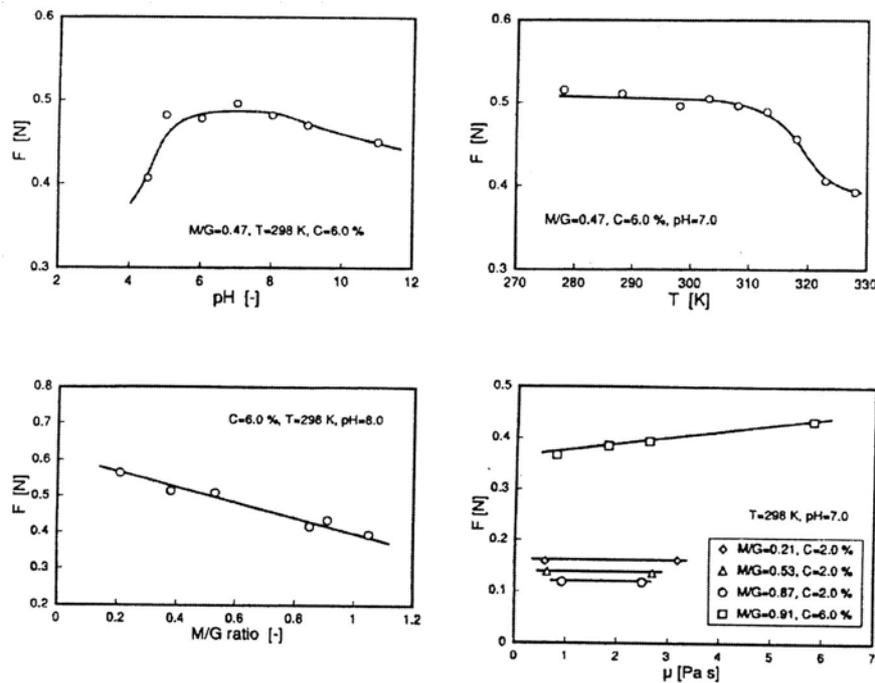
Un gel d’alginate est considéré comme un solide avec une partie liquide, la zone de jonction représentant l’état solide. Après réticulation les molécules d’eau sont physiquement emprisonnées par la matrice d’alginate ou réseau mais restent libres de migrer. C’est de toute première importance dans de nombreuses applications pour l’encapsulation et l’immobilisation cellulaire. Les gels d’alginate sont stables à température ambiante, à pH 7,4., ce qui est intéressant pour une application dans une circulation extracorporelle. La force du gel est indépendante de la longueur des chaînes moléculaires. D’un point de vue chimique, la formation d’un gel  $\text{Ca}^{++}$  alginate doit être considérée comme le résultat d’un échange d’ions. Le processus de réticulation peut être accéléré par un accroissement de la concentration de  $\text{Ca}^{++}$  dans le bain de réticulation (118).

Quel que soit le type de cellules encapsulés, ce gel offre la possibilité de recréer un environnement tridimensionnel favorable à leur bon fonctionnement (119). Ce gel est très intéressant pour les conditions de réticulation non agressive pour les cellules qu’il renferme.

Dans une bille d'alginate, les hépatocytes ont tendance à se regrouper reformant ainsi à moindre échelle une structure semblable à l'organe lui-même.

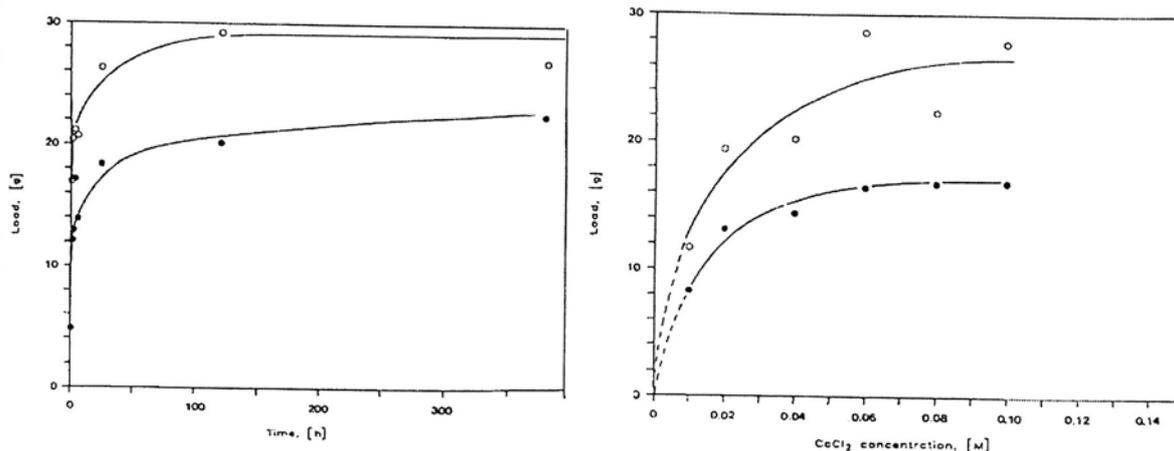
#### 2.5.2.4. Propriétés du gel alginate

Les billes d'alginate ont des propriétés déterminées principalement par la nature de l'alginate, sa concentration en solution et la méthode de réticulation. En effet, la réticulation est d'autant plus effective que sa composition est riche en blocs G. Plusieurs études ont montré que la résistance à la compression des billes augmente avec la concentration du polymère, la proportion en bloc G et la masse moléculaire moyenne du polymère (120) (121). Le pH et la température influent aussi, une hausse de température induisant une baisse de la résistance (121) (Figure 16)



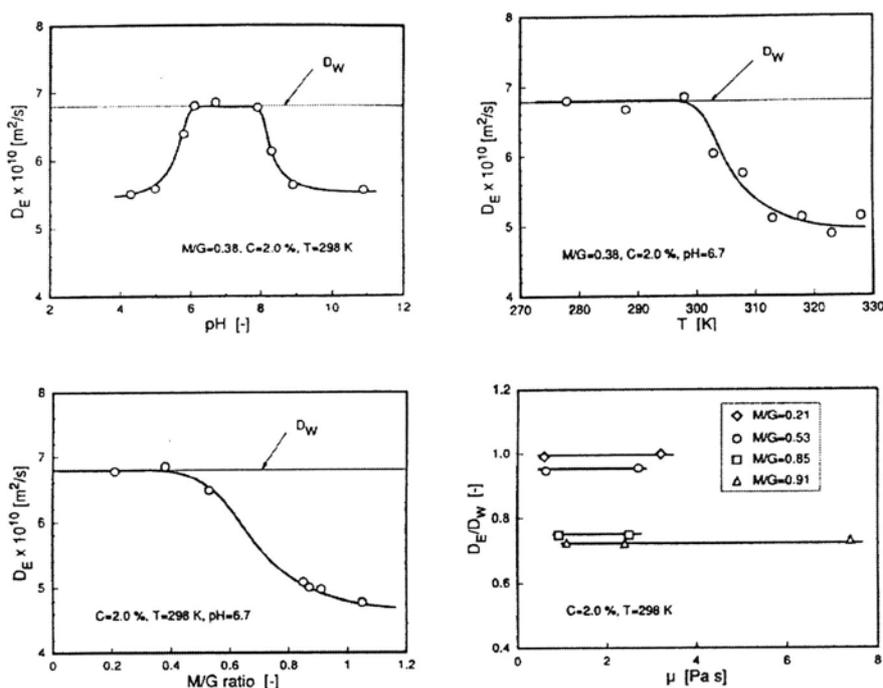
**Figure 16 : influence du pH, de la température, de la proportion en acides et de la viscosité de l'alginate sur la résistance des billes (121)**

La précision du protocole de fabrication est aussi prédominante pour la résistance, notamment le temps d'immersion dans le bain de coulage et la concentration en  $CaCl_2$  (120) comme le montre la figure 17.



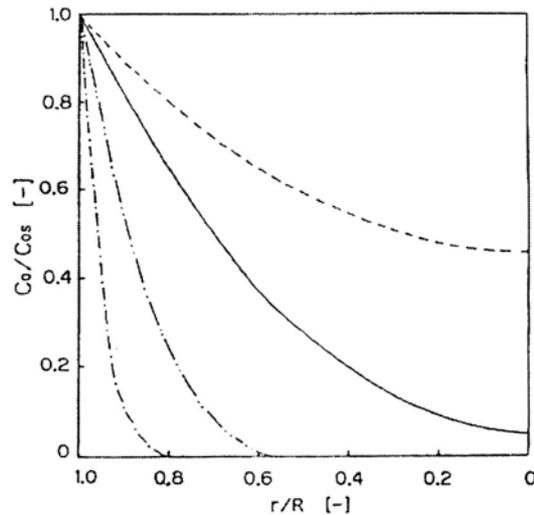
**Figure 17 : influence du temps d'immersion et de la concentration en  $\text{CaCl}_2$  de la solution de coulage sur la résistance des billes (● :  $M/G=0,41$  ; ○ :  $M/G=0,70$ ) (120)**

Les propriétés diffusionnelles dans les billes d'un élément de taille connue dépend de la composition, des conditions de fabrication, du pH et de la température (121) (122) (123) (Figure 18)



**Figure 18 : influence du pH, de la température, de la proportion en acides et de la viscosité de l'alginate sur la diffusion dans les billes ( $D_w$  = diffusivité dans l'eau) (120)**

Concernant l'aspect diffusion, les dimensions des billes et la population cellulaire immobilisée jouent aussi un rôle crucial. Un grand rayon et/ ou une densité importante de cellules induisent une baisse de diffusion à cœur (124) (125)(Figure 19).



**Figure 19 : influence du rayon (R) et de la densité cellulaire ( $d_c$ ) sur la diffusion dans les billes.  $C_0/C_{0s}$  = taux de concentration d'oxygène dans la bille par rapport à la surface. --- :  $R=0,25$  mm,  $d_c=14\text{kg/m}^3$  ; - :  $R=0,25$  mm,  $d_c=25$   $\text{kg/m}^3$  ; - . - :  $R=0,25$  mm,  $d_c=85$   $\text{kg/m}^3$  ; - - - :  $R=1,5$  mm,  $d_c=14$   $\text{Kg/m}^3$  (124)**

L'usage de billes d'alginate requiert donc quelques précautions et a ses limites. Il est nécessaire de bien définir ses fonctions pour déterminer le protocole de fabrication.

Ce gel bien que très stable peut être fluidifié par le phosphate ou le citrate. Les gels d'alginate sont utilisés sous forme de billes de diamètres variables suivant l'application souhaitée.

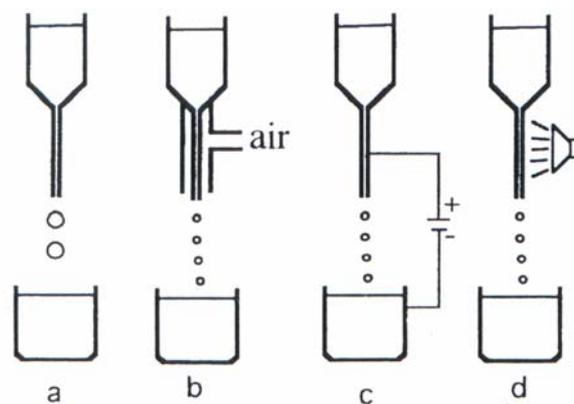
### 2.5.3.Méthode de production de billes

Deux techniques de production existent suivant que l'on privilégie une production massive ou de dimensions homogènes (118) :

1. **L'extrusion.**
2. **L'émulsification.**

#### 2.5.3.1.L'EXTRUSION

C'est une méthode simple qui consiste à faire tomber goutte à goutte une solution de gel dans un bain de coulage (généralement du chlorure de calcium  $\text{CaCl}_2$ ) dans laquelle s'opère la réticulation (Figure 20a). Par simple extrusion, les billes formées sont sphériques et de diamètre homogène (2 à 3 mm.). Celui-ci peut être diminué par ajout d'une force additionnelle à la gravité par un flux d'air coaxial (Figure 20b) ou bien par application d'une force électrostatique sur la goutte (Figure 20c), d'une tension de rupture du jet liquide par vibration (Figure 20d) (118). On trouvera davantage de détails sur ces techniques dans le chapitre III



**Figure 20 : Schéma illustrant les méthodes de fabrication des billes d'alginate par extrusion (se référer au texte pour la description)**

Les forces et les faiblesses de ces différents générateurs de billes sont présentés plus en détail au chapitre III.

### 2.5.3.2.L'EMULSIFICATION

Cette méthode repose sur le principe de réticulation de l'alginate au sein d'une émulsion. Une solution d'alginate et de calcium lié ( $\text{CaCO}_3$  par exemple) est émulsionnée dans une huile. Le pH est ensuite abaissé pour libérer les ions  $\text{Ca}^{2+}$  qui gélifient les gouttes d'alginate. Cette méthode permet une production massive mais une répartition des tailles moins homogène.

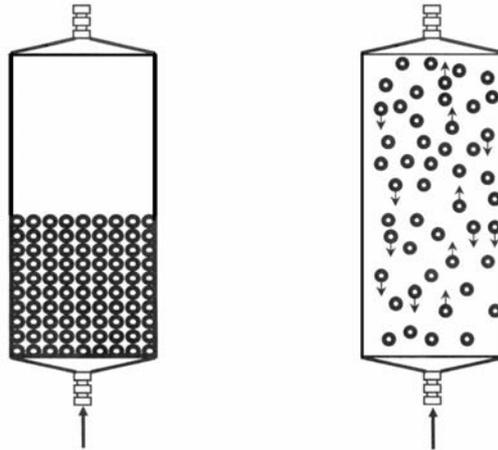
### **3.Le bioréacteur à lit fluidisé**

Les paragraphes 3.1 et 3.2 présente brièvement et le plus simplement possible, le principe de fonctionnement d'un lit fluidisé. Une description plus complète se trouve au chapitre 4.

#### **3.1.Définition du lit fluidisé**

La fluidisation est un procédé utilisé en génie chimique permettant de maintenir des particules solides en suspension dans un fluide sans qu'il y ait de déplacement d'ensemble (126) (127) (128). Cet état rend possible la mise en contact entre la phase solide et le fluide environnant. Les lits fluidisés présentent comme avantage de pouvoir fonctionner en système ouvert ou fermé. De plus, la température est constante au sein du bioréacteur. Le choix d'un tel système se fait en fonction de ses qualités hydrodynamiques et de la possibilité de mise en contact entre phases.

Le mouvement global du lit fluidisé est nul : il reste dans un volume caractéristique de son expansion pour une vitesse donnée (Figure 21). Les billes circulent en boucle dans le lit avec une ascension au centre et une descente le long des parois (126). Ceci est vrai pour une distribution homogène des vitesses sur la section. Le lit de billes dans le bioréacteur doit présenter un comportement principal de fluidisation homogène sous l'action du flux ascendant. Les performances d'un lit fluidisé dépendent de son expansion caractéristique qui influence les conditions de transfert de matière et le temps de contact entre les deux phases (128).



**Figure 21 : Représentation schématique du lit fluidisé en configuration tassée à gauche et en fluidisation à droite**

### **3.2. Le foie bioartificiel à Lit fluidisé : état de l'art**

Les travaux précédemment réalisés dans notre laboratoire à la définition du cahier des charges du foie bioartificiel en accord avec notre partenaire (INSERM U456 Rennes). Ceci s'est traduit par la réalisation d'un prototype de bioréacteur à lit fluidisé et la définition d'un cahier des charges (en accord avec l'unité INSERM U 456 de Rennes) :

- Le débit plasmatique traversant le bioréacteur est compris entre 30 et 50 ml/min.
- Les billes d'alginate ont un diamètre  $d = 1 \pm 0,2$  mm et ont un volume apparent total compris entre 300 et 400 ml.
- Le volume doit être contrôlé et le plus faible possible.
- La perfusion du plasma entre les billes d'alginate doit être correcte pour favoriser les interactions entre les hépatocytes et les éléments plasmatiques.
- L'enceinte du bioréacteur doit être maintenue à 37°C.
- La durée d'utilisation est de 6 heures.

Les billes d'alginate sont placées dans un bioréacteur de forme cylindrique et restent confinées dans son enceinte. Le système développé dans notre laboratoire par E. Doré (67) (1) se présente sous forme d'une colonne cylindrique munie à sa base d'une buse avec plusieurs jets radiaux et une grille de répartition afin de répartir sur toute la section le flux

plasmatique ascensionnel qui provoque la fluidisation des billes ; celle-ci est progressive, par passage d'une phase de régime dynamique à une phase de fluidisation complète. Le principe de fonctionnement du système est basé sur la possibilité pour certains solutés de rentrer ou sortir des billes. Ces échanges doivent être optimaux et pour cela la totalité de la surface de la bille doit être en contact avec le fluide. La perfusion du plasma entre les billes doit être efficace.

Dans un premier temps, la validation de ce bioréacteur est passée par l'analyse du comportement global du lit de billes dans son enceinte en régime fluidisé pendant 6 heures d'utilisation, temps correspondant à la durée journalière de traitement. Avec des billes n'hébergeant pas de cellules et une solution physiologique, ce comportement est apparu conforme aux attentes et reproductible. Ainsi, le lit de billes subit une expansion linéaire en fonction du temps pendant une phase courte (inférieure à 5 minutes) et ceci quel que soit le volume de billes. L'évolution linéaire suit une pente qui augmente en fonction du débit. Elle évolue ensuite asymptotiquement vers une hauteur fluidisée finale. Aucune discontinuité n'est observable et aucune surélévation n'a lieu lors de la transition entre la phase de montée et de stabilisation. La valeur asymptotique correspond à la hauteur maximale du lit fluidisé. Quelle que soit la configuration, en terme de volume de billes et de débit de perfusion du bioréacteur, le lit se stabilise sur une période de 30 minutes. Une loi simple régissant le comportement du lit de billes a été proposée par notre équipe (175).

Dans un second temps, les transferts de matière entre la solution extérieure et les billes d'alginat ont été appréciés quantitativement pour des conditions statiques (lit tassé) puis dynamique (lit fluidisé). D'un point de vue global, il a été montré que les quantités transférées ne sont pas affectées par la configuration d'échange (en statique et en dynamique). Les billes peuvent contenir une quantité finie d'éléments et l'aspect diffusif ou convectif ne joue aucun rôle sur ce point. L'apport de la convection sur la diffusion intervient uniquement sur la vitesse des transferts. Les temps d'équilibre sont ainsi fortement diminués. Les transferts sont jugés réversibles. Les billes ont une structure poreuse dont le seuil de coupure a été estimé inférieur à la taille de l'albumine. Rappelons que ces études ont été menées uniquement avec des billes vides et du sérum physiologique (1).

Le comportement global du lit fluidisé reste à définir dans des conditions expérimentales proches de celles rencontrées *in vivo*. Cette progression dans notre modèle *in*

*in vitro* passe par l'analyse du comportement du lit de billes dans le bioréacteur perfusé par du plasma et contenant 300 à 400 millilitres de billes hébergeant des hépatocytes. L'étude du métabolisme des hépatocytes encapsulés permettra d'évaluer l'influence de la fluidisation sur ce métabolisme mais aussi de mieux définir le seuil de coupure des billes d'alginate. Ces travaux font partie des objectifs fixés dans le cadre de la présente thèse.

## **4. Etude du métabolisme de cellules encapsulées**

### **4.1. Choix du type de cellules**

Les hépatocytes sont les cellules élémentaires du foie et assurent la totalité de ses fonctions (13). Ils sont donc indispensables pour obtenir un système capable de reproduire toutes les fonctions hépatiques. Un point crucial est de déterminer le nombre optimal d'hépatocytes viables nécessaires à une suppléance efficace. Ce nombre est difficile à évaluer. On estime à 10 % de la masse totale du foie la valeur seuil pour pouvoir assurer les fonctions hépatiques ( $1,5 \cdot 10^{10}$  cellules) (24).

Deux sources d'hépatocytes sont envisageables dans le cadre de la mise au point d'un modèle *in vitro* : l'une d'origine animale et l'autre d'origine humaine.

#### **4.1.1. Les différents types cellulaires étudiés dans la littérature.**

##### **4.1.1.1. LES HEPATOCYTES D'ORIGINE ANIMALE**

Les cellules animales les plus utilisées sont des hépatocytes de porc (129) (130). Elles présentent des similitudes physiologiques avec les cellules humaines et sont disponibles en grande quantité. On les obtient par digestion enzymatique du foie de porc avec de la collagénase. Ces cellules présentent l'avantage de pouvoir être conservées par cryopréservation et ainsi être disponibles rapidement. Toutefois, les fonctions et activités assurées par ces cellules sont dépendantes de l'espèce et donc ne correspondent pas

exactement aux fonctions du foie humain (pas de production de protéines plasmatiques humaines). Néanmoins cette source est intarissable. L'utilisation de telles cellules en contact avec des cellules humaines implique la gestion d'éventuels problèmes immunologiques. Cependant, des travaux ont démontré que des patients exposés à de telles cellules ne présentaient pas de complications immunologiques sérieuses en cas d'exposition non prolongée (131; 132).

#### **4.1.1.2.LES HEPATOCYTES D'ORIGINE HUMAINE**

- primaires

Les hépatocytes humains sont un modèle expérimental très attractif. Cependant, la disponibilité de tissus humains est un problème pour la plupart des laboratoires. Des foies entiers ou bien de gros morceaux étaient pendant longtemps la principale source d'hépatocytes humains. Tout ceci est de moins en moins accessible pour la recherche tandis que le programme de transplantation augmente dans les hôpitaux. Une collecte de tissu existe uniquement aux Etats Unis. Obtenir des échantillons de foie provenant de donneurs humains sans aucune lésion n'est pas aisé (129).

On a étudié la possibilité d'utiliser des microbiopsies comme source d'hépatocytes viables et fonctionnelles. Des raisons éthiques et techniques font qu'il est difficile de se procurer de gros échantillons humains. Des petits fragments de tissus peuvent être obtenus dans le cadre d'opérations en chirurgie hépatique.

Nous avons choisi de ne pas utiliser de cellules primaires car il a été montré que de telles cellules sont relativement fragiles à manipuler. Il n'aurait pas été possible d'avoir les mêmes cellules pour toutes les expérimentations ce qui aurait posé un problème de reproductibilité des résultats. L'utilisation de cellules primaires pourrait néanmoins être envisagée pour des études ultérieures.

- Les lignées cellulaires

Une autre possibilité consiste à exploiter une lignée cellulaire humaine (C3a et Hep G2) (133) (129). De telles cellules ont, en théorie, la particularité de se multiplier indéfiniment. Cependant, leur origine tumorale implique une utilisation vigilante.

Le cas idéal serait de disposer de cellules humaines non malignes, stables, proliférant bien et différenciées (129). Cette possibilité est envisageable. Jauregui propose d'immortaliser des hépatocytes en utilisant l'antigène Tag du virus simian SV 40 (134). Cette nouvelle lignée présenterait les fonctions hépatiques à plus long terme que les cellules primaires sans présenter les défauts des cellules cancéreuses.

#### **4.1.2. La lignée C3a**

Il faut donc disposer d'une lignée cellulaire stable, présentant les caractéristiques du foie ainsi que la plupart des fonctions de cet organe. En cela, la lignée cellulaire C3a, dérivée par clonage de la lignée Hep G2 et originaire d'une tumeur hépatique humaine, représente un excellent compromis (135) (136). En effet, ces cellules possèdent un grand nombre des caractéristiques phénotypiques et génétiques des cellules de foie humain normal sans posséder de séquences virales. Elles sont souvent utilisées comme substitut du foie.

Les hépatocytes C3a peuvent assurer de nombreuses fonctions métaboliques essentielles. Ils synthétisent des protéines comme l'albumine, la transférine, le fibrinogène et les facteurs de coagulation spécifiques du foie. A confluence, il apparaît une augmentation de la production d'albumine. Ils sont capables d'assurer des fonctions de biotransformation comme la conversion de l'ammoniac en urée et d'acide glutamique en glutamine mais aussi de transformer les acides aminés aromatiques en urée. Dans le cadre d'un modèle *in vitro*, ces cellules sont intéressantes car elles peuvent être maintenues en culture cellulaire à haute densité avec une morphologie bien préservée et une forte expression des fonctions hépatiques spécifiques (en particulier dans les activités de biotransformation) car elles possèdent une forte inhibition de contact (inhibition de la division par le contact entre deux cellules).

En culture, les hépatocytes C3a montrent une surface cellulaire complètement recouverte de microvillosités. Ils possèdent un grand nombre de grains de glycogène formant des rosettes éparpillées dans tout le cytoplasme, un réticulum endoplasmique rugueux bien

délimité et un appareil de Golgi avec des vésicules d'exocytose. Des gouttes de lipides de différentes tailles, des lysosomes et peroxyosomes sont présents dans le cytoplasme. Une fois une monocouche à confluence formée, des desmosomes, des jonctions serrées et des structures intercellulaires avec d'abondantes microvillosités et ressemblant aux canalicules biliaires sont clairement observables.

## **4.2.Evaluation des performances d'un foie bioartificiel**

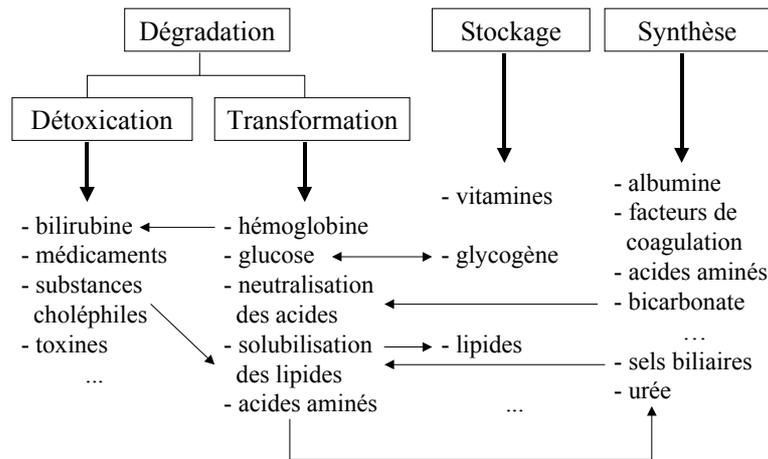
### **4.2.1.En conditions « cliniques »**

L'évaluation de l'efficacité d'un foie bioartificiel est corrélée à la capacité des cellules hépatiques choisies, quelle que soit leur origine, à assurer les fonctions indispensables au maintien de la vie du patient. Une première approche consiste à tester directement le système de suppléance hépatique dans des conditions cliniques sur des animaux ou des hommes en insuffisance hépatique. C'est le cas de quelques systèmes que nous avons précédemment décrits au chapitre I paragraphe 1.3. L'évolution de l'insuffisance hépatique est alors suivie par la mesure des constantes biologiques du patient comme les transaminases et les phosphatases alcalines. On peut aussi suivre l'évolution des éléments jouant un rôle dans l'encéphalopathie hépatique (lactates, ammoniémie) (108). Toutefois, cette approche globale ne permet pas de savoir ce qui se passe au niveau du système de suppléance par lui-même, d'en apprécier les performances intrinsèques. Il n'est pas facile de distinguer la part relative du système bioartificiel dans l'amélioration des constantes du patient traité par rapport à celle du foie du patient qui, malgré la maladie peut continuer à remplir une partie de ses fonctions. De plus, ces dispositifs sont le plus souvent mis en œuvre en même temps que les techniques de réanimation ce qui complique encore plus l'évaluation de l'efficacité réelle du système de suppléance.

### **4.2.2.En conditions « expérimentales »**

Une seconde approche consiste à mettre en place un modèle *in vitro* d'évaluation de l'efficacité du système dans lequel le plasma du patient est remplacé par un milieu de culture

de composition définie (137). Cette méthode permet de suivre directement les performances du système étudié en termes de métabolisme et de synthèse. Evaluer le fonctionnement d'un foie bioartificiel *in vitro* est un véritable challenge car il n'existe pas un « unique marqueur » pour quantifier la fonction hépatique. De plus, le large éventail de fonctions assurées par le foie rend l'exploration de celles-ci impossible en totalité (Figure 22).



**Figure 22 : Les grandes fonctions hépatiques**

Une méthode rapide pour estimer l'intégrité de la membrane plasmique des hépatocytes est de déterminer le pourcentage de cellules excluant le bleu trypan par les hépatocytes. Ce produit, non toxique pour la cellule, a tendance à y pénétrer. Les cellules viables ont des mécanismes de perméabilité sélective interdisant l'internalisation du colorant. Les cellules en mauvais état ou mortes présentant des altérations de la membrane plasmique deviendront perméable au colorant. Il est facile, par observation au microscope, de distinguer les cellules perméables et imperméables au bleu trypan. Ce test est largement utilisé.

Une autre possibilité pour mesurer la viabilité cellulaire est de réaliser un test MTT (ou Bromure de 3(4.5-diméthylthiazol-2-yl)-2.5-diphényltétrazolium) qui donne une indication du fonctionnement mitochondrial. Le principe du test consiste à mesurer l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes. Cette enzyme, par coupure du cycle tétrazolium, transforme le MTT, de couleur jaune, en cristaux de formazan bleus. Après dissolution de ces cristaux, une lecture spectrophotométrique est réalisée. Les densités optiques obtenues sont directement proportionnelles au nombre de cellules vivantes.

Ceci, cependant, n'est pas une confirmation que les hépatocytes pourront assurer les nombreuses fonctions indispensables à la survie du patient.

### **4.3. Marqueurs de l'activité métabolique**

Il est nécessaire de cibler quelques fonctions représentatives du métabolisme hépatique. Il est intéressant d'évaluer aussi bien les capacités de synthèse que de biotransformation. Ce paragraphe a pour but de présenter les marqueurs les plus décrits dans la littérature ainsi que les méthodes de dosages qui leur sont associées.

#### **4.3.1. Détoxication hépatique**

La plupart des transformations de composés toxiques en dérivés atoxiques ont lieu dans le foie. La transformation est liée aux enzymes microsomiales du réticulum endoplasmique. Les réactions les plus fréquentes sont les réactions d'oxydoréduction. La chaîne comporte un coenzyme, le NADPH, et un transporteur d'électron, le cytochrome P450. Cette voie est souvent appréciée grâce à l'utilisation de la lidocaïne (138) (139; 140). On réalise un test de clearance de la lidocaïne c'est à dire de sa prise en charge par les hépatocytes. Dans la plupart des cas, la fin de la transformation est une conjugaison, telle la glycuconjugaison grâce à une glycuronyltransférase.

Le dosage de la lidocaïne repose sur le principe de la polarisation de la fluorescence. Lorsqu'une molécule fluorescente ou fluorophore, est irradiée par une lumière de longueur d'onde appropriée (longueur d'onde d'excitation), une partie de cette lumière est absorbée. La lumière absorbée est émise quelques nanosecondes plus tard, mais à une longueur d'onde plus élevée (longueur d'onde d'émission). Cette technique est difficile à mettre en oeuvre en routine car elle nécessite le marquage préalable de la lidocaïne à la fluorescéine.

#### **4.3.2. Le métabolisme protidique**

Le dosage des protéines plasmatiques est souvent réalisé (63) (141) (142). On observe une diminution du taux de ces protéines en cas d'insuffisance hépatique. Parmi l'ensemble des protéines synthétisées par le foie, l'albumine est plus particulièrement étudiée (49; 53; 140; 143).

Il existe différentes méthodes colorimétriques pour le dosage des protéines totales :

La méthode du Biuret : en milieu alcalin, le cuivre divalent réagit avec les liaisons peptidiques des protéines pour former le complexe Biuret de coloration violacée caractéristique. Le tartate de potassium et de sodium empêchent la précipitation de l'hydroxyde de cuivre et l'iodure de potassium empêche l'autoréduction du cuivre. L'intensité de la couleur est directement proportionnelle à la concentration en protéines. Elle se mesure par l'augmentation de l'absorbance à 552 nm. Cette méthode, bien qu'utilisée par certains groupes, ne semble pas adaptée à la détection de faibles quantités de protéines.

La méthode de Bradford est basée sur l'utilisation d'un colorant, le bleu de Coomassie, qui se fixe de façon privilégiée sur les protéines, grâce à des interactions électrostatiques avec les groupements cationiques de celles-ci. En milieu acide, ce colorant s'adsorbe sur les protéines et cette complexation provoque un transfert de son pic d'adsorption qui passe du rouge au bleu à 595 nm. C'est une méthode très sensible (2-5 µg de protéines).

Une autre possibilité consiste à étudier l'incorporation d'un acide aminé marqué (63) comme la méthionine <sup>35</sup>S.

De même, il existe différentes techniques pour le dosage de l'albumine :

La quantité d'albumine sécrétée est le plus souvent mise en évidence par un test quantitatif de détection de l'albumine très sensible et très spécifique. Le test ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay) qui utilise une combinaison de deux anticorps dirigés contre l'albumine humaine. Cette méthode de dosage immunoenzymatique permet de doser avec une très bonne sensibilité des constituants d'intérêt biologique comme l'albumine.

La quantité d'albumine peut aussi être estimée par un test d'immunodétection au vert de bromocrésol. L'albumine à pH 4,3 est suffisamment cationique pour se fixer au colorant anionique vert de bromocrésol (BCG) et former un complexe de coloration bleu vert. L'intensité de la coloration bleu vert est directement proportionnelle à la concentration en albumine dans l'échantillon. Elle se mesure par l'augmentation de l'absorbance à 629 nm. Cette technique est cependant moins sensible que le test ELISA.

### **4.3.3. Produits d'élimination du métabolisme azoté**

#### **4.3.3.1. L'UREE**

La formation de l'urée (141; 143; 144) a lieu au niveau du foie, comme l'ont montré diverses observations et expérimentations (Figure 23). Si on perfuse un foie isolé avec une solution contenant  $\text{NH}_3$ , le liquide à la sortie ne contient plus de  $\text{NH}_3$  mais de l'urée. Krebs et Henseleit réussirent à obtenir la formation d'urée par des coupes de foie de rat et montrèrent que l'arginase catalyse la production d'urée à partir d'arginine. Mais il n'y avait pas assez d'arginine libre pour expliquer la production d'urée par l'hydrolyse de cet acide aminé et on arriva ainsi à l'idée que l'arginine agit de façon catalytique. On devait s'apercevoir ensuite que d'autres acides aminés, ornithine et citrulline, agissent de même et Krebs proposa le mécanisme connu sous le nom de cycle de l'urée ou encore cycle de Krebs (145).

L'urée provient du catabolisme de toutes les fonctions azotées des protéines et des acides aminés par deux mécanismes : transamination et désamination. 95 % de l'uréogénèse se fait au niveau du foie et d'une manière très active. La diminution du taux de l'urée sérique ne s'observe qu'à la phase terminale d'une hépatite suraiguë.

Encore une fois, la méthodologie de dosage la plus répandue repose sur l'utilisation d'une enzyme, l'uréase.

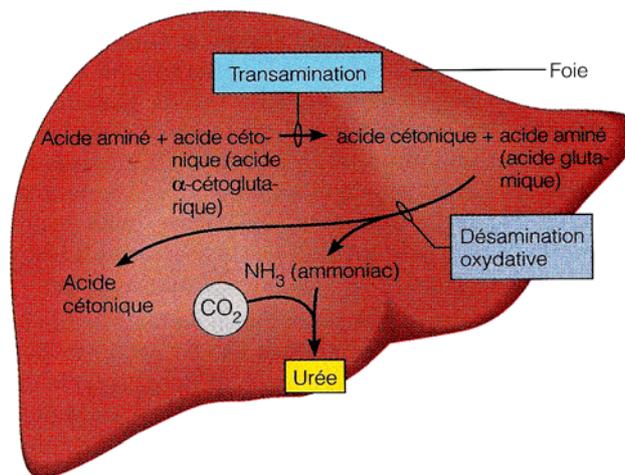
#### **4.3.3.2. L'AMMONIAC**

Dans la plupart des tissus, la désamination des acides aminés conduit à la formation d'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ) (Figure 23). Cet ammoniac toxique est pris en charge par l'acide

glutamique pour former la glutamine. Dans le foie, l'ammoniac produit par la glutamate deshydrogénase est directement déttoxié dans le cycle de l'urée (145).

Les taux d'ammoniac (139) (144) circulant reflètent l'activité du cycle de l'urée dans ses rapports avec le métabolisme du glucose, des protéines et des acides nucléiques. Par conséquent, la teneur du plasma en ammoniac sert d'indicateur de l'altération de la cellule hépatique et du coma hépatique qui peut éventuellement en résulter. Des taux d'ammoniac anormalement élevés se rencontrent dans la nécrose hépatique aiguë, la cirrhose portale au stade terminal et d'autres troubles hépatiques graves. Comme pour la lidocaïne, on pourra étudier la clearance de l'ammoniac par les hépatocytes.

Les méthodologies décrites dans la littérature reposent sur une méthode enzymatique, la glutamate deshydrogénase (GLDH).



**Figure 23 : Représentation simplifiée des processus Aboutissant à la formation d'ammoniac et d'urée (4)**

#### 4.3.4. Le métabolisme des lipides

Deux tests permettent d'explorer le rôle du foie dans le métabolisme des lipides : le dosage du cholestérol libre et le dosage du cholestérol estérifié du plasma (146) (147). En effet, le foie intervient dans la synthèse du cholestérol et joue un rôle essentiel dans son estérification. Des taux élevés de cholestérol peuvent accompagner les cas de diverses maladies hépatiques. Des taux faibles sont observés dans le cas de maladies graves du foie. Le

dosage le plus souvent pratiqué est celui du cholestérol sérique (libre) par un test colorimétrique enzymatique (CHOD/PAP) à la cholestérol estérase, la cholestérol oxydase et la 4-aminoantipyrine.

#### **4.3.5.Le métabolisme glucidique**

Après passage de la barrière intestinale, les hexoses (glucose, galactose et fructose) sont transportés par le système porte vers le foie ou ils sont transformés après différentes étapes en glycogène, réserve qui permet à l'organisme de puiser le glucose dont il a besoin. Après ajout d'une quantité déterminée de glucose dans le milieu, on peut en suivre la disparition en supposant que celle ci est le reflet de la formation de glycogène (147) (139). La méthodologie de référence est une méthode enzymatique à l'hexokinase.

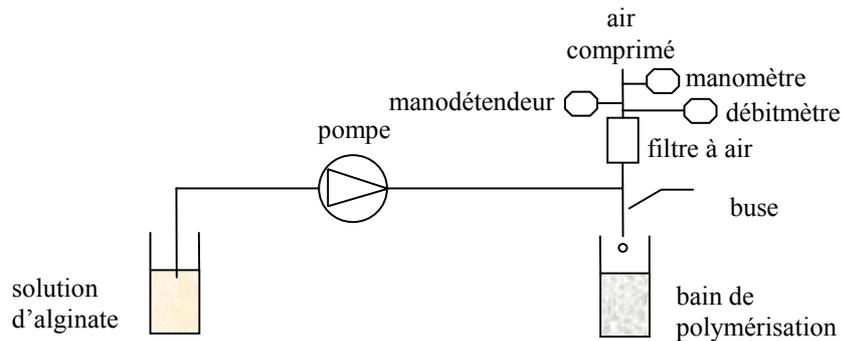
# Chapitre II : Matériels et méthodes

---

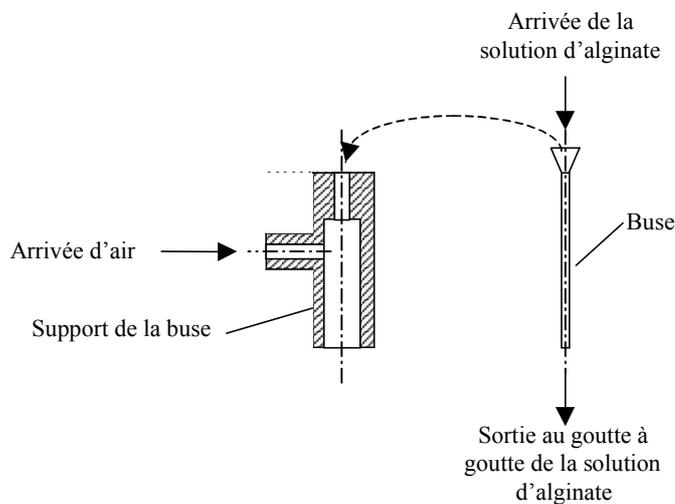


## 1. Protocole de production de billes d'alginate sans cellules

La méthode de production choisie est la méthode d'extrusion avec adjonction d'un flux d'air coaxial (Figure 24 et 25). Le générateur de billes utilisé a été conçu et développé dans le cadre de cette thèse.



**Figure 24 : Banc expérimental pour la production de billes d'alginate**



**Figure 25 : Schéma descriptif de la buse**

La pompe péristaltique (ISMATEC IPC) alimente le circuit de production de billes (5 ml/min) placé sous hotte à flux laminaire. Le débit du flux d'air coaxial est indirectement contrôlé par une mesure de pression par un manomètre. Pour former une bille de 2 millimètres, le débit du flux d'air coaxial est fixé à 5 ml/min contre 12,5 ml/min pour une bille de 1 millimètre. La distance de chute est de 10 centimètres.

La solution d'alginate (Sigma) tombe dans 150 ml d'un bain de réticulation (chlorure de calcium ; 17g/l ; pH 7,4 ; 20 °C). Le temps d'immersion est de 15 minutes. Les billes sont ensuite rincées par deux fois dans du sérum physiologique. Le stockage se fait dans cette même solution à 4 ° C.

- Composition de la solution à extruder : pH 7,4 ; stérile (filtration sur filtre 0,45µm)

NaCl 154 mM

Hepes 10 mM

Alginate 2,2 %

- Composition du bain de réticulation : pH 7,4 ; stérile (autoclave)

NaCl 154 mM

Hepes 10 mM

CaCl<sub>2</sub> 75 mM

- Composition de la solution de sérum physiologique : pH 7,4 ; stérile (autoclave)

NaCl 154 mM

Hepes 10 mM

KCl 2,7 mM

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12H<sub>2</sub>O 0,28 mM

## **2.Culture d'hépatocytes C<sub>3a</sub>**

La mise en place de ce protocole a été rendue possible par la collaboration avec l'équipe du PR. M.D.Nagel à l'UTC. Les cellules de foie humain C<sub>3a</sub> fournies par ATCC (American Type Culture Collection) sont cultivées dans du milieu Minimum Essential Medium Earles salts, L-glutamine (Gibco) complétementé avec 1 % de solution 100 x concentrée de pénicilline, 1 % de solution de Non-essential Amino Acids (Gibco), 1 % de Hepes Buffer solution 1 M (BicoBRL), 1 % sodium pyruvate 100 mM (GibcoBRL) 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.

La culture d'hépatocytes humain C<sub>3a</sub> n'est pas aisée. Il convient de respecter certaines règles :

- Les hépatocytes C<sub>3a</sub> présentent des difficultés à adhérer à la surface des boîtes ou flacons de culture. Lorsqu'un type de boîte (marque) paraît adapté, il convient de ne pas en changer. Nous avons utilisé des boîtes de marque Falcon.
- Le milieu de culture doit être renouvelé tous les 3 jours. Si le milieu est renouvelé régulièrement et en quantité suffisante (20 ml de milieu de culture pour une boîte de 75 cm<sup>3</sup>), les cellules peuvent être maintenues quelques semaines (au maximum 3) à confluence, (c'est à dire lorsque les cellules recouvrent entièrement le fond de la boîte de culture).
- Les passages (multiplication des cellules par division d'une population mère) doivent être effectués à une densité suffisante (5 millions de cellules par boîte de 75 cm<sup>3</sup>) pour assurer une reprise de la division dans la boîte de repiquage. La dissociation des cellules doit être poursuivie jusqu'au stade 2 à 3 cellules. Les amas cellulaires résultants d'une mauvaise dissociation, après adhésion sur la surface de la boîte, voient leur viabilité chuter entraînant avec eux l'ensemble des cellules de la boîte. Le temps nécessaire à l'adhésion des cellules à la surface de la boîte de culture est comprise entre 12 à 15 heures.
- Après décongélation, les mêmes consignes doivent être appliquées. Il faut souligner que les hépatocytes C<sub>3a</sub> sont longs à reprendre leur division après décongélation. De plus, avant utilisation de ceux-ci, il convient d'effectuer un minimum de 2 passages afin que les cellules retrouvent une activité métabolique satisfaisante.

### **3. Protocole de bioencapsulation**

#### **3.1. Dissociation des cellules**

Les hépatocytes C<sub>3a</sub> à confluence (environ 15 à 20 millions de cellules par boîte), adhérents à la boîte de culture, sont lavés 1 fois avec une solution de trypsine EDTA (0,225%) à 37 ° C puis incubés avec 3 ml de trypsine EDTA pendant 5 à 10 minutes à 37 ° C. La

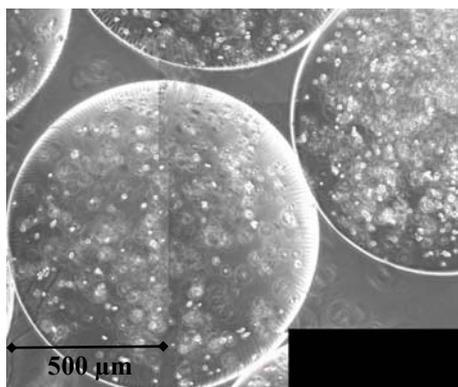
dissociation est suivie régulièrement sous microscope à contraste de phase. Les cellules sont reprises dans 7 ml de milieu de culture MEM SVF 10 %. Une dissociation mécanique est assurée par pipetage jusqu'au stade 3 cellules. Une numération est pratiquée à l'aide d'une cellule de Malassez. La viabilité cellulaire est mesurée par un test au bleu trypan.

### **3.2.Préparation du mélange alginate-hépatocytes**

Le contenu du flacon est transféré dans un tube puis centrifugé à 1000 tours par minute pendant 5 minutes à 4 ° C. Le culot cellulaire est suspendu dans 1 ml de solution de préparation de gel alginate (NaCl 154 mM ; Hepes 10 mM) pH 7,4 à 37 ° C puis mélangé dans 9 ml de gel alginate (NaCl 154 mM ; Hepes 10 mM ; Concentration finale d'alginate 2,2 %) à 37 ° C. La solution résultante est homogénéisée délicatement en évitant la formation de bulles.

### **3.3.Coulage des billes**

La formation des billes est décrite au paragraphe 1. Le temps d'immersion de 15 minutes dans le bain de chlorure de calcium est décompté à partir de la dernière bille formée. Après élimination du bain de chlorure de calcium, les billes sont rincées 2 fois avec une solution physiologique (NaCl 137 mM ; Hepes 10 mM ; KCl 2,7 mM ; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,28 mM) pH 7,4 à 4 ° C, puis 1 fois avec du MEM Earles salts, L-glutamine à 37 ° C. Les billes sont mises en culture dans 30 ml de MEM SVF 10 % à 37 ° C (Figure 26).



**Figure 26 : Billes d'alginate hébergeant des hépatocytes C3a  
(Microscopie optique ; grossissement x 100)**

### **3.4.Evaluation du nombre de cellules et de leur viabilité.**

Sur fond de boîte, le nombre de cellules et leur viabilité sont évaluées par comptage en cellules de Malassez et par un test au bleu trypan, après détachement des cellules par trypsination au terme de la manipulation.

Le rendement d'encapsulation, c'est à dire le nombre de cellules encapsulées par rapport au nombre de cellules contenues dans le culot cellulaire de départ, a été déterminé. Pour chaque mesure, 50 billes sont isolées puis incubées dans 5 ml de citrate de sodium (chélateur de calcium) pH 7,4 pendant 15 minutes à 37 ° C sans agitation. Les billes sont complètement dissoutes par rupture des liaisons calcium. On ajoute 5 ml d'une solution physiologique (NaCl 137 mM ; Heps 10 mM ; KCl 2,7 mM ; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,28 mM). La solution est centrifugée 5 minutes à 1000 tours par minute. Le test au bleu trypan a été préféré au test MTT pour l'évaluation de la viabilité cellulaire. En effet, ce colorant vital présente l'avantage de ne pas réagir avec l'alginate au contraire du MTT. Après élimination du surnageant, les cellules sont suspendues dans 200μl de PBS puis incubées avec 50μl de bleu trypan pendant 7 minutes et enfin comptées en cellule de Malassez.

- Solution de citrate de sodium : pH 7,4 ; stérile (filtration sur filtre 0,22μm)

|                          |         |
|--------------------------|---------|
| Sodium citrate (hydrous) | 23,3g/l |
| Citric acid (hydrous)    | 3,27g/l |
| Sodium biphosphate       | 2,22g/l |
| Dextrose                 | 25g/l   |
| Adenin                   | 0,27g:l |

## **4. Contrôle de la qualité des billes produites**

### **4.1. Homogénéité des lots de billes produites**

La répartition des diamètres des billes produites est étudiée grâce à un compteur COULTER<sup>®</sup> COUNTER Multisizer IIe disponible dans le laboratoire « Biomatériaux Biocompatibilité » du Pr. MD Nagel. Cet appareil permet d'évaluer, avec une grande précision, à la fois le diamètre moyen et le nombre des particules présentes dans une solution. Pour pouvoir réaliser notre étude, l'appareil est équipé d'une sonde avec une ouverture de 2 mm.

Pour les expérimentations de chargement, le contrôle du diamètre et de la forme se fait grâce à l'utilisation d'un système d'acquisition vidéo. On place la bille à tester à côté et dans le même plan qu'une bille en carbure de tungstène de taille connue (2,5 mm de diamètre). Après acquisition de l'image, on pourra, à l'aide d'un logiciel de traitement d'image (Scion image), déterminer la taille et la forme de la bille avec une grande précision grâce à la correspondance pixel/mm.

En routine, le contrôle du diamètre et de la forme des billes est réalisé avec un pied à coulisse de précision sur un échantillon de 50 unités sous loupe binoculaire.

## **5. Morphologie des hépatocytes encapsulés par Microscopie Electronique à Balayage**

La morphologie des hépatocytes au sein de la bille d'alginate a été étudiée par Microscopie Electronique à Balayage (Microscope électronique à Balayage Philips XL 30 ESEM FEG). Ce microscope est disponible au Service d'Analyse Physico-Chimique (SAPC) de l'Université de Technologie de Compiègne.

Les billes sont lavées avec de l'eau ultra pure afin d'éliminer d'éventuels cristaux de sel sur les surfaces. Elles sont ensuite fixées dans une solution de PBS glutaraldéhyde 2,5 %. La fixation est initiée à température ambiante puis poursuivie par un stockage dans le fixateur pendant 7 jours à 4°C. Les billes sont déshydratées dans une série de bains d'éthanol de pureté croissante (30,50,70,90,95 puis 100°). Le temps de contact pour chaque dilution est de 10 minutes à température ambiante. Après cela, les billes sont traitées avec du dioxyde de carbone liquide à l'aide d'un sécheur au point critique. Les échantillons sont recouverts d'une fine couche d'or. Les échantillons sont examinés par MEB avec un grossissement allant de x 1000 à x 5000 à un voltage de 15,0 kv.

## **6.Montage expérimental « Foie bioartificiel »**

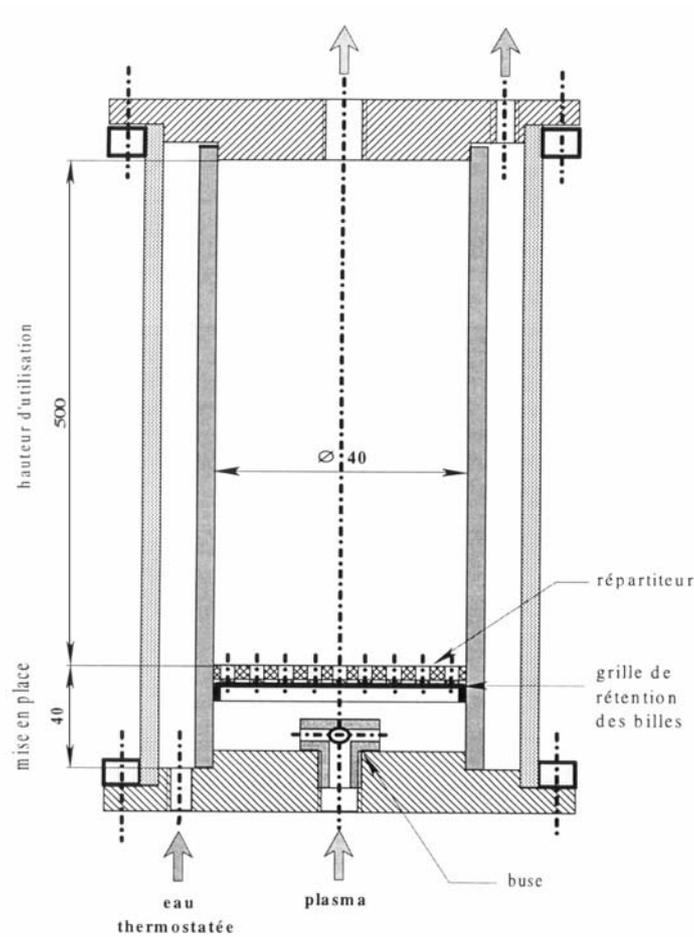
### **6.1.Les bioréacteurs à lit fluidisé**

Pour réaliser nos expérimentations, nous disposons de deux bioréacteurs :

1. Un bioréacteur taille 1.
2. Un bioréacteur taille ¼.

#### **6.1.1.Le bioréacteur taille 1**

Ce bioréacteur a été mis au point lors de la thèse de doctorat d'E. Doré (1) au sein de notre laboratoire (Figure 27). A l'entrée du bioréacteur, le fluide passe par une buse puis un répartiteur (plaque perforée) afin d'avoir une meilleure répartition des vitesses sur la section. Dans ces conditions, le lit est proprement perfusé et les risques de passages préférentiels sont minimisés. La buse et le répartiteur sont suffisamment perforés pour ne pas créer de pertes de charge importantes. Enfin, par mesure de sécurité, une grille de rétention est située entre la buse et le répartiteur empêchant les billes de descendre sous le répartiteur.



**Figure 27 : Foie bioartificiel à lit fluidisé**

Le débit plasmatique traversant le bioréacteur est compris entre 30 à 50 ml/mn (soit une vitesse d'entrée comprise entre 0,4 et 0,7 mm/s) ;

Une chemise extérieure permet de gérer la température, à 37°C dans le cas réel pour limiter les pertes caloriques ;

Les billes d'alginate ont un volume apparent total compris entre 300 et 400 ml ;

Le volume du bioréacteur est de 628 ml pour un diamètre interne de 40 mm ;

Le volume mort est compris entre 228 et 338 ml.

### 6.1.2. Le bioréacteur taille ¼

Le modèle à échelle réduite (1/4) répond aux mêmes exigences techniques dictées par le cahier des charges que le bioréacteur taille 1. Le volume interne est divisé par 4 mais il contient une quantité de billes équivalente au cas réel. Le volume de billes est de 87,5 ml (soit l'équivalent de 350 ml dans le modèle à échelle 1). La vitesse du fluide à l'intérieur du

bioréacteur est comprise entre 0,4 et 0,9 mm/s pour des débits de 10 à 24 ml/min. Le fluide circule correctement entre les billes et donc toutes les billes sont utilisées. Le volume du bioréacteur est de 157 ml pour un diamètre interne de 26 mm.

## 6.2. Comportement des billes en lit fluidisé

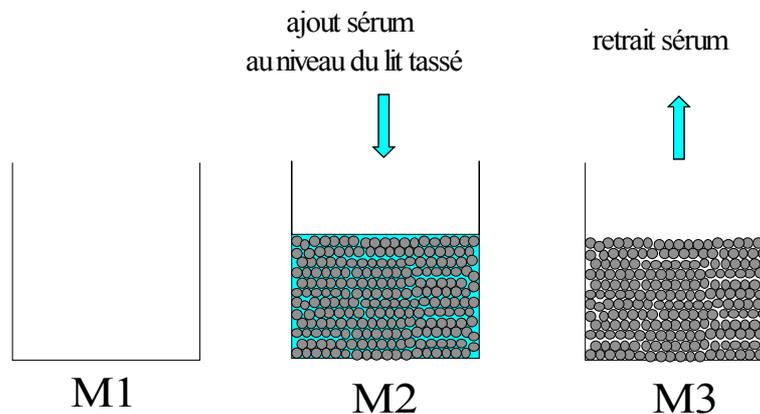
Nous nous intéressons plus spécifiquement à l'effet sur la fluidisation :

1. Du fluide de perfusion du bioréacteur
2. De la présence de cellules dans les billes.

Bien que le comportement du lit de billes soit comparable au sein de nos deux bioréacteurs, taille 1 et 1/4, en régime dynamique, notre choix s'est porté sur le bioréacteur taille 1 afin de nous approcher au plus près des conditions rencontrées en clinique.

### 6.2.1. Caractérisation des phases

#### 6.2.1.1. DETERMINATION EXPERIMENTALE DE LA POROSITE INITIALE DU LIT TASSE



**Figure 28 : Méthode de détermination de  $\varepsilon_0$  en fonction des volumes et des masses volumiques des deux phases.**

On a :

$$\varepsilon_0 = \frac{V_{\text{sérumphy}}}{V_{\text{sérumphy}} + V_{\text{billes}}} \quad \text{soit,} \quad \varepsilon_0 = \frac{\rho_s(M2 - M3)}{\rho_s(M2 - M3) + \rho_f(M3 - M1)}$$

La masse de billes pour ces mesures est en moyenne de l'ordre de 12 g (Figure 28). Cette masse est volontairement élevée pour minimiser les erreurs car, expérimentalement, le volume de fluide entre les billes est impossible à enlever en totalité. Pour une masse de billes trop faible, l'erreur relative serait d'autant moins négligeable. Sur 30 échantillons, on obtient  $\varepsilon_0 = 30 \%$  avec une erreur de  $\pm 3 \%$ .

### **6.2.1.2.MESURE DE LA POROSITE DU LIT FLUIDISE DE BILLES**

Une règle en papier millimétré est collée sur le bioréacteur afin de lire à tout moment la hauteur fluidisée  $h_f$  du lit de billes. Cette hauteur permet de calculer la porosité  $\varepsilon$  du lit connaissant la section ( $S$ ) du bioréacteur, par conservation du volume de billes on a :

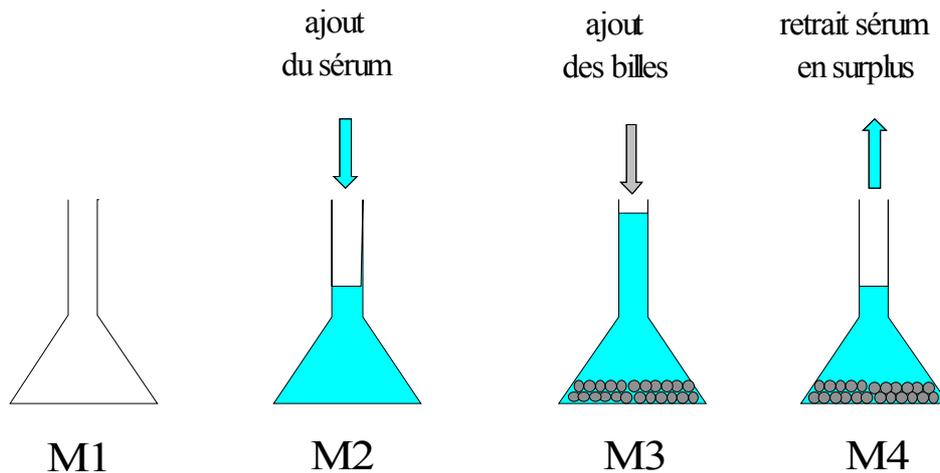
$$(1 - \varepsilon_0)h_0S = (1 - \varepsilon)h_fS \Rightarrow \varepsilon = 1 - (1 - \varepsilon_0)\frac{h_0}{h_f} \quad (\text{II.1})$$

Par ailleurs, connaissant le débit de liquide  $q$  entrant dans le bioréacteur, on peut déterminer la vitesse superficielle du fluide  $u$  (ou vitesse d'entrée)

$$u = \frac{q}{S} \quad (\text{II.2})$$

### **6.2.1.3.MESURE DE LA VISCOSITE ET DE LA MASSE VOLUMIQUE DES PHASES EMPLOYEES**

La viscosité du milieu physiologique, du milieu de culture et du sérum de veau foetal à  $37^\circ\text{C}$  a été mesurée à l'aide d'un viscosimètre Thermohaake RheoWin. La masse volumique est obtenue par pesée sur différents lots de billes et de fluides (figure 29) à l'aide d'une balance de précision Sartorius MC1 et de fioles jaugées (environ 30 échantillons pour chaque essai).



**Figure 29 : Méthode de détermination des masses volumiques des billes par pesée**

Les fioles jaugées ont un volume  $V$  de 10 ml et le volume des billes est en moyenne de l'ordre de 2 ml. Nous avons ainsi déterminé les masses volumiques moyennes des billes  $\rho_s$  (solide) par substitution :

$$\rho_f = \frac{M_2 - M_1}{V} \quad \text{et} \quad \rho_s = \frac{M_3 - M_2}{M_3 - M_4} \times \frac{M_2 - M_1}{V} \quad (\text{II.3})$$

### 6.2.2. Fluide de perfusion

La caractérisation du comportement des billes d'alginate en lit fluidisé dans le bioréacteur est réalisée pour différents fluides. La démarche consiste à complexifier le fluide de perfusion jusqu'à se rapprocher des conditions cliniques. Ce protocole nous permettra de comparer le comportement global du lit en fonction de la nature du fluide. Chaque manipulation de fluidisation est menée pendant 6 heures correspondantes à la durée journalière du traitement par le foie bioartificiel à lit fluidisé. Chaque manipulation est menée avec un lot de billes neuves.

#### 6.2.2.1. SOLUTION PHYSIOLOGIQUE

Le bioréacteur est perfusé par une solution de sérum physiologique à 20 ° C (afin de respecter une viscosité équivalente à celle du plasma à 37 ° C). Les mesures effectuées avec des billes vides par E. Doré (1), ont permis d'établir une corrélation simple entre  $h/h_0$  et les

vitesses d'entrée  $u : h/h_0=1+359,5u$  avec  $u$  en m/s. L'évolution du lit de billes vides dans ce milieu nous servira de référence. Ces expérimentations ont été reproduites mais ne sont pas présentées dans la présente étude.

#### **6.2.2.2.MILIEU DE CULTURE COMPLET (MEM SVF 10%)**

Afin de vérifier une possible influence du fluide de perfusion, le bioréacteur a cette fois-ci été perfusé à l'aide du même milieu que celui servant à la culture des hépatocytes C3a, Minimum Essentiel Medium Sérum de Veau Fœtal 10 % à 37°C. La présence de sérum de veau fœtal, milieu biologique riche en protéines, rend ce milieu plus complexe sur le plan rhéologique (notamment en terme de masse volumique et de viscosité). Le bioréacteur est chargé d'un volume apparent de billes vides de 100 ml contre 350 ml normalement afin de pouvoir appliquer une gamme de vitesses d'entrée supérieures (la limite est fixée à 4 mm/sec contre 0,7 mm/s habituellement).

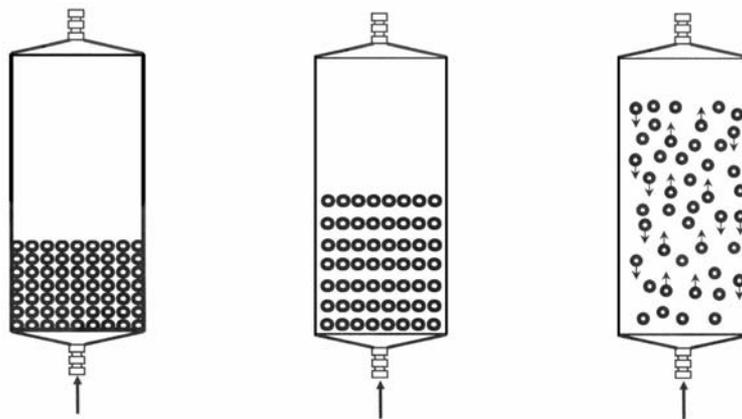
#### **6.2.2.3.SERUM DE VEAU FŒTAL (SVF)**

Le but de notre étude est d'évaluer le comportement du lit fluidisé dans des conditions expérimentales se rapprochant au mieux des conditions cliniques. Le plasma est le choix idéal. Malheureusement, il n'a pas été possible d'obtenir de plasma en quantité suffisante pour réaliser nos expérimentations (800 ml par manipulation). Il a donc fallu choisir un fluide de substitution. Notre choix s'est porté sur du sérum de veau fœtal car la composition de ces deux milieux est similaire, la seule différence existante étant l'absence de fibrinogène dans le sérum. Cependant, il faut garder à l'esprit que la quantité de protéines présente dans le plasma est supérieure à celle du sérum fœtal. L'utilisation de ce milieu nous permet de déduire une tendance pour le comportement du lit dans un milieu biologique riche en protéines mais en aucun cas de conclure sur les conditions de fluidisation rencontrées avec du plasma.

#### **6.2.3. Effet de la présence de cellules dans les billes**

Il n'a pas été retenu de perfuser des billes d'alginate hébergeant des cellules par un sérum physiologique, mais par du milieu de culture, pour ne pas compromettre la viabilité ni le métabolisme cellulaire. De plus, des manipulations préliminaires ont montré que le comportement global du lit de billes perfusé par du sérum physiologique et du milieu de culture était proche.

Ainsi, afin de maximiser l'effet de la présence de cellules dans les billes d'alginate en terme de fluidisation (Figure 30), le nombre de cellules par bille a été augmenté de façon significative (de 1000 à 3000). La faible disponibilité des hépatocytes nous a conduits à utiliser pour ces manipulations une autre lignée cellulaire, des fibroblastes L 929, ayant une cinétique de prolifération plus rapide que la lignée C3a.



**Figure 30 : Evolution de la hauteur du lit de billes (démarrage (gauche) ; expansion (milieu) ; stabilisation(droite))**

Les billes sont rincées puis introduites dans le bioréacteur. Le volume apparent de billes est de 100 millilitres. Le patient est simulé par un réservoir contenant 120 millilitres de MEM SVF 10% à 37°C. Le volume circulant de milieu de culture est de 800 millilitres.

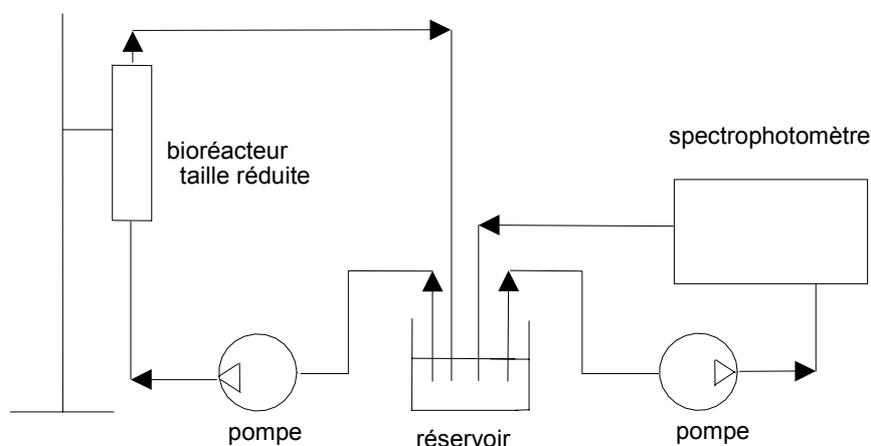
Après stabilisation du lit de billes, la hauteur de celui-ci est repérée visuellement grâce aux graduations prévues à cet effet sur le bioréacteur. Après démarrage de la pompe, l'évolution de la hauteur du lit est suivie toutes les minutes pendant les dix premières minutes puis toutes les cinq minutes jusqu'à sa stabilisation (30 minutes). Cette manipulation a été répétée pour différents débits de perfusion (31 à 164 ml/min).

Les résultats de cette manipulation seront comparés à ceux obtenus dans les mêmes conditions expérimentales mais avec des billes sans cellule (Témoin).

### 6.3. Etude des transferts de masse

Ici, le but est de mesurer l'influence du fluide de perfusion sur les transferts de matière d'un marqueur entre le fluide de perfusion et l'intérieur des billes. Lors de sa thèse de doctorat, E. Doré (1) a étudié les transferts de masse entre les billes vides et une solution de sérum physiologique en régime dynamique. Le but de ce chapitre est d'adapter ces manipulations avec du plasma bovin, disponible à l'époque de ces travaux.

Le bioréacteur de taille réelle n'est pas indispensable dans ce cas. On utilise le modèle à échelle réduite (1/4). On désigne par « **absorption** » le passage d'un soluté de l'extérieur vers l'intérieur de la bille. Dans ce cas, la solution de perfusion contient le soluté dont on veut étudier le transfert. Le terme « **relargage** » définit la sortie de ce même soluté de la bille. Le fluide de perfusion est alors le même mais sans le soluté. Ces deux étapes sont sous la dépendance du gradient de concentration du soluté. Ceci sera suivi en continu par spectrophotométrie, à l'aide de la mesure de la densité optique (DO).



**Figure 31 : Banc expérimental pour les manipulations de transfert de masse**

Les solutés utilisés et les conditions opératoires sont donnés dans le tableau 1

|               | Concentration<br>(g/l) | Poids moléculaire<br>(Da) | Longueur d'onde pour<br>le dosage (nm) |
|---------------|------------------------|---------------------------|--|
| Vitamine B 12 | 0,2                    | 1355                      | 550                                    |
| Cytochrome C  | 0,125                  | 12400                     | 410                                    |

**Tableau 1 : Solutés et conditions opératoires**

Ces deux solutés sont souvent employés dans les études portant sur l'évaluation des transferts de masse à travers une membrane semi-perméable.

Le volume total circulant dans le circuit est de 200 ml de plasma. Le débit de perfusion est de 16 ml/min (soit 0,6 mm/sec). Un réservoir, simulant le patient, contient une fraction du volume total (30 ml environ) au niveau duquel on place l'entrée et la sortie du bioréacteur. Comme le montre la figure 31, on mesure la baisse ou la hausse de concentration dans le réservoir grâce à une circulation parallèle dans une cuve en quartz à circulation (Hellma, volume 1,5 ml). Le débit de la pompe du circuit parallèle (Gilson Minipuls 2) est de 25 ml/min. Le temps de parcours entre le réservoir et la cuve est de 20 secondes. Les mesures sont donc décalées de ce temps par rapport à l'état réel dans le réservoir.

Les billes d'alginate vides (87,5 ml) sont versées dans le bioréacteur. Après stabilisation du lit de billes, le niveau est repéré grâce aux graduations prévues à cet effet sur la colonne. Ce volume apparent de billes est toujours le même et doit être respecté pour avoir les mêmes conditions initiales. Les billes étant dans une solution de conservation, il faut éliminer cette dernière par gravité en relâchant l'occlusion de la pompe principale. Le bioréacteur est ensuite rempli de la solution désirée par le flasque supérieur (plasma vitamine B12 ; Plasma Cytochrome C). Après 1 à 2 minutes, lorsque le lit est revenu au repos et après expulsion d'éventuelles bulles d'air, le circuit est mis en service et les mesures démarrent (une mesure de DO toutes les 20 ou 30 secondes). Après stabilisation de la concentration et du lit, le bioréacteur est vidé en conservant en son sein les billes pleines de solution, le circuit secondaire est rincé avec une solution physiologique. Ensuite 200 ml de plasma frais sont introduits dans la colonne afin de mesurer le relargage du marqueur. L'intérêt est de vérifier si un élément de poids moléculaire connu peut être absorbé puis relargué par les billes.

## **7. Etude du métabolisme des cellules encapsulées**

Le but de cette étude est de mettre en œuvre un modèle *in vitro* permettant d'évaluer les fonctions des hépatocytes C3a, dans des conditions opératoires différentes.

### 7.1.a.Trois types de mise en culture

Dans les conditions cliniques, le foie bioartificiel à lit fluidisé est destiné à traiter le patient par séance journalière de 6 heures. Un lot de billes neuves est utilisé par séance. La performance du bioréacteur en 6 heures sera évaluée par rapport au témoin (hépatocytes sur fond de boîtes) qui évalue la performance des cellules après 6 et 12 heures.

On distingue 3 cas :

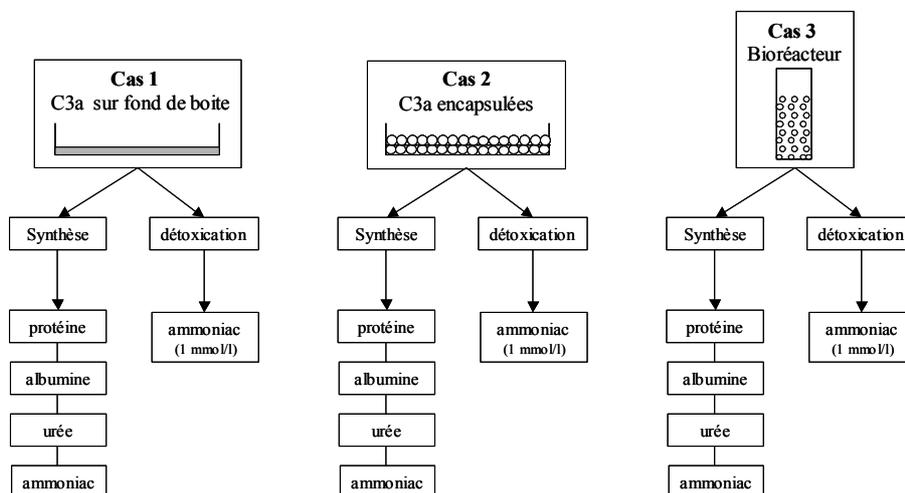
- **Le cas 1** : Evaluation des fonctions des C3a adhérentes sur fond de boîte de culture (durant 12 heures).
- **Le cas 2** : Evaluation des fonctions des C3a encapsulées dans des billes d'alginate placées dans un flacon de culture en conditions statiques (durant 12 heures).
- **Le cas 3** : Evaluation des fonctions des C3a encapsulées dans des billes d'alginate placées dans le bioréacteur en condition dynamique (durant 6 heures).

Les paramètres représentatifs du métabolisme hépatique étudiés sont la synthèse de protéines totales, d'albumine et la production d'urée et d'ammoniac. Les propriétés de détoxification des hépatocytes C3a seront suivies par leur capacité à prendre en charge l'élimination de l'ammoniac (Figure 32).

**Pour le cas 1**, une boîte de culture T 75 (Falcon) contenant des hépatocytes C3a à confluence est rincée deux fois avec du Minimum Essential Medium (MEM) à 37°C. Elles sont ensuite mises en culture dans 20 ml de milieu de culture complet (MEM SVF 10%). Pour chaque point de mesure, 1 ml de milieu est prélevé et immédiatement congelé. La valeur obtenue pour chaque marqueur considéré servira de valeur de référence.

**Pour le cas 2**, 20 millilitres de billes d'alginate hébergeant des hépatocytes ( $10^6$  cellules par millilitre d'alginate soit 1000 cellules en moyenne par bille) sont rincés deux fois avec du Minimum Essential Medium (MEM) à 37°C. Elles sont ensuite mises en culture dans 20 ml de milieu complet (MEM SVF 10%). Pour chaque point de mesure, 1 ml de milieu est prélevé et immédiatement congelé.

**Pour le cas 3**, le banc expérimental est identique à celui de l'étude des transferts de masse en régime dynamique mais le circuit parallèle de spectrophotométrie n'est pas mis en service. Les billes d'alginate hébergeant des hépatocytes (1000 cellules en moyenne par bille) sont rincées deux fois avec du Minimum Essential Medium (MEM) à 37°C. Elles sont ensuite mises en culture dans du milieu complet (MEM SVF 10%) puis versées dans le bioréacteur au niveau de sa partie supérieure. Après 1 à 2 minutes, lorsque le lit est revenu au repos et après expulsion d'éventuelles bulles d'air, on ferme la partie supérieure du bioréacteur. Le volume apparent de billes est toujours le même (60 ml) et doit être respecté pour avoir les mêmes conditions initiales à chaque manipulation. Le réservoir, contenant 15 millilitres de MEM SVF 10% thermostaté à 37°C, simule le patient. C'est à son niveau que sont prélevés les échantillons à doser. On suppose que les concentrations des molécules d'intérêts étudiées dans ce réservoir sont le reflet de celles au sein du bioréacteur. Le volume total de milieu est de 130 millilitres. Le débit est constant (30 ml/min soit 1 mm/sec). Le premier prélèvement ne sera effectué qu'après 15 minutes de fluidisation, temps nécessaire d'une part à la stabilisation du lit de billes et d'autre part à l'égalisation des concentrations dans les 2 compartiments. Comme pour les cas précédents, pour chaque point de mesure, 1 ml de milieu est prélevé et immédiatement congelé.



**Figure 32 : Organigramme récapitulatif des cas étudiés**

### 7.1.b. Elimination d'ammoniac par les hépatocytes C3a

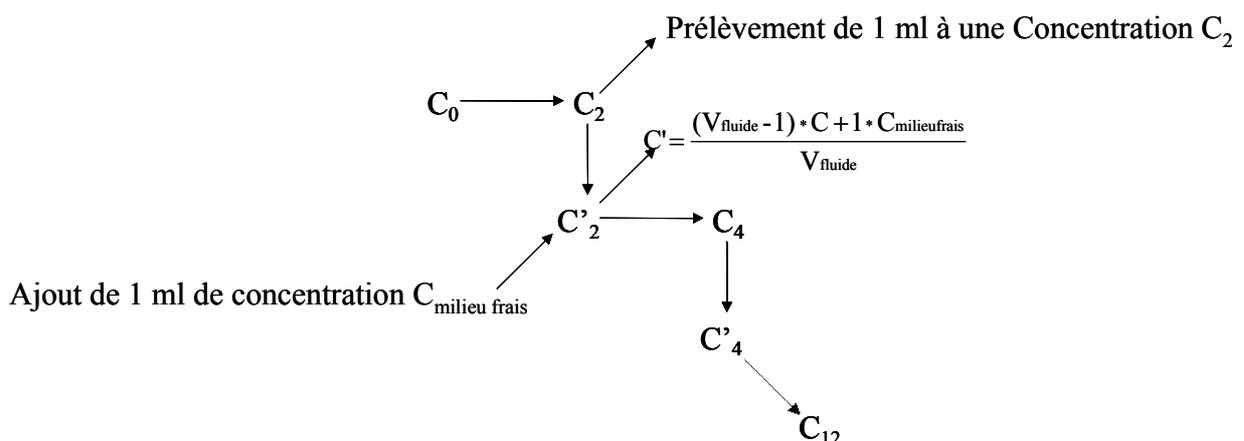
Les cas 1,2 et 3 sont reproduit en utilisant du MEM SVF 10 % complétement avec de l'ammoniac (Sigma) 1 mmol/l.

### 7.2. Exploitation des dosages

Dans les 3 cas, nous avons choisi de travailler à volume constant ( $V_{\text{fluide}}$ ). Ceci implique de remplacer chaque volume prélevé (1ml) de concentration  $C_{\text{prélèvement}}$  par un volume identique de milieu frais de concentration  $C_{\text{milieu frais}}$ . Ceci produit un effet de dilution après chaque prélèvement. Dans les cas 1 et 2, pour les protéines totales, l'albumine et l'urée, on effectue 3 prélèvements à 0, 6 et 12 heures. Pour l'ammoniac, les prélèvements sont effectués toutes les 2 heures pendant 12 heures. Dans le cas 3, pour les protéines totales, l'albumine et l'urée, on effectue 2 prélèvements à 0, 6 heures et toutes les 2 heures pendant 6 heures pour l'ammoniac.

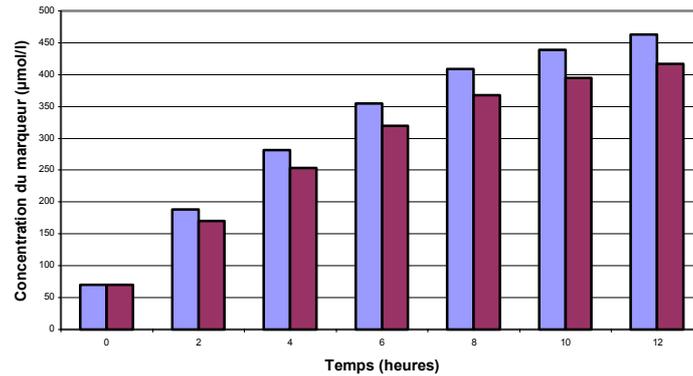
Comme on travaille à volume constant, on peut raisonner directement sur les concentrations (et non sur les masses).

La figure 33 présente un schéma typique de calcul des dilutions pour des prélèvements effectués toutes les 2 heures.



**Figure 33 : Schéma de calcul des dilutions pour des prélèvements effectués toutes les 2 heures avec  $V_{\text{fluide}}=20$  ml pour les cas 1 et 2 et  $V_{\text{fluide}}=130$  ml pour le cas 3)**

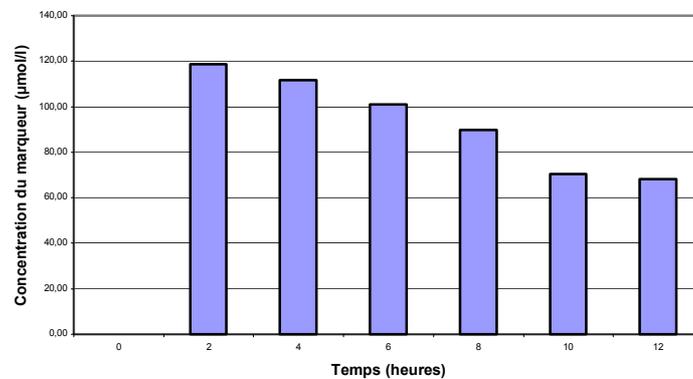
A partir des prélèvements, la première étape de l'analyse consiste donc à calculer les concentrations  $C'$  pour chaque temps de mesure (Figure 34).



**Figure 34 : Exemple de comparaison des concentrations mesurées (barres claires) et calculées (barres foncées) en tenant compte de la dilution dans un essai de sécrétion**

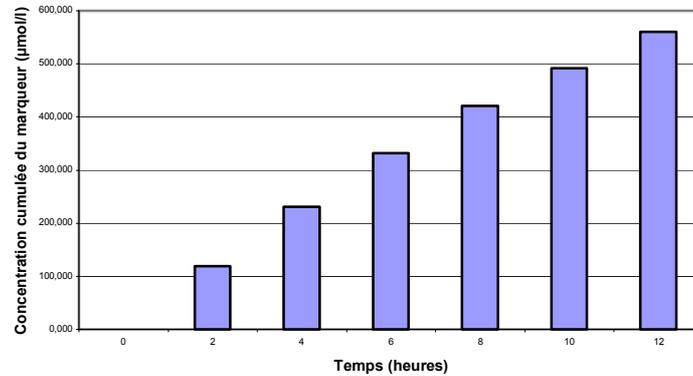
Pour connaître la concentration correspondant à la néoformation entre deux temps de prélèvement, on soustrait  $C_0$  à  $C_2$ ,  $C'_2$  à  $C_4$ ....On note T la néoformation entre deux concentrations ( $C_2 - C_0 = T_2$ ) (Figure 35).

N.B :  $C_0$  n'est pas nulle car la molécule peut se trouver dans le milieu de culture



**Figure 35 : Concentration du marqueur néo-formé**

L'étape suivante consiste à effectuer le cumul des concentrations néo-formées (Figure 36). On additionne les concentrations correspondant à la néoformation entre deux temps de prélèvement, on ajoute T<sub>2</sub> à T<sub>4</sub> et ainsi de suite jusqu'à T<sub>12</sub>.



**Figure 36 : Cumul des concentrations du marqueur néo-formé**

Ensuite, la concentration du marqueur néo-formé est calculée par million de cellules ensemencées. Enfin, pour exprimer le résultat en masse, on multiplie la concentration par le volume et par la masse molaire du marqueur considéré si nécessaire (pour l'ammoniac et l'urée). Les résultats sont exprimés en masse cumulée néo-synthétisée normalisée par rapport au temps 0 par millions de cellules.

La comparaison des résultats obtenus dans les 3 cas permettra d'une part d'évaluer l'influence de l'encapsulation sur la fonctionnalité des hépatocytes C3a encapsulés (cas 2) par rapport au témoin (cas 1) et d'autre part d'étudier l'influence du lit fluidisé (cas 3) en terme de métabolisme et de transfert de masse des marqueurs choisis.

### **7.3. Protocoles de dosages des marqueurs de l'activité métabolique**

Notre laboratoire dispose d'un automate de biochimie de type KONE SPECIFIC (KONE INSTRUMENT S.A) permettant d'assurer le dosage des marqueurs choisis. Cependant, son utilisation systématique n'a pas été possible. Cet automate étant dédié à une utilisation clinique, les gammes étalons pré-programmées ne sont pas adaptées à des expérimentations *in vitro* où les concentrations observées sont beaucoup plus faibles.

### 7.3.1. Protéines totales

#### 7.3.1.1. METHODE DE DOSAGE

La méthode de Bradford a été choisie afin de réaliser ce dosage.

#### 7.3.1.2. PROTOCOLE DE DOSAGE

Le dosage des protéines totales par la méthode de Bradford a été réalisé manuellement. L'absorbance est mesurée à 595 nm au spectrophotomètre (BECKMAN DU 7500).

- *Gamme étalon*

Elle est préparée à partir d'une solution mère de protéines (albumine purifiée) de concentration connue (Tableau 2).

| Concentration finale d'albumine ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Volume albumine (2 mg/ml) ( $\mu\text{l}$ ) | Volume PBS (ml) |
|--|---|-----------------|
| 0  | 0   | 3               |
| 5  | 7,5   | 2,925           |
| 10   | 15  | 2,850           |
| 15   | 22,5  | 2,775           |
| 20   | 30  | 2,7             |
| 25   | 37,5  | 2,625           |

**Tableau 2 : Gamme étalon du dosage des protéines totales**

Agiter les tubes puis mélanger 1 millilitre de chaque dilution (en duplicata) avec 1 millilitre de Coomassie protein Assay Reagent (Pierce). Agiter puis lire à 595 nm.

- *Dilution des échantillons (Tableau 3)*

| Dilution | Volume échantillon ( $\mu\text{l}$ ) | Volume PBS (ml) |
|----------|--------------------------------------|-----------------|
| 1/400    | 5                                    | 1,995           |
| 1/800    | 5                                    | 3,995           |

**Tableau 3 : Dilution des échantillons**

Agiter les tubes. Mélanger 1 millilitre de chaque dilution (en duplicata) avec 1 millilitre de Coomassie protein Assay Reagent (Pierce). Agiter puis lire à 595 nm.

## **7.3.2.Albumine**

### **7.3.2.1.PRINCIPE ET METHODE DE DOSAGE**

L'automate n'a pas été utilisé pour cette mesure. En effet, la méthode colorimétrique que propose cet appareil ne permet pas de discriminer deux concentrations très voisines même après adaptation de sa programmation. De plus, le manque de spécificité du test risque de provoquer un croisement entre l'albumine bovine présente dans le milieu de culture et l'albumine humaine néo-synthétisée par les hépatocytes C3a.

On a donc besoin d'un test très sensible et très spécifique. C'est pourquoi la quantité d'albumine sécrétée par les cellules C3a est mise en évidence par un test quantitatif de détection de l'albumine ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay).

Ce protocole a été validé par M.Dufresne, professeur agrégé, dans le laboratoire du Pr. M.D.Nagel.

### **7.3.2.2.PROTOCOLE DE DOSAGE**

- **Sensibilisation de la plaque de microtitration**

Distribuer 200 µl de solution Immunoglobuline G albumine humaine (A-HU albumine, Dako SA) (5µg/ml) dilué dans un tampon carbonate 0,1 M, pH 9,5 dans chaque puits de la microplaque (Plaque 96 puits, Greiner bio-one) sauf dans les puits correspondants au blanc dans lesquels on distribue 200 µl d'eau permutée. Recouvrir la plaque avec du parafilm et incuber 12 heures à 4 °C.

- **Saturation de la plaque de microtitration**

Vider la plaque de la solution sensibilisante puis laver 4 fois avec du PBS tween 20 (0,1 %) caséine (2 %). Saturer les sites de la plaque en distribuant 200 µl d'une solution de PBS tween 20 (0,1 %) caséine (0,2 %) sauf les puits correspondant au blanc (200 µl d'eau permutée). Recouvrir et laisser incuber pendant 2 heures à 37°C.

- **Distribution des échantillons**

Distribuer 200 µl (en duplicata) de chaque dilution des échantillons à tester et de la gamme étalon effectués dans du milieu de culture MEM SVF 10%. Recouvrir et laisser incuber pendant 1 heure 30 minutes à 37°C (Tableau 4 et 5).

- *Gamme étalon*

| Concentration finale d'albumine = C <sub>1</sub> | Volume solution mère albumine (1mg/ml) (µl) | Volume MEM SVF 10% tween 20 0,1% (ml) |
|--|---|---------------------------------------|
| 0,4  | 1   | 2,5                                   |

| Concentration finale albumine | Volume de C <sub>1</sub> (µl) | Volume de MEM SVF 10% tween 20 (0,1%) (µl) |
|-------------------------------|-------------------------------|--|
| 0,2                           | 400                           | 400  |
| 0,1                           | 200                           | 600  |
| 0,08                          | 160                           | 640  |
| 0,06                          | 120                           | 680  |
| 0,04                          | 80                            | 720  |
| 0,02                          | 40                            | 760  |
| 0,01                          | 40                            | 1560                                       |

**Tableau 4 : Gamme étalon du dosage de l'albumine**

- *Dilution des échantillons*

| Dilution | Volume échantillon (µl) | Volume MEM SVF 10% tween 20 (0,1%) (µl) |
|----------|-------------------------|---|
| 1/1      | 220                     | 0                                       |
| 1/2      | 120                     | 120                                     |
| 1/5      | 50                      | 200                                     |
| 1/10     | 30                      | 270                                     |
| 1/25     | 30                      | 720                                     |
| 1/50     | 30                      | 1470                                    |

**Tableau 5 : Dilution des échantillons**

- **Introduction du conjugué**

Laver la plaque 4 fois avec du PBS tween 20 (0,1 %) caséine (0,2 %). Distribuer 100 µl de conjugué anti albumine HRP (1/8000) dilué dans du PBS tween 20 (0,1 %) caséine (2 %). Recouvrir la plaque et laisser incuber 1 heure à 37°C.

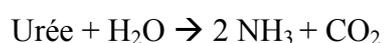
- **Introduction du substrat**

Laver la plaque 4 fois avec du PBS tween 20 (0,1 %) caséine (0,2 %). Distribuer 100 µl d'OPD (5 mg) dilué dans du tampon citrate 0,1 M pH 5 + 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 30 %. Garder les plaques à l'obscurité à la température de la pièce. Distribuer 100 µl par puits d'acide sulfurique 2 N pour arrêter la réaction au bout de 3 minutes. Lire l'absorbance à 492 nm.

### **7.3.3.Urée**

#### **7.3.3.1 PRINCIPE ET METHODE DE DOSAGE**

L'utilisation de l'uréase apporte une excellente spécificité et le dosage est très sensible



### **7.3.3.2.PROTOCOLE DE DOSAGE**

La production d'urée est mesurée par un dosage enzymatique de l'urée par l'uréase à l'aide d'un automate de biochimie KONE SPECIFIC (KONE INSTRUMENT S.A) dont la programmation a été adaptée (Gamme étalon (Tableau 6) et distribution des échantillons). Pour cela, de nombreux essais ont dû être conduits puisqu'il était impossible, a priori, de connaître les paramètres correspondant à la nouvelle gamme de concentration.

- *Gamme étalon*

| Concentration finale d'urée<br>(mmol/l) | Volume de solution mère urée<br>( 1 mmol/l) (µl) | Volume d'eau permutée<br>(µl) |
|---|--|-------------------------------|
| 0                                       | 0  | 0                             |
| 0,125                                   | 125  | 875                           |
| 0,25                                    | 250  | 750                           |
| 0,5                                     | 500  | 500                           |
| 0,75                                    | 750  | 250                           |
| 1                                       | 1000   | 0                             |

**Tableau 6 : Gamme étalon du dosage de l'urée**

- *Distribution des échantillons*

Distribuer 5 µl d'échantillon dans 180 µl de réactif ( UREE UV Cinétique SLR ; KONELAB S.A). Laisser incuber 2 minutes à 37 ° C puis lire à 340 nanomètres.

### **7.3.4.Ammoniac**

La méthode utilisée est destinée au dosage quantitatif de l'ammoniac dans le plasma. Le dosage est difficile dans notre cas car la quantité est faible. De plus, il doit être pratiqué rapidement après décongélation de l'échantillon à doser sinon la glutamine est hydrolysée et libère de l'ammoniac qui fausse le dosage.

#### **7.3.4.1.PRINCIPE ET METHODE DE DOSAGE**

La méthode de dosage de l'ammoniac plasmatique repose sur une méthode enzymatique :



La diminution de l'absorbance à 340 nm due à l'oxydation du NADPH est proportionnelle à la concentration du plasma en ammoniac.

#### **7.3.4.2.PROTOCOLE DE DOSAGE**

La production d'ammoniac est mesurée par un dosage enzymatique des ions ammonium par la glutamate deshydrogénase à l'aide d'un automate de biochimie KONE SPECIFIC (KONE INSTRUMENT S.A) dont la programmation a été adaptée (Gamme étalon (Tableau 7) et distribution des échantillons).

- *Gamme étalon*

| Concentration finale d'urée<br>( $\mu\text{mol/l}$ ) | Volume de solution mère<br>Ammoniac (500 $\mu\text{mol/l}$ ) ( $\mu\text{l}$ ) | Volume d'eau permutée<br>( $\mu\text{l}$ ) |
|--|--|--|
| 0  | 0  | 1000                                       |
| 250  | 500  | 500  |
| 500  | 1000   | 0  |

**Tableau 7 : Gamme étalon du dosage de l'ammoniac**

- *Distribution des échantillons*

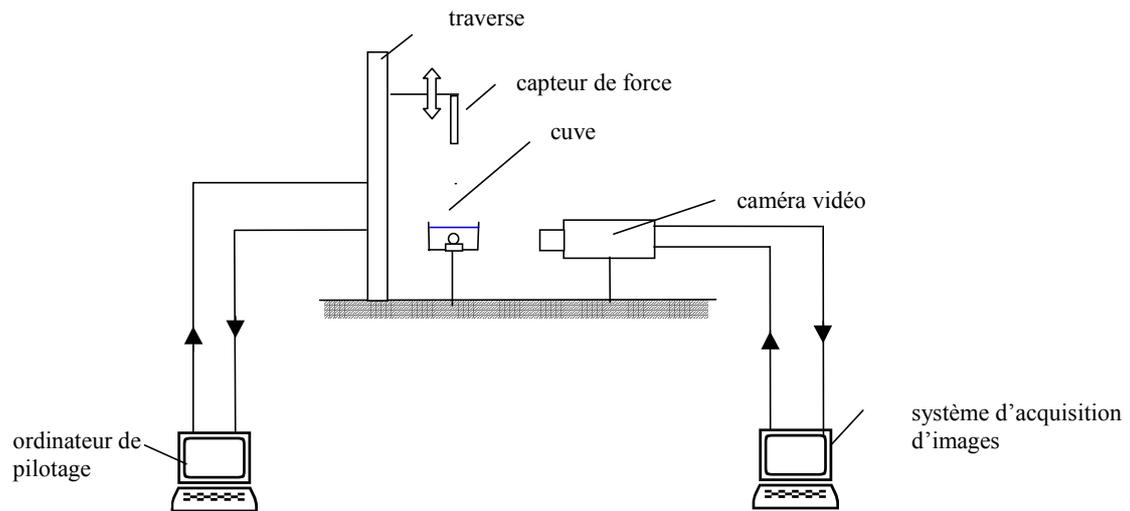
Distribuer 20  $\mu\text{l}$  d'échantillon dans 100  $\mu\text{l}$  de réactif 1 (AMMONIAC UV DP ; KONELAB S.A). Laisser incuber 5 minutes à 37 ° C. Reprendre l'échantillon et distribuer 15  $\mu\text{l}$  de réactif 2 (AMMONIAC UV DP ; KONELAB S.A). Incuber 3 minutes à 37 ° C puis lire à 340 nanomètres.

## **8. Etude des propriétés mécaniques des billes d'alginate**

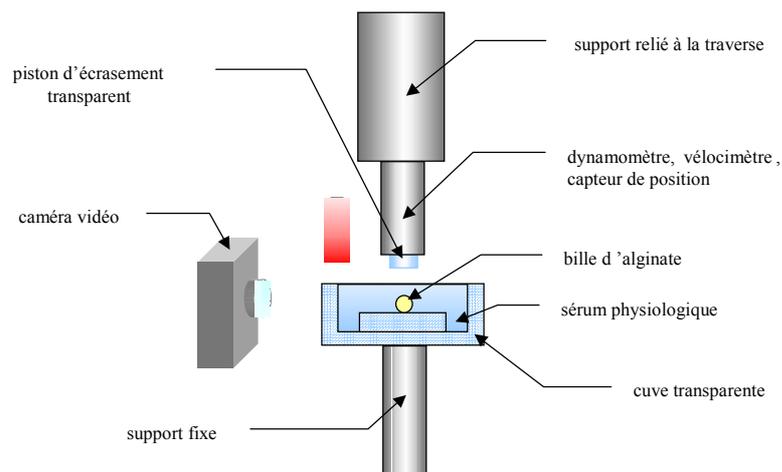
L'étude des propriétés mécaniques des billes d'alginate est réalisée afin de pouvoir optimiser le processus de fabrication des billes et garantir ainsi la bonne utilisation du bioréacteur. On cherche à déterminer les facteurs influençant leurs propriétés afin de maximiser leur tenue mécanique sans altérer leurs fonctionnalités biologiques.

### **8.1. Banc expérimental de chargement-déchargement (compression)**

Le banc expérimental dont dispose notre Unité de Recherche se compose d'une machine de traction compression (Synergie 400, MTS Systems) (Figure 37) sur laquelle est fixée une cuve transparente remplie d'un volume déterminé de milieu de conservation des billes (sérum physiologique, milieu de culture ou plasma) et contenant la bille (Figure 38). Un piston connecté aux capteurs de force (force maxi 2N, résolution  $10^{-4}$ N) et de déplacement (résolution de 0,01 mm) de la machine vient écraser la bille (gamme de vitesses va de 0,0001 à 999,999 mm/min avec une précision de  $\pm 0,1\%$  de la vitesse d'essais à charge nulle ou constante). La visualisation du profil est obtenue par un système d'acquisition d'images constitué d'une caméra vidéo CCD Imasys (Suresnes, France) et d'un logiciel développé au sein du laboratoire par A.Leverger, ingénieur système informatique, permettant la digitalisation des images et leur stockage. Le traitement d'images est accompli à l'aide de procédures de détection de contour (Scion Image, version Beta4.0.2, Scion Corporation, Maryland, USA). Ce dispositif expérimental a été initialement mis en place pour l'écrasement de capsules par l'équipe du Pr. D. Barthès-Biesel.



**Figure 37 : Dispositif expérimental**



**Figure 38 : Dispositif d'écrasement**

## 8.2. Description des manipulations réalisées

Il faut distinguer d'une part les manipulations ayant pour but de caractériser le matériau par lui-même et d'autre part les manipulations ayant pour objectif d'étudier un éventuel effet du lit fluidisé sur les propriétés mécaniques des billes en fluidisation.

### **8.2.1. Les mesures préliminaires**

Il nous faut connaître les caractéristiques géométriques de chaque bille avant écrasement. La taille initiale est déterminée grâce au système d'acquisition vidéo. On place la bille à tester à côté et dans le même plan qu'une bille en carbure de tungstène de taille connue (2,5 mm). Connaissant la taille de la bille et la distance qui la sépare du piston, nous pouvons déterminer la distance de descente du piston selon le taux d'écrasement que nous souhaitons imposer à la bille d'alginate.

Les billes n'étant pas parfaitement sphériques, on calcule le rayon équivalent à la sphère donnant la même surface. Celui-ci peut en effet être déduit du traitement d'images à l'aide du logiciel Scion. Cette évaluation suppose que la bille soit axisymétrique.

La vitesse de déplacement du piston ainsi que la position à atteindre sont fixées au niveau du logiciel de pilotage (Testwork4) de la machine de traction-compression.

### **8.2.2. Caractérisation du matériau**

#### **8.2.2.1. TEST DE CHARGEMENT**

La première étape consiste donc à caractériser le comportement mécanique d'une bille d'alginate soumise à un test de compression. En effet, comme nous l'avons déjà vu au chapitre I paragraphe 2.3.3, l'analyse des courbes force/déplacement permet de mettre en évidence différents types de comportement mécanique caractérisant le matériau étudié. Ce test de chargement a été mené dans un premier temps avec une bille de 2 millimètres de diamètre ( temps de réticulation de 15 et 30 minutes), puis, lorsque le protocole a été maîtrisé de façon satisfaisante avec une bille de 1 millimètre ( temps de réticulation de 15 minutes), pour un taux et une vitesse d'écrasement respectivement de 18 % et 0,6mm/min. La cuve est remplie de 20 millilitres de sérum physiologique. Les résultats obtenus permettront non seulement de caractériser le comportement mécanique des billes mais aussi d'étudier l'influence du temps réticulation et du diamètre des billes.

### **8.2.2.2.TEST DE FATIGUE**

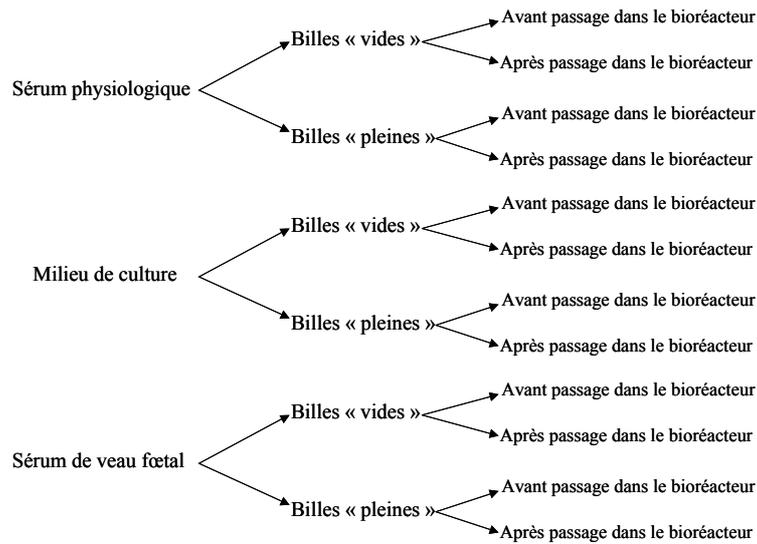
Afin de préciser le comportement élastique des billes d'alginate, il est nécessaire d'étudier leur réaction vis-à-vis de la fatigue par un test dit « de fatigue ». On effectue des cycles de chargement/déchargement (5 cycles) à vitesse constante (0,6mm/min) sur une même bille de diamètre 2 millimètres (temps de réticulation 15 minutes ; taux de compression de 18 %) . L'essai est répété sur 5 billes provenant du même lot de fabrication. La cuve est remplie de 20 millilitres de sérum physiologique.

### **8.2.3.Caractéristiques mécaniques de la bille d'alginate en lit fluidisé.**

Le but de cette étude est de réaliser une étude systématique permettant d'évaluer les variations de propriétés mécaniques de billes d'alginate de 1 millimètre avant et après passage dans le bioréacteur perfusé par des fluides différents (sérum physiologique, milieu de culture et sérum de veau fœtal) pendant 6 heures correspondantes à la durée journalière du traitement par le foie bioartificiel à lit fluidisé. Chaque manipulation est menée avec un lot de billes neuves.

Pour chacun des fluides, 2 séries de manipulations sont menées, l'une avec des billes « vides » c'est à dire composées uniquement d'alginate et l'autre avec des billes « pleines » c'est à dire hébergeant des cellules C3a. On réalise des essais de compression (taux de compression de 40 % ; vitesse d'écrasement de 0,6mm/min) sur 10 billes différentes avant et après passage dans le lit fluidisé. L'ensemble des cas est détaillé dans la figure 39. La cuve est remplie du même milieu que celui servant à la fluidisation des billes au sein du bioréacteur.

Afin d'éliminer l'éventuelle influence du vieillissement naturel des billes avant leur utilisation, le temps entre leur fabrication et leur utilisation est le même pour toutes les configurations étudiées (12 heures). Aussi, les billes sont-elles conservées dans le même milieu qui sert à la manipulation de fluidisation afin d'éliminer les possibilités d'adsorption de protéines sur la surface des billes d'alginate pendant la fluidisation.

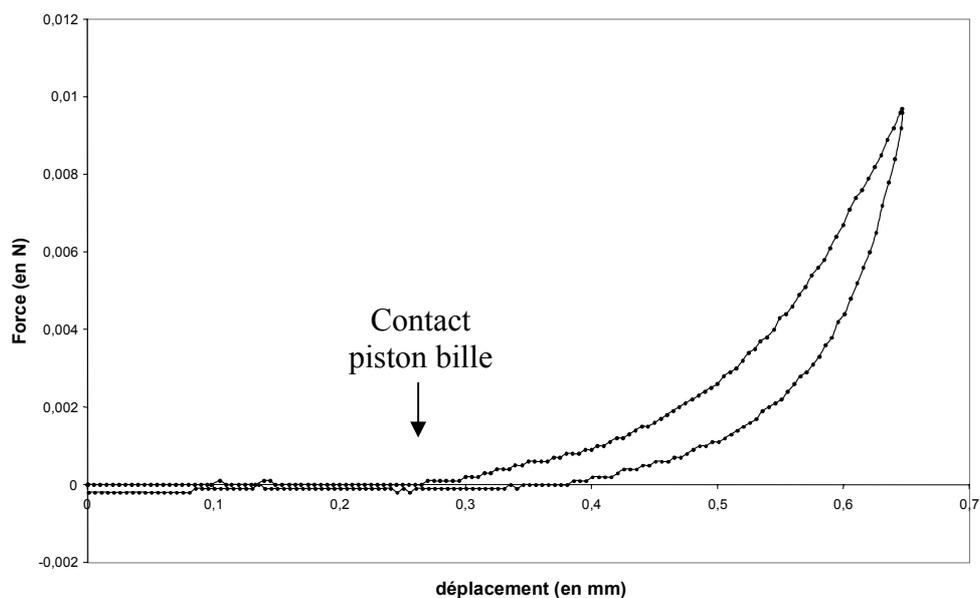


**Figure 39 : Organigramme des différents essais réalisés**

### 8.3. Interprétation des courbes force déplacement

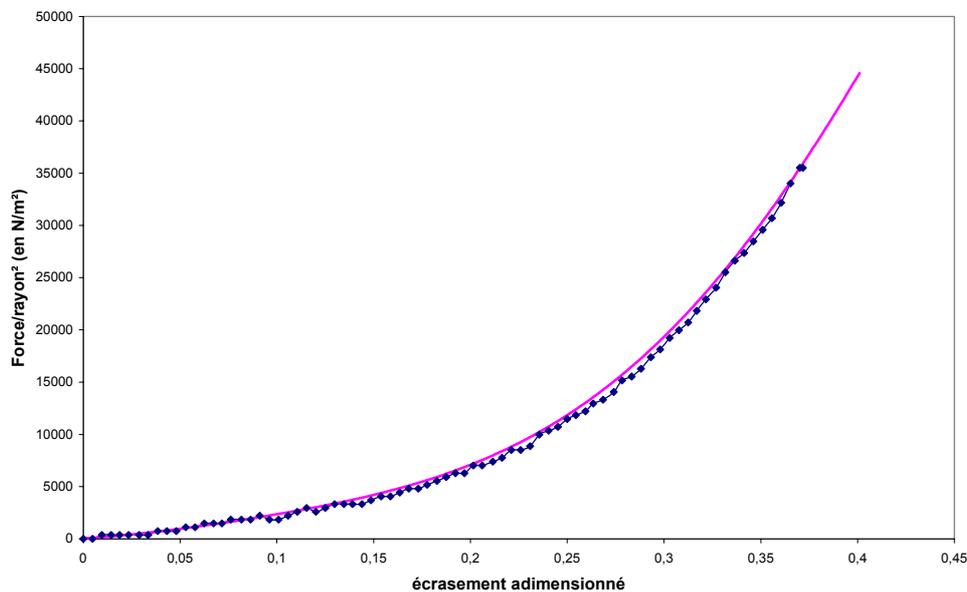
#### 8.3.1. Description des étapes de l'analyse des essais de compression

Une déformation à vitesse constante est appliquée à la bille (Figure 40). On enregistre l'évolution de la force  $F$  (en Newton) en fonction du déplacement du piston (en millimètres).



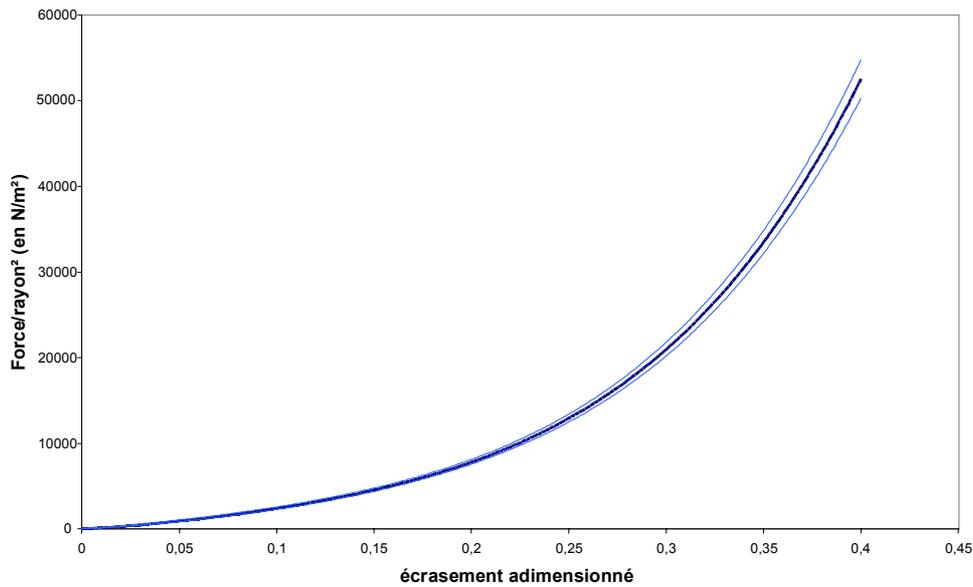
**Figure 40 : Essai de compression avant traitement**

La courbe expérimentale obtenue n'est pas exploitable directement. Il nous faut effectuer un recalage de celle-ci par rapport au point de contact entre le piston et la bille (Figure 41). Afin d'éliminer l'influence de la disparité de la taille initiale des billes sur les courbes de compression (4% environ), on effectue une adimensionnalisation de ces courbes par rapport au rayon initial  $r_0$  des billes. On représente la force / le rayon initial  $^2$  ( $F/r_0^2$  en  $N/mm^2$ ) en fonction de  $1 - \text{la distance entre les deux plateaux} / 2 \text{ fois le rayon initial } r_0$  ( $1-D/r_0$  grandeur sans dimension). Enfin, on effectue un lissage des courbes (par une régression de type polynomiale).



**Figure 41 : Essai de compression après recalage de la courbe et adimensionnalisation**

Pour un lot de billes donné, chaque essai de compression a été répété sur 10 billes différentes. On réalise la moyenne de ces 10 valeurs (Figure 42).



**Figure 42 : Moyenne des résultats obtenus pour 10 billes**

## **8.4. Les sources d'erreur pour l'exploitation des résultats**

### **8.4.1. Mesure du rayon initial**

L'imprécision sur la mesure du rayon moyen initial de la bille provient de deux sources : tout d'abord, lorsque la correspondance pixel/mm est effectuée à partir de l'image de la bille en carbure de tungstène, l'erreur sur la mesure en pixel est de  $\pm 1$  pixel (pour une longueur de l'ordre de 150 pixels soit 1,3 %).

Lorsque l'on traite l'image de la bille prise juste avant la compression, l'imprécision sur l'aire est de  $\pm 75$  pixels (pour une aire d'environ 13000 pixels pour des billes de diamètre 2 mm et d'environ 5000 pixels pour celles de 1mm). Il faut aussi ne pas oublier que la position de la bille d'alginate par rapport à la caméra a pu évoluer entre cette image et celle avec la bille en métal (la correspondance n'est plus alors aussi exacte).

Ainsi la valeur du rayon moyen est-elle connue à 1,9 % près pour les billes de 2mm et à 2,8 % près pour celles de 1mm .

### **8.4.2. Imprécision sur la mesure de la force et du déplacement**

Comme nous l'avons déjà précisé lors de la description du dispositif expérimental, la machine de traction compression génère un déplacement de la traverse avec une précision de 0,01 mm. Le capteur de force quant à lui a une résolution de  $10^{-4}$ N. De plus, nous avons aussi testé sa compliance. La force maximale que nous avons eu à mesurer fut de 0,15 N (lors d'un écrasement de 46 %) ce qui correspond à une erreur sur le déplacement du piston de 0,018 mm soit une erreur relative maximum de 1,5 %.

# **Chapitre III : Conception d'un générateur de billes d'alginate**

---



# Conception et développement

---

## 1.Introduction

Le but de cette démarche est de développer un système capable de fabriquer entre 300 à 400 millilitres de billes d'alginate homogènes et de diamètre défini (1mm) dans un temps minimum, entre 15 et 20 minutes, au sein du laboratoire pour pouvoir réaliser nos différentes expérimentations. Notamment, la méthode retenue ne devra pas altérer la viabilité des cellules encapsulées. En aucun cas, notre but n'est de concevoir un nouveau type de générateur de billes d'alginate. Nous souhaitons simplement disposer d'un système simple, fiable, facile d'utilisation, stérilisable et peu coûteux, et ceci dans le délai le plus réduit possible car ce générateur est le pré-requis indispensable à la réalisation des travaux présentés dans ce rapport de thèse.

Nous avons tout d'abord étudié les procédés mis en œuvre dans les dispositifs commerciaux. Cette étape nous a aussi permis d'évaluer si notre décision de fabriquer un générateur, d'un point de vue financier, était plus avantageuse plutôt que d'envisager l'achat d'un dispositif « clé en main ».

## 2.Les différents Générateurs de billes d'alginate basés sur l'extrusion

Comme nous l'avons brièvement vu au chapitre 1, l'extrusion est une méthode qui consiste à faire tomber goutte à goutte une solution de gel, à partir d'une sorte d'aiguille non biseautée ou buse, pour former des corps sphériques et de diamètre homogène. Cette technique est souvent décrite comme la méthode la plus « douce » d'encapsulation. Elle offre la possibilité de contrôler le diamètre des billes formées à la fois par le diamètre interne de l'aiguille d'extrusion et le débit de la pompe alimentant le circuit de production. Ce principe de base est relativement facile à reproduire. D'un point de vue conception, il ne nécessite pas de gros appareillages : une pompe et une buse suffisent. Cependant, pour avoir accès à une production homogène millimétrique, il est nécessaire d'améliorer le principe de base par addition d'une force supplémentaire à la gravité qui aide la goutte à tomber. Les 4 principaux procédés sont décrits dans les paragraphes suivants.

## 2.1. Générateur basé sur le principe « flux d'air coaxial »

La formation des billes se fait à la fois par simple extrusion et par la variation du débit d'air du flux coaxial qui permet de contrôler finement le diamètre de la bille formée (Figure 43)

Ce système simple n'est pas commercialisé mais on le trouve décrit dans la littérature pour des applications de laboratoire (148 ;176). La productivité de ce système est faible puisque les auteurs l'utilisant se tournent en général vers d'autres procédés pour cette raison (177).

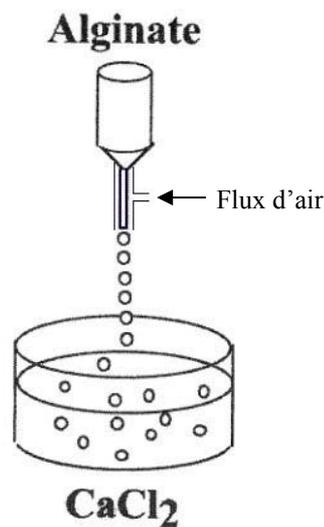
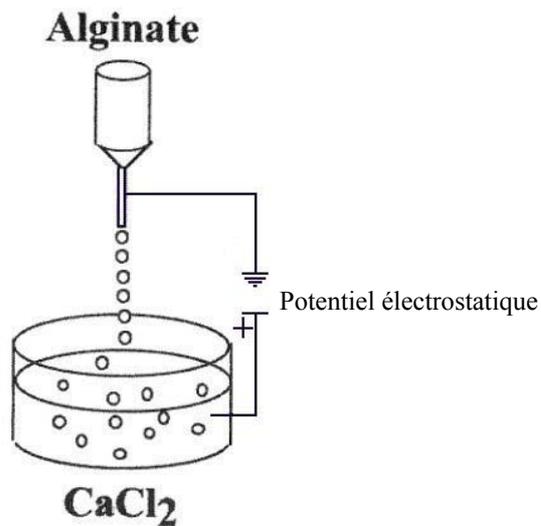


Figure 43 : schéma de principe (118)

## 2.2. Générateur basé sur le principe dit de « force électrostatique »

Une autre possibilité de contrôle de la taille de la bille formée repose sur l'utilisation d'un potentiel électrostatique de quelques kV (1 à 10) entre la buse et le bain de chlorure de calcium. La taille des gouttes peut ainsi être contrôlée par un ajustement du voltage (Figure 44).

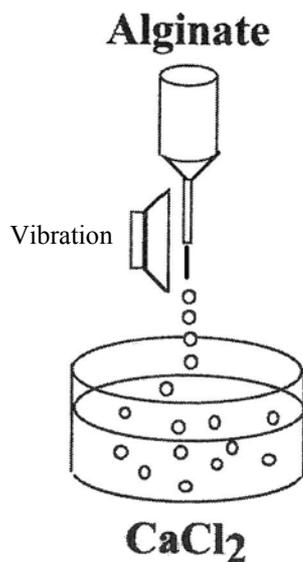


**Figure 44 : schéma de principe (178)**

Ce genre de générateur est destiné à des petites productions de billes bien calibrées (de 200 à 1000  $\mu\text{m}$ ). Il convient donc parfaitement à une utilisation en laboratoire. Cependant, pour notre application, cette possibilité de contrôle de la taille n'a pas été retenue à cause du manque d'information concernant la viabilité des cellules encapsulées grâce à ce principe.

### **2.3. Générateur basé sur le principe dit de « vibration ».**

La formation des billes par extrusion repose cette fois sur l'utilisation d'un générateur d'onde vibratoire au niveau de la buse, engendrant la formation de gouttelettes. Ce procédé permet de produire des lots des billes avec une très bonne homogénéité en taille (figure 45).



**Figure 45 : schéma de principe (179)**

La figure 46 représente le schéma de principe du générateur de billes commercialisé par la société Inotech (Suisse) (180). Il représente une évolution du principe de base, la formation des billes ayant lieu au niveau d'un « bec vibrant » (figure 46, légende 5). Le prix de ce système est proche de 12000 euros.

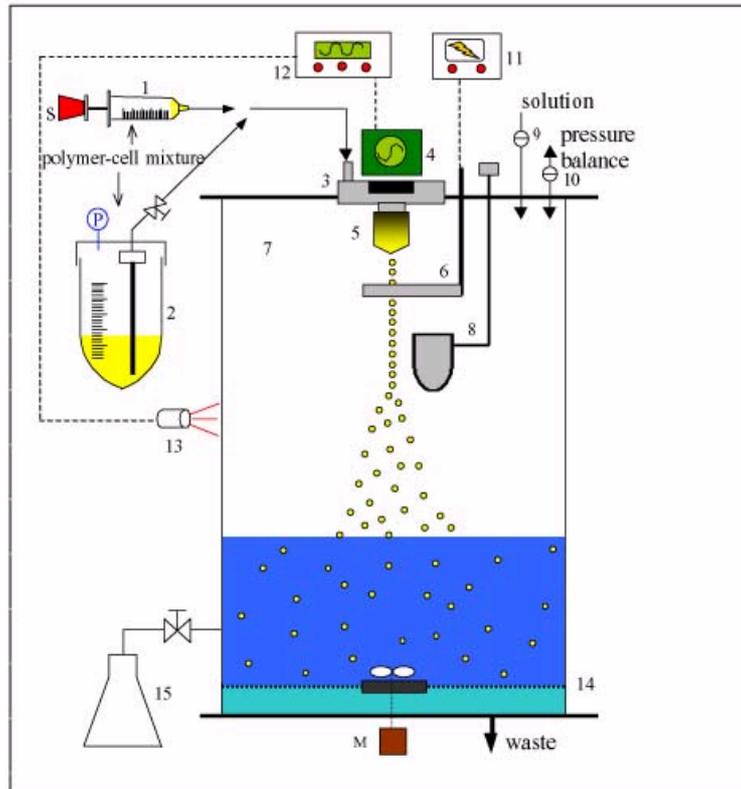
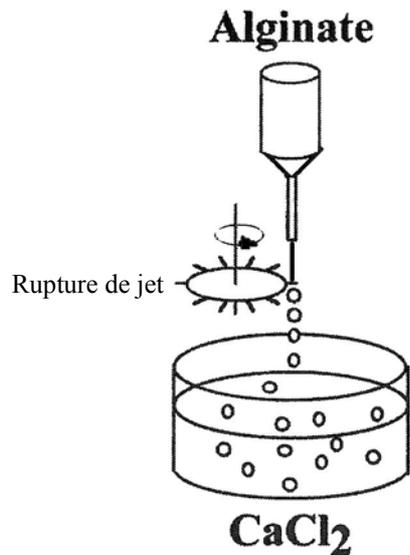


Figure - Schematic Representation of Encapsulator Research

**Figure 46 : Schéma de principe de l'Encapsulator commercialisé par la société Inotech (180)**

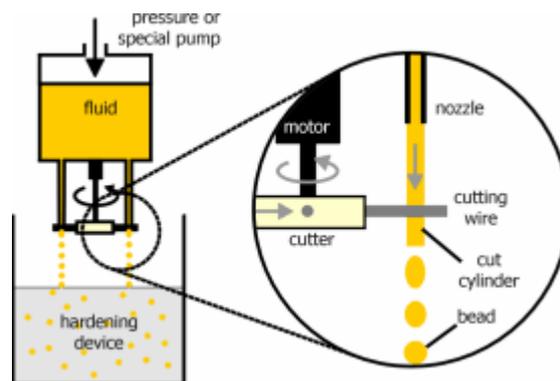
#### **2.4. Générateur de billes basé sur le principe dit de « rupture de jet »**

Un autre principe applicable au développement dans un laboratoire d'un générateur de billes de diamètre petite et uniforme ( $< 1 \text{ mm}$ ) est la technologie dite du « JetCutter » ou rupture de jet. La génération de billes est réalisée en coupant un jet de liquide en segments cylindriques au moyen de la rotation d'un fil coupant (181) (Figure 47). Le principe est très séduisant mais semble, a priori, assez difficile à mettre en œuvre (en terme d'angle de coupe) rapidement.



**Figure 47 : schéma de principe (179)**

La figure 48 représente le schéma de principe du générateur de billes proposé par la société GeniaLab (Allemagne) (182).



**Figure 48 : Schéma de principe du jetCutter (182)**

Ce système permet de produire, selon cette société, de très gros volumes de billes (19 litres de billes de 1 mm de diamètre par heure) de diamètre homogène compris entre 150  $\mu\text{m}$  à 3 mm. La fréquence de rotation, donc de coupure, peut atteindre 10000 coupes par seconde. Les tarifs ne nous ont pas été communiqués.

## 2.5.Conclusion

Quelle que soit la force additionnelle à la gravité choisie pour le contrôle fin de la taille des billes, on obtient la formation de lots de billes homogènes millimétriques. On peut classer ces systèmes en deux catégories :

- Générateur à faible productivité (flux d'air coaxial et force électrostatique)
- Générateur à forte productivité (vibration et rupture de jet )

Dans le cadre du modèle in vitro de l'étude des performances du foie bioartificiel, nous avons fait le choix d'utiliser des billes « fraîches » et donc de les fabriquer au fur et à mesure des manipulations. Il ressort de ce fait que nous n'avons pas besoin d'un système complexe qui, bien que performant en volume de production, serait onéreux et long à concevoir et développer.

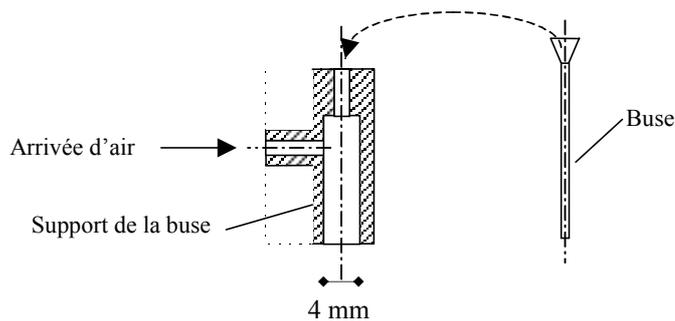
Les tarifs pratiqués nous ont définitivement convaincus quant au fait de concevoir notre propre générateur. Malgré les performances des techniques mis en œuvre, pot vibrant et rupture de jet, nous nous sommes tournés vers un générateur basé sur le principe du « flux d'air coaxial » moins coûteux et plus rapide à mettre en application.

Il faut noter que la méthode que nous avons choisie d'exploiter est en adéquation avec une utilisation en laboratoire. Cependant, dans l'optique d'un éventuel passage au stade industriel, il serait nécessaire d'envisager à un autre procédé de fabrication plus apte à produire de gros volumes de billes, comme la rupture de jet.

### **3. Conception et développement.**

#### **3.1. Premier prototype de production de billes d'alginate**

Il représente la mise en application du principe général de la méthode afin d'en apprécier la faisabilité dans le cadre de notre application. Le système se présente sous forme d'un tube de 45 mm de hauteur et de 10 mm de diamètre externe. Le tiers supérieur (15 mm) est percé d'un trou centré de diamètre de 9/10 de mm servant au guidage de l'aiguille. Les 2/3 inférieurs (30 mm) sont percés d'un trou centré de 4 mm de diamètre permettant à la fois le passage de l'aiguille et du flux d'air coaxial. L'arrivée d'air se fait au niveau de la jonction du 1/3 supérieur et des 2/3 inférieurs (Figure 49).



**Figure 49 : Schéma descriptif du premier prototype**

### **3.1.1.VARIATION DU DIAMETRE DE LA BILLE EN FONCTION DU FLUX D’AIR COAXIAL**

Le diamètre de la bille dépend du diamètre externe de la buse servant à la production (0,8 mm). Il varie aussi en fonction du débit du flux d’air coaxial qui aide la bille à tomber dans la solution de chlorure de calcium et du débit de la pompe faisant circuler l’alginate dans le circuit de production. Dans cette première configuration, le débit d’air du flux coaxial est contrôlé par un débitmètre à bille. Le débit de la pompe est gardé constant (2,7 ml/min). On étudie la variation de taille en fonction du débit d’air du flux appliqué (Tableau 8).

|       | Débit d’alginate<br>(ml/mn) | Débit d’air<br>(ml/mn) | Vitesse du flux<br>d’air (mm/s) | Diamètre min-max<br>des billes (mm) |
|-------|-----------------------------|------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|
| Lot 1 | 2,7                         | 50                     | 66                              | 1,78 – 1,80                         |
| Lot 2 | 2,7                         | 60                     | 79                              | 1,28 – 1,32                         |
| Lot 3 | 2,7                         | 65                     | 86                              | 1,18 – 1,23                         |
| Lot 4 | 2,7                         | 75                     | 99                              | 1,21 – 1,25                         |
| Lot 5 | 2,7                         | 80                     | 102                             | 0,98 – 1                            |
| Lot 6 | 2,7                         | 85                     | 112                             | 0,93 – 0,95                         |
| Lot 7 | 2,7                         | 100                    | 132                             | 0,73 – 0,75                         |

**Tableau 8 : Diamètre des billes en fonction du débit d’alginate et du flux d’air coaxial**

On note que, d’après les valeurs indiquées dans le tableau 8, plus le débit d’air est élevé, plus le diamètre de la bille est petit.

### **3.1.2.LIMITES DU PREMIER PROTOTYPE**

Il est désormais possible de fabriquer des billes d'alginate, de diamètre homogène et de taille définie dans le laboratoire. Ce premier prototype est satisfaisant car les billes produites répondent aux critères recherchés. Cependant il ne permet pas la production de gros volumes de billes. Le débit de la pompe est de 2,7 ml/min au maximum.

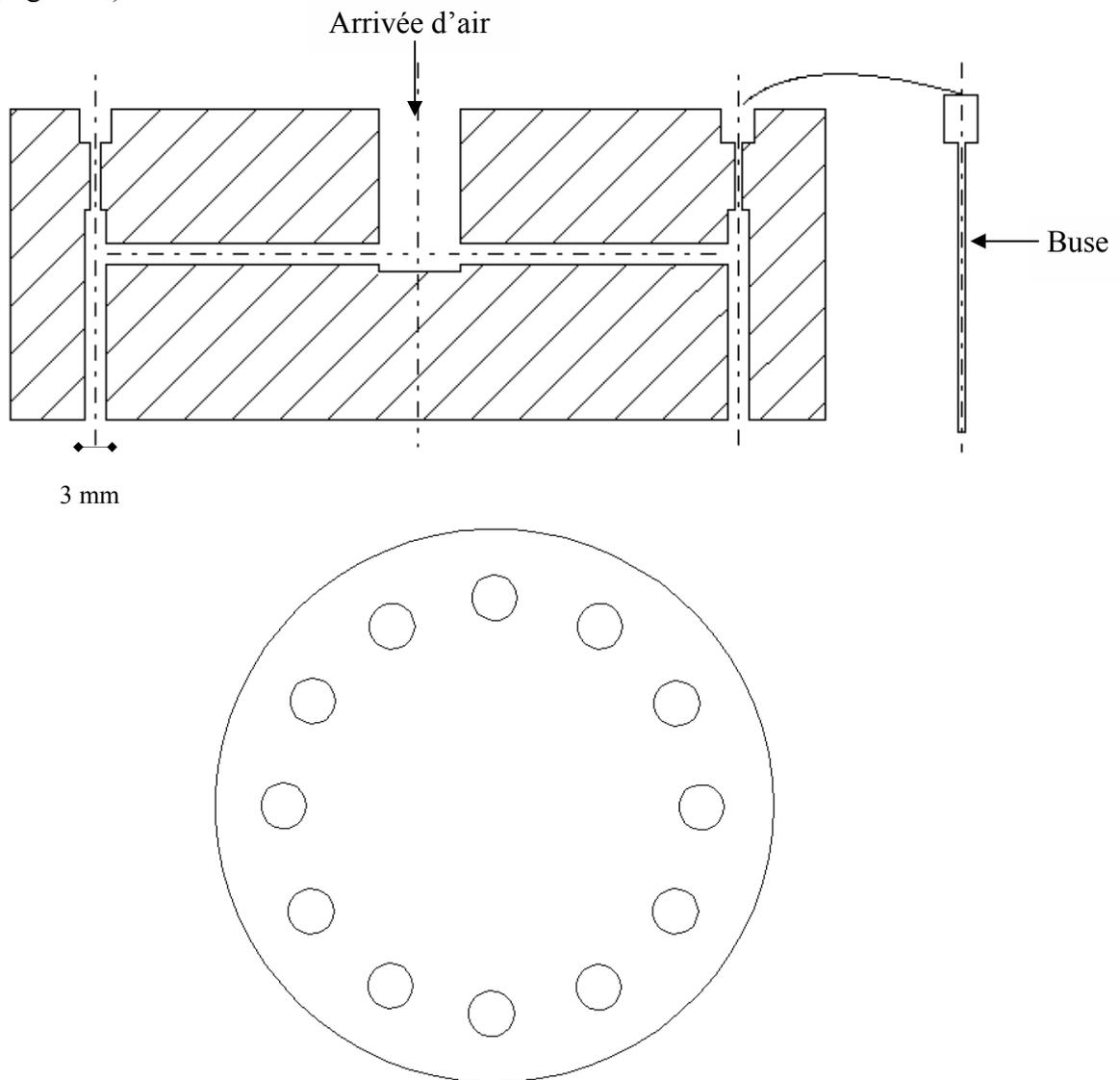
Le temps d'immersion des billes dans le bain de chlorure de calcium nécessaire pour obtenir une réticulation optimale est de 15 minutes. Lors de la production de billes, ce temps est pris à partir de la dernière bille formée. Dans les conditions citées précédemment, il faut 4 minutes pour produire 10 ml de billes. Le temps d'immersion de la première bille formée dans le bain de réticulation n'est, non pas de 15 minutes, mais de 19. Ceci engendre une hétérogénéité du lot de billes produites. Il est souhaitable que les cellules encapsulées dans ces billes ne baignent dans le chlorure de calcium que le temps nécessaire à la réticulation du gel pour ne pas compromettre leur viabilité.

Il ne serait donc pas raisonnable de produire plus de 10 millilitres à la fois ce qui implique de renouveler la manipulation environ 35 à 40 fois.

### **3.2.Second prototype de production de billes d'alginate**

Nous avons fixé un cahier des charges pour notre second prototype. Il doit répondre à notre besoin de produire un gros volume de billes (300 à 400 millilitres) en un minimum de temps afin de s'approcher d'une durée d'immersion de 15 minutes. Le débit d'alginate est fixé à 5 ml/min. Ce deuxième modèle reprend la technologie ayant fait ses preuves à travers notre premier prototype avec cependant quelques ajustements. Nous avons constaté qu'il était impossible d'augmenter le rendement de production de notre premier système au-delà de 2,7 ml/min sous peine de compromettre la qualité de la bille produite. Nous avons donc choisi de garder le schéma de principe du système de base mais en multipliant les unités de production.

Ce second générateur se présente sous forme d'un bloc cylindrique de PTFE (Poly Tetra Fluoro Ethylène) de 45 mm d'épaisseur et de 120 mm de diamètre. Les unités de production, au nombre de 12, sont situées à la périphérie. Elles reprennent les dimensions du premier système, seul le diamètre interne permettant le passage du flux d'air coaxial a été réduit de 4 à 3 mm. Cette modification a permis une légère augmentation du débit de production de 3 à 5 ml/min. La face supérieure du cylindre reçoit en son centre l'arrivée d'air. Celle-ci est ensuite redistribuée par un ensemble de canaux partant du collecteur central vers chaque buse en périphérie. Chacun des systèmes est indépendant et strictement identique aux autres (Figure50).



**Figure 50 : Schémas descriptifs du second prototype en coupe et vu de sa face inférieure**

Ce nouveau générateur de billes permet de produire 12 billes en même temps avec une qualité équivalente pour chacune des 12 buses. Le débit est de 5 ml/min par buse (Tableau 9).

En terme de débit total on passe de 3 à 60 ml/min soit 180 millilitres de billes en 3 minutes. Il n'est toujours pas possible de produire 300 à 400 millilitres en un seul cycle de production mais 2 ou 3 manipulations seront seulement nécessaires pour atteindre de tels volumes. On peut envisager une évolution du système par une simple multiplication des buses.

|       | Débit d'alginate<br>(ml/min) | Débit d'air du<br>flux coaxial<br>(ml/min) | Vitesse du flux<br>d'air (mm/s) | Diamètre min-max<br>des billes (mm) |
|-------|------------------------------|--|---------------------------------|-------------------------------------|
| Lot 1 | 5                            | 5  | 11                              | 2 – 2,1                             |
| Lot 2 | 5                            | 12,5                                       | 29                              | 0,98 – 1                            |

**Tableau 9 : Diamètre des billes en fonction du débit d'alginate et du débit d'air du flux coaxial.**

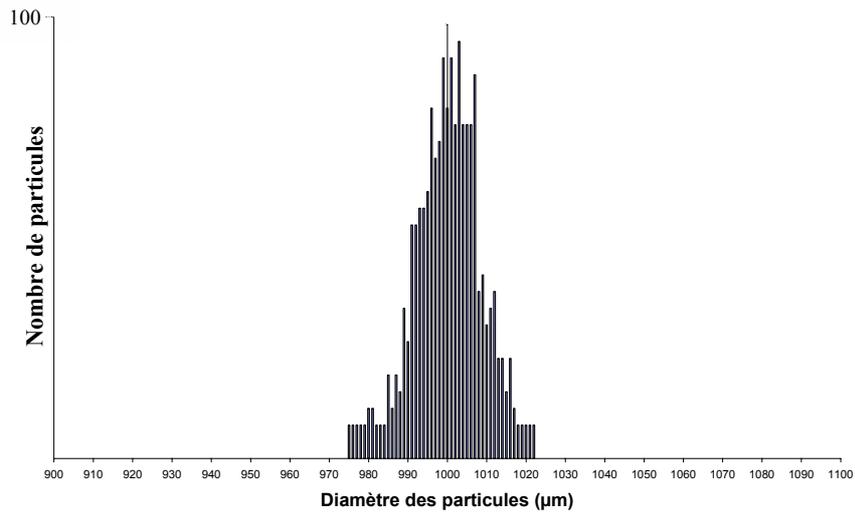
#### **4. Contrôle de la qualité des billes produites**

Dans un souci de reproductibilité des résultats, les billes produites doivent, d'un lot à l'autre, présenter les mêmes caractéristiques géométriques (diamètre, forme) et mécaniques. En ce sens, il est nécessaire de disposer de méthodes et d'outils capables de fournir des informations sur chacun des critères retenus :

1. Homogénéité des lots de billes produites (dispersion en forme et en taille)
2. Propriétés mécaniques (traitées au chapitre VI)

##### **4.1. Homogénéité des lots de billes produites**

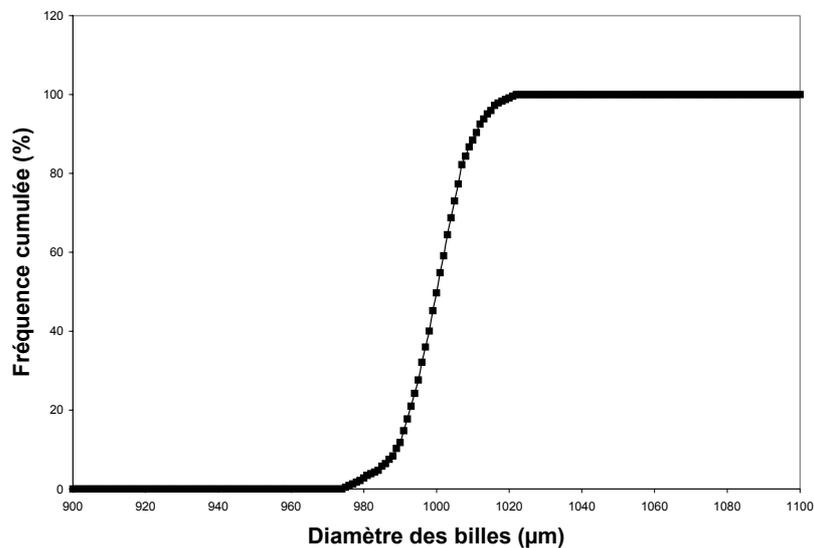
Notre objectif est de produire des lots de billes de taille homogène millimétrique. Nous avons donc procédé à une analyse granulométrique d'un échantillon de billes (183).



**Figure 51 : Dispersion de la taille des billes**

L’histogramme de la figure 51 représente le nombre de particules en fonction de leur taille. La figure montre une bonne homogénéité du diamètre des billes. Un pic est observé pour une valeur moyenne de 1 millimètre (tolérance de 0,1 mm).

Un autre mode de représentation est la forme cumulée qui exprime quelle proportion de matériau se trouve au-dessus ou en dessous d’une certaine valeur de taille (Figure 52).



**Figure 52 : Etendue de la distribution**

On peut obtenir une valeur représentative de l’étendue de la distribution

$$span = \frac{d_{90\%} - d_{10\%}}{d_{50\%}} = 2,2\%$$

Avec :

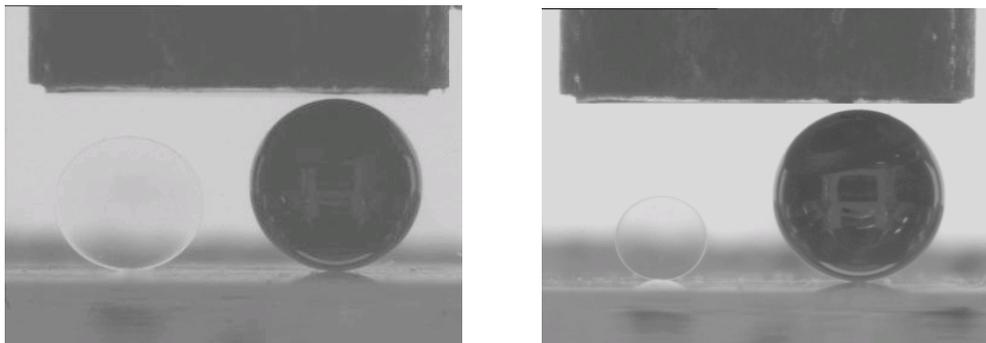
$d_{90\%}$  le diamètre pour une fréquence cumulée de 90% ;  $d_{10\%}$  le diamètre pour une fréquence cumulée de 10% ;  $d_{50\%}$  est la médiane donc le diamètre pour une fréquence cumulée de 50%.

$(d_{90\%} - d_{10\%})$  est l'intervalle interfractile.

Ce contrôle ne peut être effectué après chaque production de billes à cause de la lourdeur de la manipulation. L'utilisation quotidienne du Coulter<sup>®</sup> multisizer n'étant pas dédiée à l'étude de particules millimétriques mais micrométriques, il a fallu adapter la machine spécialement pour cette manipulation (modification du circuit hydraulique) .

En routine, le contrôle du diamètre des billes est réalisé avec un pied à coulisse de précision sur un échantillon de 50 unités sous loupe binoculaire. Lors des premières productions de billes, cette méthode a été utilisée pour mesurer leur diamètre. La précision est satisfaisante. Elle est en concordance avec les résultats obtenus avec le Coulter<sup>®</sup> Multisizer. C'est une méthode simple, rapide et efficace. De même, l'observation directe sous binoculaire permet d'apprécier la forme de la bille. Cependant, cette méthode ne permet pas de connaître la géométrie exacte de la structure.

Lors des expérimentations concernant l'étude des propriétés mécaniques, il est aussi nécessaire de connaître les caractéristiques géométriques de chaque bille étudiée. Dans ce cas, le contrôle du diamètre et de la forme se fait grâce à l'utilisation d'un système d'acquisition vidéo (Figure 53).



**Figure 53 : Bille d'alginate de 1 mm (à droite) et de 2 mm (à gauche) placée à côté de la bille de tungstène (2,5 mm de diamètre). La partie supérieure montre le piston servant à l'écrasement (6 mm de diamètre).**

## **5.Conclusion**

Le deuxième générateur de billes fabriqué au cours de ce travail répond donc à nos attentes : fabrication de 400 ml de billes millimétriques en 20 minutes environ, simplicité d'utilisation, autoclavable et coût raisonnable (environ 2800 euros avec la pompe). Les différentes étapes ayant conduit à sa réalisation ont pris 6 mois ce qui est un délai relativement acceptable dans le cadre d'une thèse.

Il est désormais possible de produire dans le laboratoire des billes d'alginate de diamètre défini. Les contrôles qualité mis en place permettent de vérifier avec exactitude les caractéristiques géométriques des lots de billes produits.



# **Chapitre IV : Etude du comportement en lit fluidisé des billes d'alginate et des transferts de matière dans le Bioréacteur**

---



## GLOSSAIRE

$$\text{Ar} = \frac{d_p^3 g \rho_f (\rho_s - \rho_f)}{\mu_f^2}, \text{ nombre d'Archimède}$$

$d_p$  diamètre des particules solides, m

D diamètre du réacteur utilisé, m

$$\text{Fr} = \frac{u^2 \rho_f}{d_p g (\rho_s - \rho_f)} = \frac{\text{Re}^2}{\text{Ar}}, \text{ nombre de Froude}$$

$g = 9,81 \text{ m / s}^2$ , accélération de la gravité

$h$  hauteur du lit fluidisé, m

$$\text{Re} = \frac{\rho_f u d_p}{\mu_f}, \text{ nombre de Reynolds}$$

$$\text{Re}_t = \frac{\rho_f u_t d_p}{\mu_f}, \text{ nombre de Reynolds à la vitesse terminale de chute}$$

$u$  vitesse superficielle du fluide, m/s

$u_{mf}$  vitesse du fluide au minimum de fluidisation, m/s

$u_t$  vitesse terminale de chute d'une particule, m/s

$\Delta p$  perte de pression, Pa

$\varepsilon$  porosité du lit fluidisé

$\varepsilon_0$  porosité du lit tassé

$\mu_f$  viscosité du fluide, Pa.s

$\rho_f$  masse volumique du fluide,  $\text{kg / m}^3$

$\rho_s$  masse volumique des particules solides,  $\text{kg / m}^3$



# Partie I : Comportement en lit fluidisé des billes d'alginate dans le Bioréacteur

---

## 1.Introduction

Les études présentées dans ce chapitre ont pour finalité de caractériser le comportement du foie bioartificiel à lit fluidisé dans des conditions proches de celles rencontrées dans les expérimentations *in vivo*. Elles concernent, d'une part le comportement du lit de billes perfusé par un milieu biologique, et d'autre part la caractérisation des échanges entre le fluide de perfusion et l'intérieur des billes d'alginate. L'originalité de notre approche consiste à exploiter un procédé bien connu en Génie chimique qui n'avait, jusqu'alors, jamais utilisé dans une application biomédicale de type « organe artificiel ». Il est en effet impossible de perfuser un lit fixe de 400 ml de billes d'alginate. Le bioréacteur dont nous disposons a été conçu lors de la thèse de doctorat d'E.Doré à partir d'études menées avec des billes vides et d'une solution de sérum physiologique, dans des conditions donc très éloignées de l'application *in vivo*.

Dans les conditions *in vivo*, il a été observé que le lit de billes était long à se fluidiser. Les billes d'alginate s'accumulent dans la partie supérieure de la colonne. Les billes d'alginate semblent augmenter de volume dans le plasma et devenir plus fragiles. Le but de l'étude présentée dans ce chapitre est donc de comprendre et d'identifier les phénomènes observés *in vivo*, et si nécessaire d'y apporter des solutions.

Pour affiner, voire redéfinir le modèle *in vitro*, nous nous sommes intéressés à l'évolution de l'expansion du lit de billes au sein du bioréacteur pour différentes conditions d'utilisation :

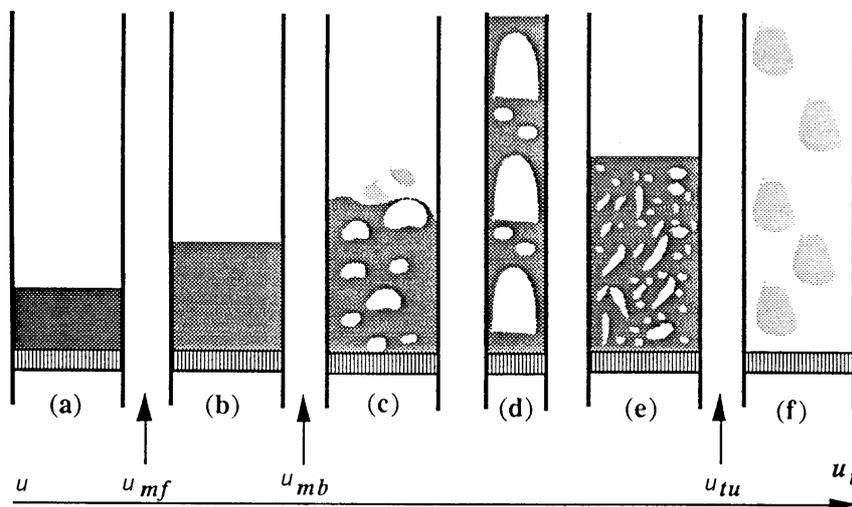
- Changement de fluide de perfusion du bioréacteur.
- Utilisation de billes hébergeant des cellules.

Tout d'abord il apparaît nécessaire de poursuivre l'étude bibliographique entamée dans le chapitre 1 pour approfondir la compréhension du comportement du lit de billes. La partie expérimentale s'appuie sur le recueil des hauteurs fluidisées maximales, autrement dit le suivi

de l'expansion maximale du lit de billes. Cette démarche permet de vérifier si l'évolution est asymptotique (67) et s'il n'y a pas de risques de surélévation du lit lorsque le sérum physiologique est remplacé par un autre fluide. A partir de ces données, nous comparons le comportement du lit fluidisé à ceux décrits dans la littérature, et proposons un redimensionnement du bioréacteur en fonction du cahier des charges.

## 2. Les différents régimes de fluidisation

Le passage d'un fluide à travers une couche de particules solides conduit, selon la vitesse d'entrée du fluide, la nature des phases solide et fluide et la morphologie des particules, à des régimes différents de fluidisation illustrés sur la figure 54 (186 ;187).



**Figure 54 : Différents régimes de fluidisation en fonction de la vitesse superficielle du fluide  $u$ . ( $u_{mf}$  vitesse minimale de fluidisation ;  $u_{mb}$  vitesse minimale de bullage ;  $u_{tu}$  vitesse de transport ;  $u_t$  vitesse terminale de chute(186)) (voir description dans le texte)**

- (a) -  $0 < u < u_{mf}$  lit fixe.
- (b) -  $u_{mf} < u < u_{mb}$  fluidisation homogène ou particulaire.

A partir de la vitesse minimale de fluidisation  $u_{mf}$ , le lit commence à se détacher. Par la suite, le lit s'expande de façon homogène et la porosité  $\epsilon$  croît lentement avec la vitesse du fluide jusqu'à l'atteinte éventuelle d'une vitesse critique  $u_{mb}$  dite vitesse minimale de bullage. Durant cette période, la perte de pression est constante et les particules présentent un mouvement statistique désordonné. Une décroissance de la vitesse provoque un phénomène d'hystérèse avec un retour en lit fixe à la porosité  $\epsilon_{mf}$ . Ce type de fluidisation est

caractéristique des systèmes liquide-solide et, dans ce cas, peut s'étendre à des valeurs très élevées de porosité.

(c) (d) (e) -  $u_{mb} < u < u_{tu}$  fluidisation hétérogène, lit pistonnant (d) et turbulent (e)

(f) -  $u_{tu} < u < u_t$  fluidisation rapide

En fluidisation, les différents régimes d'écoulement sont également différenciés en fonction du nombre de Reynolds particulaire à la vitesse terminale de chute  $Re_t$  et non du nombre de Reynolds  $Re$  comme en mécanique des fluides. Ils sont définis par :

$Re_t < 0,2$  : régime laminaire

$0,2 < Re_t < 500$  : régime intermédiaire

$Re_t > 500$  : régime turbulent

$$\text{Avec } Re_t = \frac{\rho_f u_t d_p}{\mu_f}$$

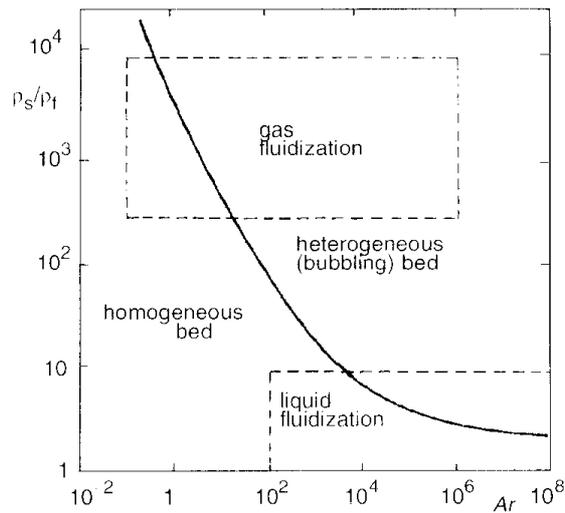
ou  $\rho_f$  est la masse volumique du fluide

$u_t$  est la vitesse terminale de chute de la particule (voir paragraphe 3.1)

$d_p$  est le diamètre des particules

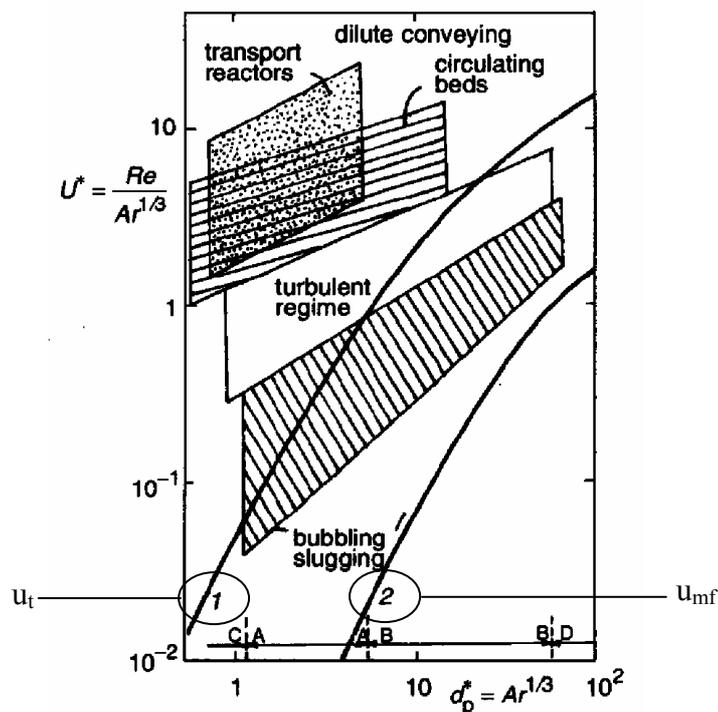
$\mu_f$  la viscosité du fluide.

Il est aussi possible de prédéterminer le comportement principal d'un système fluidisé à l'aide de 2 paramètres adimensionnels, le nombre d'Archimède  $Ar$  et le rapport des masses volumiques  $\rho_s/\rho_f$ , ou le nombre de Reynolds à la vitesse terminale de chute  $Re_t$  et le nombre de Froude  $Fr$  (Figure 55) (188).



**Figure 55 : régions des fluidisations homogènes et hétérogènes suivant le fluide (188)**

L'utilisation de ces prédictions doit se faire avec prudence car elles ne tiennent pas rigoureusement compte de la forme des particules, peu souvent sphériques dans la réalité, qui joue un rôle significatif dans le comportement d'un lit fluidisé. L'abaque de la figure 56 donne une estimation acceptable des différents régimes de fluidisation sans toutefois supplanter l'expérience pratique (189). Ainsi, suivant les caractéristiques des phases fluide et solide employées ( $d_p^*$ ) et suivant le régime de fonctionnement ( $u^*$ ), l'utilisateur peut a priori déterminer le régime de son lit fluidisé.



**Figure 56 : Abaque des différents régimes de fluidisation (1 :  $u_t$ , 2 :  $u_{mf}$ ) (189)**

### 3. La fluidisation homogène

Longtemps, la fluidisation liquide-solide, dite homogène ou particulaire, fut peu utilisée. Cependant, ce procédé suscite un regain d'intérêt avec des utilisations prometteuses dans de nombreuses applications industrielles, surtout en biotechnologie (catalyse enzymatique, traitement d'eaux, purification des protéines ...) (126). Les recherches dans ce domaine se trouvent donc relancées.

De manière plus approfondie, en fluidisation homogène établie, le mouvement global du lit fluidisé est nul. Il reste dans un volume caractéristique de son expansion pour une vitesse  $u$  donnée. Les particules circulent en boucle dans le lit avec une ascension au centre et une descente le long des parois (126). La durée moyenne d'une boucle est  $t = 2h/u$ , donnant ainsi un critère de mélange des particules. Toutefois, ce cas de figure n'est vrai que pour une distribution homogène des vitesses sur la section du réacteur utilisé. Dans le cas contraire, des passages préférentiels du fluide se créent, provoquant une répartition plus désordonnée des deux phases et surtout une diminution des possibles transferts (128). Il convient donc d'être rigoureux sur la distribution du fluide à l'entrée du bioréacteur.

Concernant plus précisément notre projet, le lit de billes dans le bioréacteur présente un comportement principal de fluidisation homogène sous l'action du flux ascendant. Les performances d'un tel lit fluidisé dépendent essentiellement de son expansion caractéristique qui peut influencer les conditions de transfert de matière et le temps de contact entre les deux phases.

Les caractéristiques majeures influant le comportement d'un lit fluidisé sont la vitesse du fluide  $u$ , la porosité  $\varepsilon$  et la perte de pression (ou perte de charges) dans le lit  $\Delta p$ . La vitesse de la phase liquide est, bien sûr, la donnée d'entrée. La porosité caractérise l'expansion du lit et la perte de pression indique la perturbation dynamique due au lit de billes sur la circulation extracorporelle et, a priori, l'état de contraintes dans le bioréacteur.

Les relations entre ces paramètres donnent les lois de comportement du lit fluidisé. A titre d'exemple, pour mieux expliciter ces propos, les résultats bruts caractéristiques se présentent comme suit :

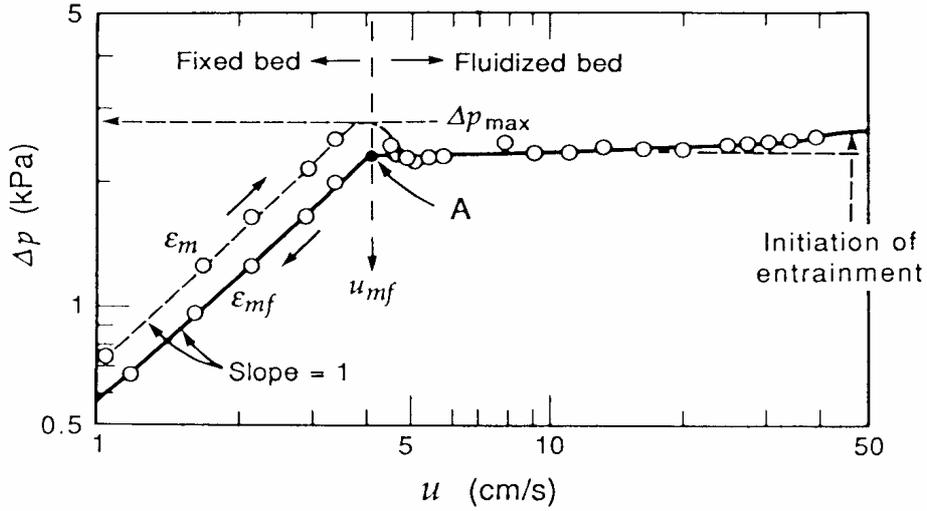


Figure 57 : Exemple d'évolution de la perte de pression due au lit de billes en fonction de la vitesse superficielle du fluide (190)

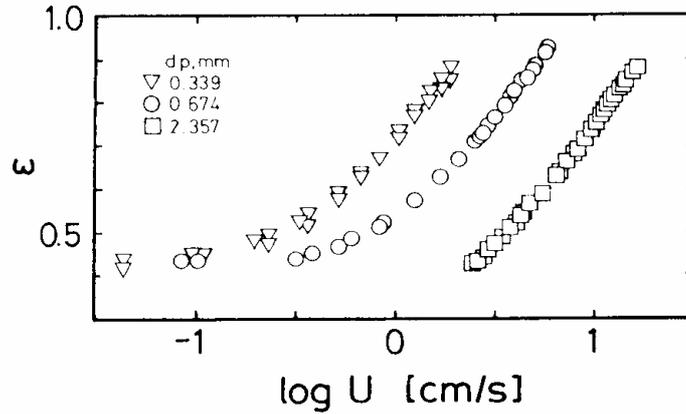


Figure 58 : Exemple d'évolution de la porosité en fonction de la vitesse superficielle du fluide pour différents diamètres de particules (196)

La perte de pression  $\Delta p$  dans le lit tassé augmente avec la vitesse suivant la loi de Ergun jusqu'au minimum de fluidisation :

$$\frac{\Delta p}{\Delta h} \Phi_s^2 - \frac{1,75(1 - \varepsilon_0) \rho_f u^2}{\varepsilon_0^3 d_p} \Phi_s - \frac{150(1 - \varepsilon_0)^2 \mu_f u}{\varepsilon_0^3 d_p^2} = 0 \quad (\text{IV.1})$$

$\Phi_s$  représente la sphéricité des particules. Elle est égale à 1 pour une sphère.

Ensuite, en fluidisation homogène (principalement liquide-solide),  $\Delta p$  est quasiment constante quelles que soient  $u$  et  $\varepsilon$  jusqu'à l'entraînement des particules à  $u = u_t$  (190) (Figure 57). L'évolution de la porosité dépend de la vitesse de perfusion et des tailles et formes des particules (Figure 58).

L'étude du comportement d'un lit fluidisé liquide-solide consiste donc principalement à déterminer l'expansion caractéristique du lit. De nombreux travaux ont été réalisés afin de déterminer la relation de comportement liant la vitesse superficielle du fluide  $u$  (ou vitesse d'entrée) et la porosité  $\varepsilon$  du lit fluidisé c'est à dire l'espace libre entre les billes. Un certain nombre de modèles existe, dont la plupart restent néanmoins empiriques, et vont être présentés ci-après. Mais, avant tout, il est nécessaire de caractériser la vitesse terminale de chute et la vitesse minimale de fluidisation. Ces deux paramètres encadrent les vitesses de perfusion autorisées dans le lit fluidisé et sont utiles pour les modèles présentés.

### 3.1. Vitesse terminale de chute

Le comportement d'une particule dans un fluide dépend principalement des caractéristiques propres des deux phases :  $\rho_f$ ,  $\rho_s$ ,  $\mu_f$  et  $d_p$ . Dans le cas simple où  $\rho_s < \rho_f$ , les particules flottent à la surface du liquide. En fluidisation,  $\rho_s > \rho_f$  et les particules sont immergées. Soumises à un flux ascendant de vitesse connue, elles peuvent se comporter de façons différentes suivant la valeur de leur vitesse terminale de chute. La connaissance de cette dernière apparaît donc nécessaire. Ce paramètre provient de l'étude des efforts agissant sur une particule en chute libre dans un fluide dont le résultat donne :

$$u_t = \left( \frac{4(\rho_s - \rho_f)g d_p}{3\rho_f C_D} \right)^{1/2} \quad \text{où } C_D \text{ est le coefficient de traînée} \quad (\text{IV.2})$$

En situation industrielle, les effets de bords sont souvent négligeables contrairement aux expériences de laboratoire où les réacteurs pilotes utilisés sont souvent de petites tailles. Dans un souci de rendre les résultats de laboratoire plus significatifs, Garside et Al-Dibouni (194) ont regroupé de nombreux résultats expérimentaux afin de comparer  $u_t$  et  $u_{t\infty}$  (vitesse terminale de chute d'une particule dans un fluide sans effets de bords). Cela doit permettre de quantifier ainsi l'influence des effets de bords. D'après ces résultats, pour  $0 < Re_t < 1200$ , ils obtiennent la corrélation  $u_{t\infty}/u_t = 1 + 2,35 (d_p/D)$  représentée sur la figure 59.

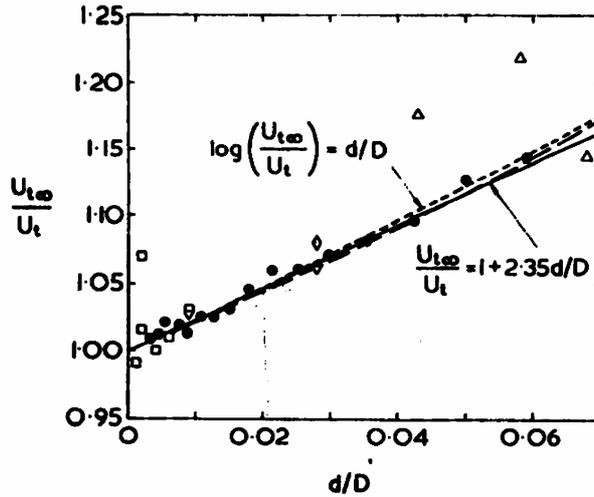


Figure 59 : Influence des effets de bords sur la vitesse terminale (194)

Ce travail nous donne en pourcentage une estimation de  $u_t$  par rapport à  $u_{t\infty}$ , lequel est calculé avec l'équation (IV.2) pour un coefficient de traînée  $C_D = \frac{24}{Re_{t\infty}}$  :

$$u_t = \frac{(\rho_s - \rho_f)g d_p^2}{18\mu_f} \quad (IV.3)$$

Toutefois, en règle générale, le matériel utilisé est tel que  $\frac{d_p}{D} \approx 0$  afin de limiter les effets de bords et de ne pas introduire d'estimations d'erreurs supplémentaires. Par conséquent, le but consiste à évaluer correctement  $u_t$  pour les particules considérées.

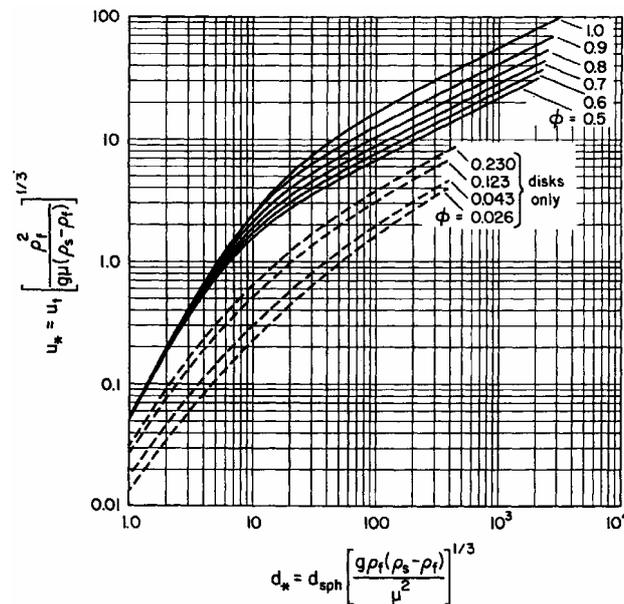
Haider et Levenspiel (190) ont exploité et traité un grand nombre de données menant à l'abaque de la figure 60. Les résultats se basent sur l'équation d'équilibre (IV.2) des efforts exercés sur une particule dans un fluide sans effets de bords. Ils sont valables pour les sphères ( $\Phi_S = 1$ ) quand  $Re_t < 2,6 \cdot 10^5$ , pour les particules isométriques quand  $Re_t < 25000$  et pour  $Re_t < 500$  dans le cas des disques.

Dans ce cas,  $C_D$  est défini comme suit :

$$\text{pour les sphères, } C_D = \frac{24}{Re_t} \left( 1 + 0,1806 Re_t^{0,6459} \right) + \frac{0,4251}{1 + \frac{6880,95}{Re_t}} \text{ avec une erreur de 2,4\%}$$

et, avec une erreur moyenne de 4% pour les particules isométriques et 13% pour les disques,

$$C_D = \frac{24}{Re_t} \left( 1 + 8,1716 e^{-4,0655\Phi_s} \times Re_t^{0,0964+0,5565\Phi_s} \right) + \frac{73,69 Re_t \times e^{-5,0748\Phi_s}}{Re_t + 5,378 e^{6,2122\Phi_s}}$$



**Figure 60 : Abaque permettant de déterminer la vitesse terminale de chute d'une particule**

Plus récemment, Hartman et al (193) ont développé le même type de travail en tenant compte des différences de régime d'écoulement ( $Re_t < 0,05$ , intermédiaire et  $2000 < Re_t < 2.10^5$ ). D'après eux, les relations proposées sont trop nombreuses et compliquées et Haider et Levenspiel (195) surestiment  $C_D$  quand  $\Phi_s = 1$  et  $Re_t > 100$ . La corrélation (IV.4) répond à ces problèmes. Elle est plus simple et applicable à une large gamme d'écoulement  $0,01 < Re_t < 16000$  pour  $0,67 < \Phi_s < 1$  avec une erreur moyenne de 3,3%.

$$\log Ret(Ar, \Phi_s) = \log Ret(Ar, 1) + P(Ar, \Phi_s) \quad (IV.4)$$

où  $\log Ret(Ar, 1) = -1,27380 + 1,04185 \log Ar - 0,060409 (\log Ar)^2 + 0,0020226 (\log Ar)^3$

et

$$P(Ar, \Phi_s) = -0,071876 (1 - \Phi_s) \log Ar - 0,023093 (1 - \Phi_s)(\log Ar)^2 +$$

$$0,0011615 (1 - \Phi_s)(\log Ar)^3 + 0,075772 (1 - \Phi_s)^2(\log Ar)$$

### 3.2.Vitesse minimale de fluidisation

Cette vitesse représente la transition entre le lit fixe et le lit fluidisé. Elle peut être estimée à l'aide de l'équation de Ergun exprimée au minimum de fluidisation, pour des sphères :

$$\frac{1,75}{\mathcal{E}_0^3} \text{Re}_{mf}^2 + \frac{150(1-\mathcal{E}_0)}{\mathcal{E}_0^3} \text{Re}_{mf} = \frac{d_p^3 \rho_f (\rho_s - \rho_f) g}{\mu_f^2} \quad (\text{IV.5})$$

$$\text{avec } \text{Re}_{mf} = \frac{\rho_f u_{mf} d_p}{\mu_f}$$

$$\text{donc } u_{mf} = \frac{\text{Re}_{mf} \mu_f}{\rho_f d_p} \quad (\text{IV.6})$$

## 4. Les principaux modèles d'estimation de la porosité en fonction de la vitesse d'entrée du fluide

### 4.1. Modèles empiriques

**Richardson et Zaki** (196), en 1954, ont fortement contribué en ce sens en établissant la relation empirique (IV.7). Celle ci est encore très largement appréciée actuellement, d'un point de vue pratique, pour sa simplicité, bien qu'affichant une erreur moyenne de l'ordre de 19%.

$$\frac{u}{u_t} = \varepsilon^n \quad (\text{IV.7})$$

|    |  |                                |
|----|--|--------------------------------|
| où | $n = 4,65 + 20 d_p/D$                      | pour $\text{Re}_t < 0,2$       |
|    | $n = (4,4 + 18 d_p/D) \text{Re}_t^{-0,03}$ | pour $0,2 < \text{Re}_t < 1$   |
|    | $n = (4,4 + 18 d_p/D) \text{Re}_t^{-0,1}$  | pour $1 < \text{Re}_t < 200$   |
|    | $n = 4,4 \text{Re}_t^{-0,1}$               | pour $200 < \text{Re}_t < 500$ |
|    | $n = 2,4$                                  | pour $\text{Re}_t > 500$       |

et  $u_t$  est calculée à l'aide de la relation (IV.3).

Mais, depuis, de nombreuses études ont permis d'améliorer en précision la modélisation du comportement des lits fluidisés liquide-solide. La plupart sont empiriques car, en fluidisation, les techniques et les caractères spécifiques étant variés, l'expérimentation est de rigueur et la modélisation n'est pas universelle et sans risques.

Avec les travaux de **Garside et Al-Dibouni** (194) regroupant beaucoup de résultats expérimentaux, une nouvelle corrélation (IV.8) a été suggérée pour modéliser le comportement des lits fluidisés.

$$\frac{u_R - a}{b - u_R} = 0,06 \text{Re}_t^{\varepsilon+0,2} \quad (\text{IV.8})$$

où  $a = \varepsilon^{4,14}$  et  $u_R = \frac{u}{\varepsilon u_t}$

$b = 0,8\varepsilon^{1,28}$  pour  $\varepsilon \leq 0,85$   
 $= \varepsilon^{2,65}$  pour  $\varepsilon > 0,85$   $u_t$  est calculée à l'aide de la relation (IV.3) (IV.3)

Cette relation est applicable pour  $10^{-3} < \text{Re}_t < 3.10^4$ . Elle permet de donner une bonne représentation de l'expansion caractéristique des systèmes liquide-solide pour  $\varepsilon < 0,9$  (figure 61), avec une erreur moyenne de 9%.

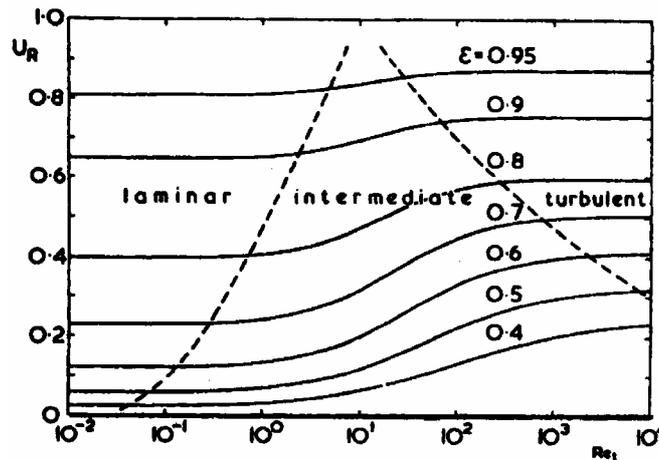


Figure 61 : Représentation de la relation (5) (194)

De la même façon, **Ganguly (197)** a établi une corrélation empirique (IV.9) afin de prévoir directement la hauteur  $h$  du lit fluidisé en fonction uniquement de la vitesse du fluide. Celle-ci est attractive du fait de sa simplicité et donc de sa facilité d'utilisation.

$$h = \frac{1,27M_s}{\rho_s D^2 (1 - 1,762 U + 0,95 U^2)} \quad (\text{IV.9})$$

où  $U = \frac{u - u_{mf}}{u_t - u_{mf}}$

$M_s$  est la masse de solide,  $u_t$  calculée à l'aide de la relation (IV.3) et  $U_{mf}$  à l'aide de la relation (IV.6).

Cette relation indirectement représentée sur la figure 62 est valable pour  $0,12 < \text{Re}_t < 43,66$  et  $\varepsilon < 0,96$ , avec un écart moyen de 11,5% pour les fortes vitesses.

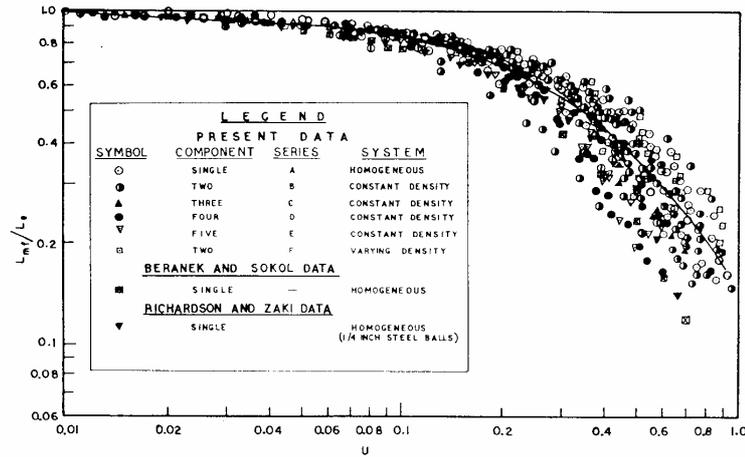


Figure 62 : variation du rapport  $h_{mf}/h$  en fonction de la variable U (197)

Plus récemment, dans la même idée mais pour évaluer directement la porosité du lit fluidisé, une nouvelle corrélation (IV.10) a été introduite par **Hirata et Bulos** (198). Elle est basée sur les écarts observés entre les valeurs de porosité  $\varepsilon_{RZ}$  prédites par **Richardson et Zaki** (196) et les valeurs mesurées.

$$\varepsilon = \varepsilon_0 + (1 - \varepsilon_0) \varepsilon_{RZ}^A \exp(B(1 - \varepsilon_{RZ})) \quad (IV.10)$$

$$\text{où } A = 2,2 n + 8 d_p/D, B = 2,1 n \text{ et } n = \frac{2(2,35 + 0,175 Re_t^{0,75})}{(1 + 0,175 Re_t^{0,75})} \text{ (rappel : } \varepsilon_{RZ} = \left(\frac{u}{u_t}\right)^{1/n} \text{)}$$

Cette corrélation, comparée à d'autres résultats sur la figure 63, prédit la porosité du lit fluidisé avec une erreur moyenne de 4,5% pour  $0,7 < Re_t < 3200$ .

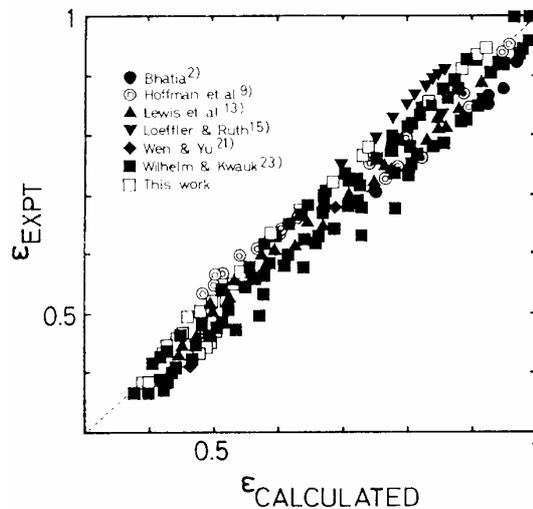


Figure 63 : comparaison des valeurs obtenues par la relation (7) avec d'autres résultats (198)

## 4.2. Modèle semi-empirique

Un autre type d'approche, semi-empirique cette fois, proposé par **Foscolo et al. (199)** consiste à étudier le comportement d'un lit fluidisé en adaptant la théorie bien connue des milieux poreux. Les résultats de cette étude sont représentés par les 3 relations (IV.11), (IV.12) et (IV.13) selon le régime d'écoulement et sont schématisés sur la figure 64.

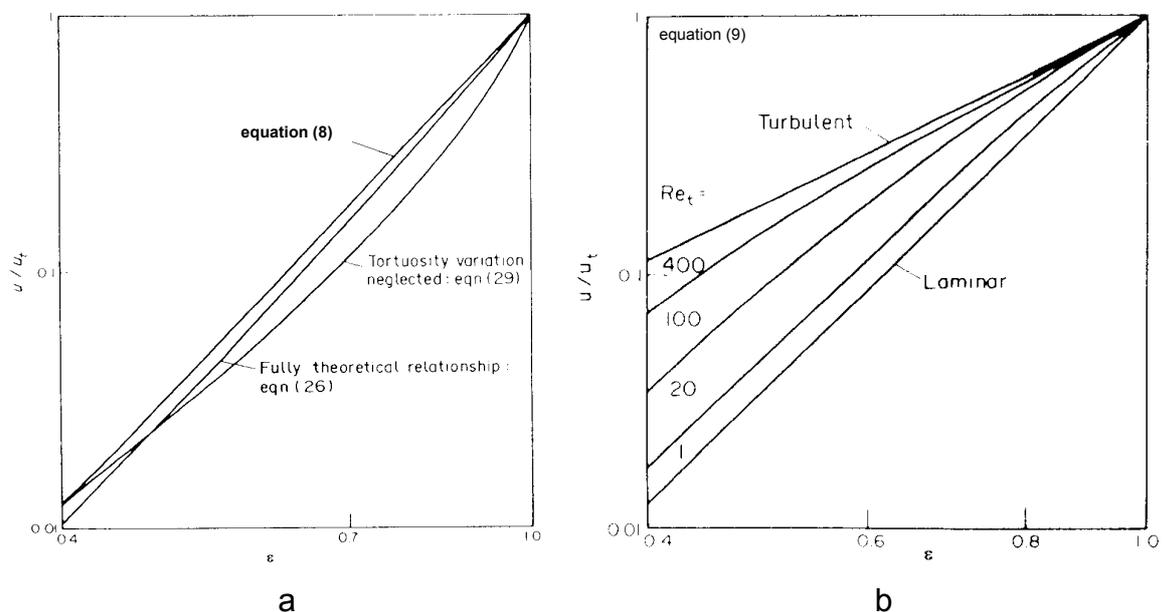
$$\text{En régime laminaire (Re}_t < 0,2) : \frac{u}{u_t} = \frac{\varepsilon^4}{3,33(1-\varepsilon) + \varepsilon^3} \quad (\text{IV.11})$$

$$\text{En régime intermédiaire : } \frac{u}{u_t} = \frac{(0,0777 \text{Re}_t (1 + 0,0194 \text{Re}_t) \varepsilon^{4,8} + 1)^{1/2} - 1}{0,0388 \text{Re}_t} \quad (\text{IV.12})$$

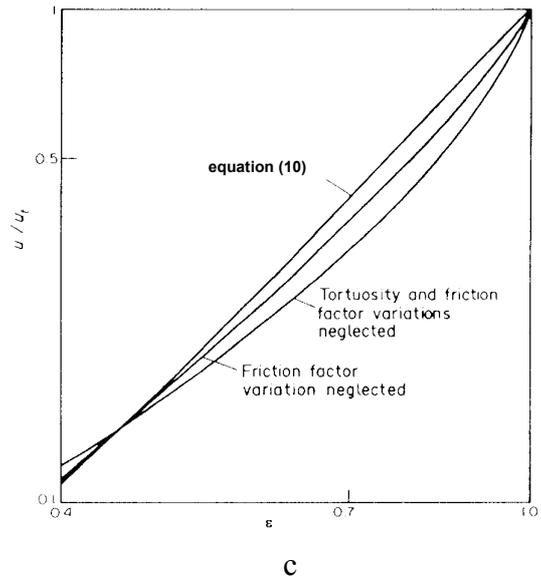
$$\text{Et en régime turbulent (Re}_t > 500) : \frac{u}{u_t} = \left[ \frac{\varepsilon^4}{3,55(1-\varepsilon) + \varepsilon^3} \right]^{1/2} \quad (\text{IV.13})$$

Où  $u_t$  est calculée à l'aide de la relation (IV.3).

Ces relations sont en bonne correspondance avec la relation de **Richardson et Zaki (196)** dont l'explication théorique était l'objet de cette étude, hormis le cas du régime intermédiaire présentant une légère surestimation de la vitesse superficielle du fluide.

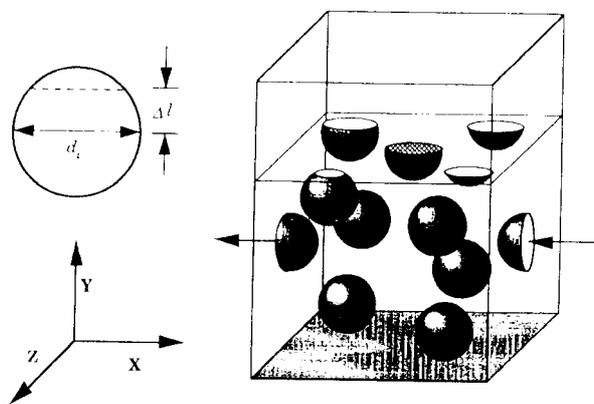


**Figure 64 : Représentations des relations (IV.11) en a, (IV.12) en b et (IV.13) en c (199)**



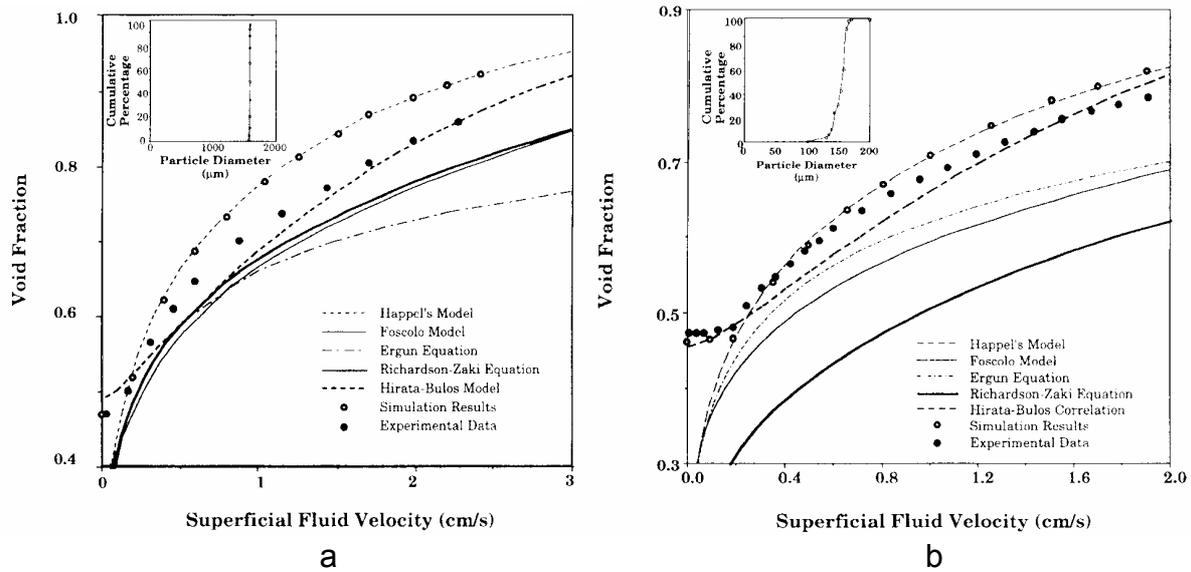
### 4.3. Modèle théorique

Seibert et Burns (200) ont mis au point récemment une technique de simulation dynamique du comportement des lits fluidisés analogue à celle de Monte Carlo. Le lit fluidisé est découpé en éléments de volume représentatifs (figure 65), dans lequel les particules ont un mouvement statistique aléatoire, avec des conditions de continuité et aux limites appropriées.



**Figure 65 : Exemple d'espace simulé (200)**

Les résultats illustrés sur la figure 66 témoignent de la bonne similitude entre les résultats expérimentaux et simulés. Les modèles principaux précédents sont, en plus, reportés dessus et nous permettent de bien observer les différences de prédictions.



**Figure 66 : expansion caractéristique d'un lit fluidisé avec (a) ou sans (b) dispersion de particules (200)**

## 5. Résultats expérimentaux

### 5.1. Caractérisation des phases

Les hauteurs du lit fluidisé sont déterminées en fonction du débit d'entrée pour différents fluides de perfusion (tableau 10). A partir de ces deux paramètres, nous avons choisi d'utiliser du sérum de veau fœtal en lieu et place du plasma puisque ces deux fluides présentent des caractéristiques identiques.

|  | Solution physiologique | Milieu de culture (MEM SVF 10%) | Sérum de veau fœtal (SVF) | Plasma bovin |
|--|------------------------|---------------------------------|---------------------------|--------------|
| Masse volumique $\rho_f$ (kg/m <sup>3</sup> ) (à 37°C) | 1000                   | 1005                            | 1013                      | 1013         |
| Viscosité $\mu_f$ (mPa/s) (à 37°C)                     | 0,75                   | 0,86                            | 1,1                       | 1,1          |

**Tableau 10 : Valeurs de la masse volumique et de la viscosité des fluides utilisés**

La masse volumique des billes a été estimée à 1020 kg/m<sup>3</sup> à 37°C

## 5.2. Evolution de la hauteur du lit de billes dans du milieu de culture

Notre équipe a déjà montré que le comportement du lit de bille au sein du bioréacteur, à un débit donné, est reproductible. Chaque manipulation n'est donc effectuée ici qu'une seule fois, pour chaque volume de bille et pour chaque débit de perfusion. De plus, les cinétiques de montée sont identiques à celles présentées par Seibert et al (200) : partie linéaire de montée et une partie asymptotique.

### 5.2.1. AVEC DES BILLES D'ALGINATE "VIDES"

La hauteur du lit de billes d'alginate sans cellule dans du milieu de culture a été suivie pendant 6 heures pour différents débits de perfusion (31 à 164 ml/min) car cette durée correspond à l'utilisation clinique du bioréacteur. Le volume apparent de billes d'alginate vides est de 100 ml. La hauteur du lit est repérée visuellement grâce aux graduations prévues à cet effet sur la paroi du bioréacteur. Les résultats pour les 30 premières minutes sont présentés sur la figure 67. Cette période s'avère être la plus importante (démarrage, montée puis stabilisation du lit de billes). Après 30 minutes, on a bien vérifié une stabilisation de la hauteur du lit.

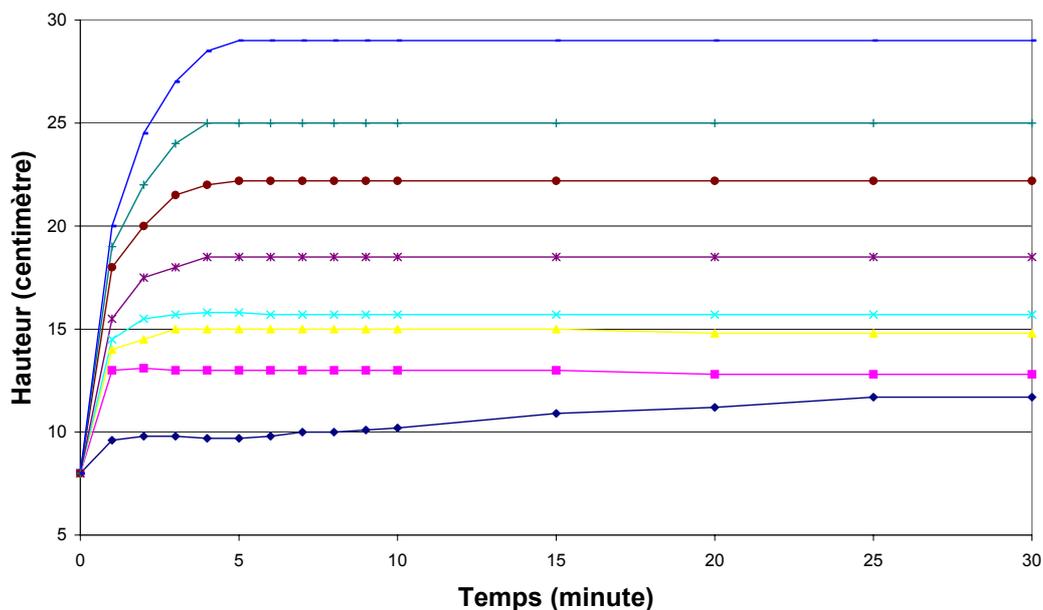


Figure 67 : Evolution de la hauteur du lit fluidisé avec 100 ml de billes vides dans du milieu de culture en fonction du débit (—♦— 31ml/min ; —■— 51ml/min ; —▲— 70ml/min ; —×— 83ml/min ; —\*— 100ml/min ; —●— 125ml/min ; —+— 140ml/min ; —■— 164ml/min )

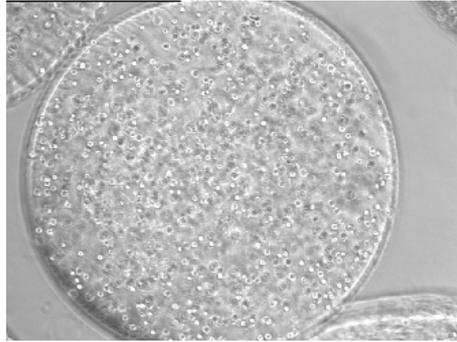
Quel que soit le débit de perfusion, on peut distinguer 2 phases distinctes, l'une dite de montée et l'autre de stabilisation du lit de billes. La phase de montée du lit est rapide et linéaire (5 minutes) pour l'ensemble des débits sauf pour le plus faible pour lequel on enregistre un temps de 25 minutes. Des essais avec des débits différents permettent de mieux apprécier le temps de montée du lit. On observe que plus le débit est élevé (164ml/min), plus le temps nécessaire à la montée est long (5 minutes contre 1 minute pour 51 ml/min). L'évolution est donc asymptotique et le temps nécessaire à la stabilisation est court. Aucune discontinuité n'est observée et aucune surélévation n'a lieu lors de la transition entre cette phase de montée et la phase de plateau qui lui fait suite. Dans tous les cas, la hauteur maximale du lit de billes est observée 30 minutes après le démarrage. On peut réduire cette valeur à 5 minutes si on exclut le débit de perfusion le plus faible (31 ml/min). Les hauteurs maximales observées en fonction des différents débits sont résumées dans le tableau 11.

|                              |      |      |      |      |      |      |     |     |
|------------------------------|------|------|------|------|------|------|-----|-----|
| Débits de perfusion (ml/min) | 31   | 51   | 70   | 83   | 100  | 125  | 140 | 164 |
| Vitesse d'entrée (mm/s)      | 0,4  | 0,7  | 0,9  | 1,1  | 1,3  | 1,7  | 1,9 | 2,2 |
| Hauteur Maximale (cm)        | 11,7 | 12,8 | 14,8 | 15,7 | 18,5 | 22,2 | 25  | 29  |

**Tableau 11 : Hauteur maximale du lit fluidisé en fonction du débit d'entrée (Billes vides + milieu de culture)**

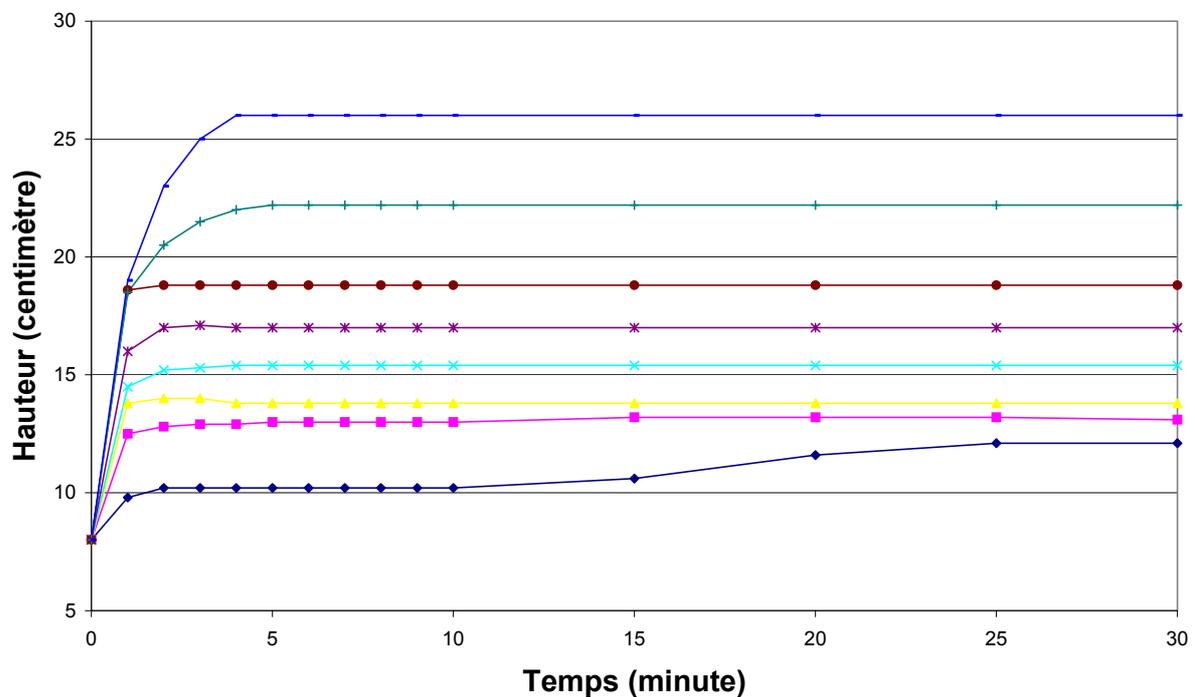
### **5.2.2. AVEC DES BILLES D'ALGINATE HEBERGEANT DES CELLULES**

Ces expérimentations ont été menées avec des billes d'alginate hébergeant des fibroblastes L929. Ces cellules ont été choisies du fait de leur grande facilité de manipulation. En effet, on a besoin de disposer de 100 ml de billes et donc de  $3 \cdot 10^6$  cellules par ml d'alginate. On a augmenté le nombre de cellules par bille afin de maximiser l'éventuel effet sur le comportement en lit fluidisé (Figure 68). Les densités cellulaires ont été évaluées par un comptage après dissolution du gel d'alginate pour les billes au bout de 6 heures de fluidisation. La viabilité a été estimée par un test au bleu trypan.



**Figure 68 : Bille d'alginate hébergeant des fibroblastes (3300 cellules)  
(Microscopie optique ; grossissement x3000)**

Comme précédemment, la hauteur du lit de billes d'alginate avec cellules dans du milieu de culture a été suivie pendant 6 heures pour différents débits de perfusion (31 à 164 ml/min.). Les résultats sont présentés sur la figure 69. Comme au paragraphe 5.2.1, on a choisi de ne représenter que les 30 premières minutes.



**Figure 69 : Evolution de la hauteur du lit fluidisé avec 100 ml de billes avec cellules dans du milieu de culture en fonction du débit (—◆— 31ml/min ; —■— 51ml/min ; —▲— 70ml/min ; —×— 83ml/min ; —\*— 100ml/min ; —■— 125ml/min ; —+— 140ml/min ; —— 164ml/min )**

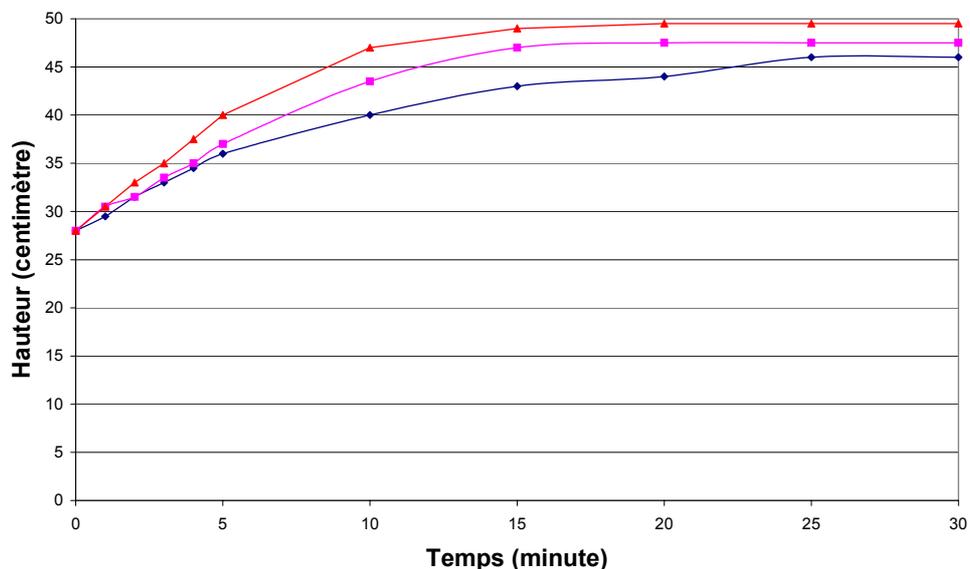
Pour l'ensemble des débits de perfusion, comme précédemment, aucune discontinuité n'est observée et aucune surélévation n'a lieu lors de la transition entre cette phase de montée et la phase de plateau qui lui fait suite. La valeur maximale de la hauteur du lit de billes est observée 30 minutes après le démarrage. Les hauteurs maximales observées en fonction des différents débits sont résumées dans le tableau 12.

|                              |      |      |      |      |     |      |      |     |
|------------------------------|------|------|------|------|-----|------|------|-----|
| Débits de perfusion (ml/min) | 31   | 51   | 70   | 83   | 100 | 125  | 140  | 164 |
| Vitesse d'entrée (mm/s)      | 0,4  | 0,7  | 0,9  | 1,1  | 1,3 | 1,7  | 1,9  | 2,2 |
| Hauteur Maximale (cm)        | 12,1 | 13,1 | 13,8 | 15,4 | 17  | 18,8 | 22,2 | 26  |

**Tableau 12 : Hauteur maximale du lit fluidisé en fonction du débit d'entrée (Billes avec cellules + milieu de culture )**

### 5.3. Evolution de la hauteur du lit dans du sérum de veau foetal (SVF)

Le volume apparent de billes d'alginate vides est cette fois de 350 millilitres. La hauteur du lit de billes d'alginate dans du sérum de veau a été suivie pendant 6 heures pour différents débits de perfusion (20, 25 et 30ml/min). Les résultats des 30 premières minutes de chaque manipulation sont présentés sur la figure 70.



**Figure 70 : Evolution de la hauteur du lit fluidisé avec 350 ml de billes vides dans du sérum de veau foetal en fonction du débit (—◆— 20ml/mn ; —■— 25ml/mn ; —▲— 30ml/mn )**

Les hauteurs maximales observées en fonction des différents débits sont résumées dans le tableau 13.

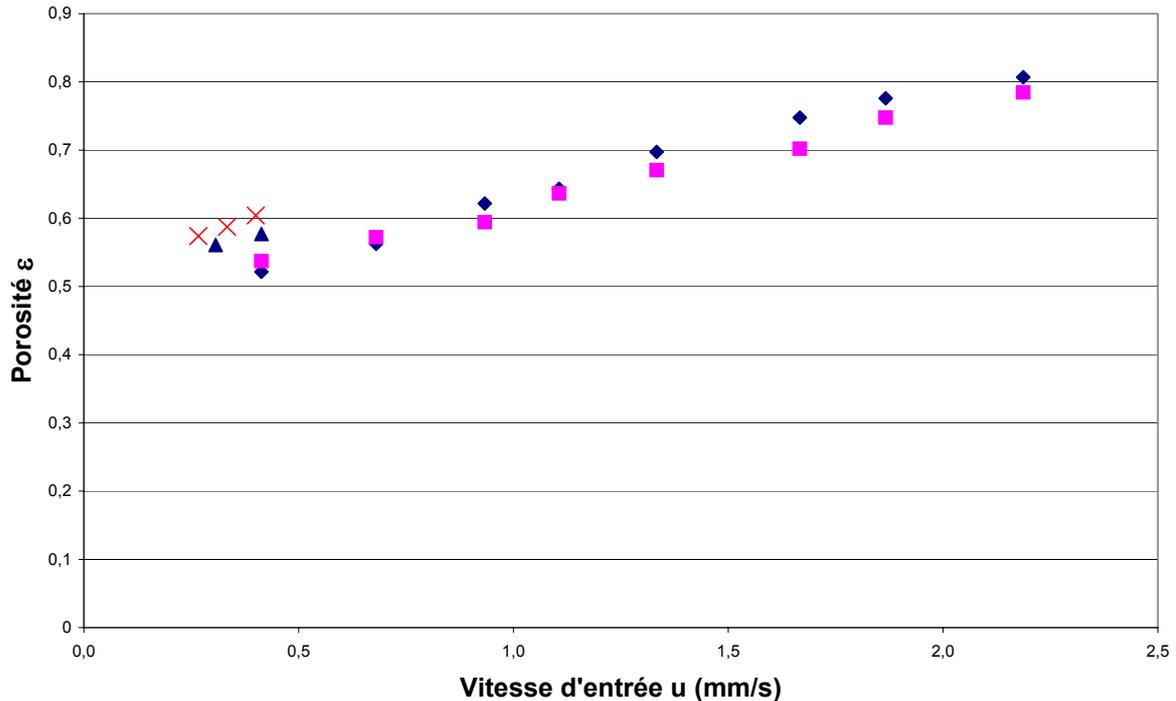
|                              |      |      |      |
|------------------------------|------|------|------|
| Débits de perfusion (ml/min) | 20   | 25   | 30   |
| Vitesse d'entrée (mm/s)      | 0,27 | 0,33 | 0,4  |
| Hauteur<br>Maximale<br>(cm)  | 46   | 47,5 | 49,5 |

**Tableau 13 : Hauteur maximale du lit fluidisé en fonction du débit d'entrée (Billes sans cellule + sérum de veau fœtal )**

## 6. Commentaires et Analyses

### 6.1. Evolution du modèle *in vitro*

L'expansion du lit de billes est caractérisée par l'évolution de sa porosité en fonction de la vitesse de perfusion. Cette évolution représente le comportement du lit fluidisé. Les résultats présentés sur les figures 67 à 70 peuvent être remaniés pour exprimer la porosité  $\epsilon$  en fonction de la vitesse d'entrée  $u$ . La relation entre la hauteur fluidisée et la porosité a été donnée au chapitre II paragraphe 6.2.1.1.



**Figure 71 : évolution de la porosité dans le lit de billes en fonction de la vitesse d'entrée pour des volumes apparents de billes vides et avec cellules ; billes vides + MEM(♦) ; billes L929 + MEM(■) ; billes vides +SVF (x) ; billes vides + plasma bovin(▲))**

La figure 71 montre des évolutions similaires pour tous les types et tous les volumes de billes. Ceci dénote le caractère unique du comportement du lit fluidisé en présence de phases « fluide » différentes. Les évolutions observées sont donc similaires à celle observé avec du milieu physiologique.

Il ne semble pas que les cellules encapsulées aient la moindre influence néfaste sur le comportement global du lit fluidisé. Aucune fuite de billes n'a été observée même pour les débits les plus élevés, favorables au décrochement. On peut en conclure que la présence de cellules dans les billes ne change pas leur masse volumique  $\rho_s$ . Si la présence de cellules n'a pas d'incidence sur l'élévation, en revanche, le fluide de perfusion semble en avoir une. Afin de vérifier ce point, il est nécessaire de mener des expérimentations dans un milieu ayant une masse volumique supérieure à celle du milieu de culture (MEM SVF 10%).

Comme le montre la figure 71, pour le cas billes vides + Sérum de Veau Fœtal (SVF), le comportement du lit de billes dans du SVF en absence de cellules est linéaire sur la gamme de vitesses étudiées. La masse volumique du sérum de veau fœtal ( $1013 \text{ Kg/m}^3$ ) étant supérieure à celle du sérum physiologique ( $1000 \text{ Kg/m}^3$ ), le rapport des masses volumiques

diminue. Ceci se traduit une surélévation du lit de billes dans ce milieu par rapport au milieu de culture.

L'étude du comportement du lit fluidisé de billes d'alginate dans du plasma humain n'a pas été réalisée. Néanmoins, dans une précédente étude, ce comportement avait été étudié dans du plasma bovin (185). Seules sont présentées sur la figure 71, à titre informatif, les valeurs de porosité pour des vitesses d'entrée de 0,3 et 0,4 mm/sec (soit 23 et 31 ml/min). On remarque que ces deux points sont quasiment confondus avec leurs homologues obtenus dans du Sérum de Veau Fœtal, ce qui est logique au vu des mesures rhéologiques rapportées dans le tableau 10. Cependant, ce résultat doit être relativisé. En effet, le plasma bovin utilisé lors de ces manipulations avait été obtenu, après plasmaphérèse par filtration membranaire, à partir de sang provenant des abattoirs de Compiègne. Afin de prévenir tout risque de coagulation (caillots s'accumulant dans le filtre), le sang de bœuf était hépariné à raison de 12500 UI par litre de sang. Toutefois, il a été nécessaire de mettre en solution cette héparine dans 500 millilitres de tampon PBS (pour 5 litres de sang bovin) afin de favoriser le mélange du sang et de l'héparine. Ceci induit donc une dilution supplémentaire. C'est pourquoi les résultats obtenus ne doivent être considérés que comme une tendance et non comme le reflet réel du comportement du lit de billes dans du plasma. De plus, il faut aussi garder à l'esprit que les billes, avant leur utilisation dans le bioréacteur, baignent dans une solution dite de conservation (solution physiologique ou milieu de culture suivant le cas). Après introduction de celles-ci dans le bioréacteur, cette solution est éliminée par gravité. Toutefois, il est impossible de l'éliminer en totalité ce qui introduit un facteur de dilution qu'il est difficile d'évaluer. Ce phénomène est d'autant plus marqué que le volume de billes est grand. Une étude récente menée dans le laboratoire a mis en évidence ce phénomène. Dans un même milieu et pour un même volume (plasma, solution d'albumine à 70 g/l), le comportement des billes varie : en fonction du nombre de billes mises en solution, elles peuvent couler ou bien flotter.

## **6.2.Comparaison avec les modèles de la littérature**

On peut analyser les comportements des billes d'alginate en fluidisation en fonction des modèles proposés dans la bibliographie. Pour cela, on représente la porosité en fonction du rapport adimensionnel  $u/u_t$ . On calcule pour chaque type de fluide et de bille la vitesse terminale de chute par la formule de Hartman (IV.4) et la vitesse minimale de fluidisation par la formule (IV.6) (Tableau 14).

|                      | Ar   | Re <sub>t</sub> | U <sub>t</sub> (mm/s) | U <sub>mf</sub> (mm/s) |
|----------------------|------|-----------------|-----------------------|------------------------|
| Sérum physiologique  | 185  | 6,3             | 6,52                  | 0,05                   |
| Milieu de culture    | 200  | 6,7             | 5,76                  | 0,04                   |
| Sérum de veau foetal | 57,5 | 2,4             | 2,63                  | 0,016                  |
| Plasma bovin         | 57,5 | 2,4             | 2,63                  | 0,016                  |

**Tableau 14 : Valeurs calculées du nombre d'Archimède Ar, du nombre de Reynolds à la vitesse terminale de chute Re<sub>t</sub>, la vitesse terminale de chute U<sub>t</sub> pour les différents milieux utilisés et de la vitesse minimum de fluidisation U<sub>mf</sub>.**

La relation de **Richardson et Zaki** (196) se traduit par :

$$\frac{u}{u_t} = \varepsilon^n \rightarrow \varepsilon = \left( \frac{u}{u_t} \right)^{1/n} \quad (\text{IV.14})$$

$$\text{pour } 1 < \text{Re}_t < 200 \rightarrow n = (4,4 + 18(d_p/D)) * (\text{Re}_t)^{-0,1}$$

La relation de **Ganguly** (197) devient :

$$\frac{h}{h_0} = \frac{1}{1 - 1,762U + 0,95U^2} \quad \text{avec} \quad U = \frac{u - u_{mf}}{u_f - u_{mf}}$$

$$\text{d'où } \varepsilon = 1 - (1 - \varepsilon_0) \frac{h_0}{h} = f(u) \quad (\text{IV.15})$$

La loi développée par **Hirata et Bulos** (198) tient compte de la loi de Richardson et Zaki(191). On effectue une correction du  $\varepsilon$  obtenue par la relation de Richardson et Zaki à partir de l'expression (IV.10)

La relation de **Foscolo et al.**(199) devient :

$$\varepsilon = \left( \frac{\left( 1 + 0,0388 * \text{Re}_t * \left( \frac{u}{u_t} \right)^2 - 1 \right)^{1/4,8}}{0,0777 * \text{Re}_t (1 + 0,0194 * \text{Re}_t)} \right) \quad (\text{IV.16})$$

Nous n'utilisons pas la loi expérimentale de Garside et Al Dibouni (194) car elle ne présente pas un développement simple : il est difficile d'exprimer  $\varepsilon$  en fonction de  $u/u_t$ . L'ensemble des résultats est rassemblé sur les figures 72 à 75.

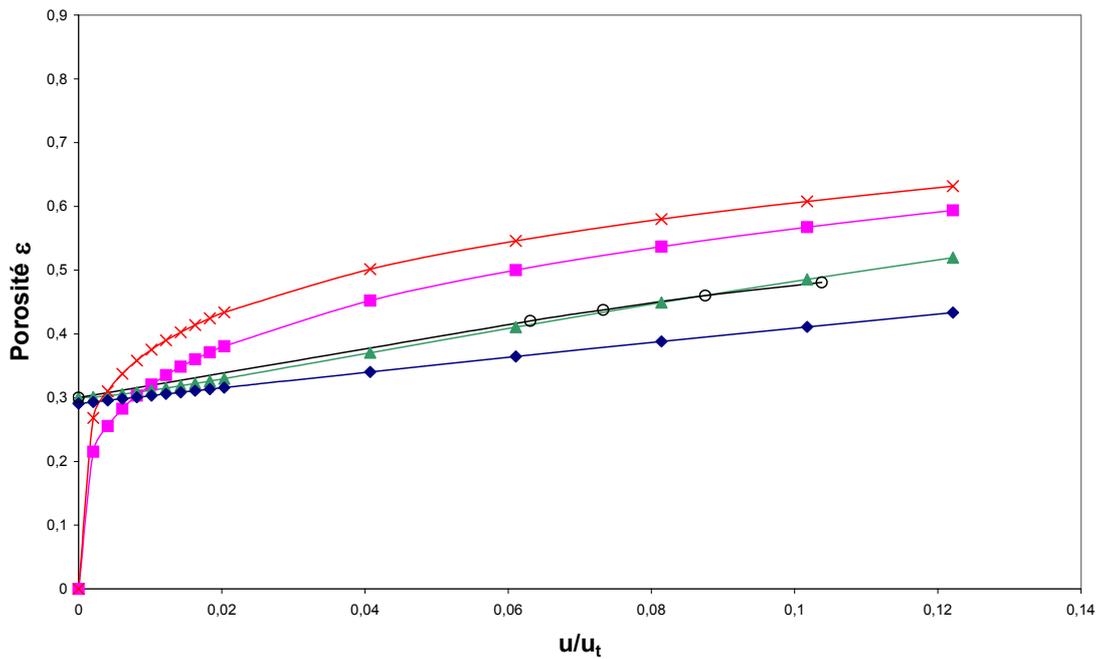


Figure 72 : Comparaison de l'évolution de la porosité en fonction de la vitesse d'entrée entre les résultats expérimentaux dans du *sérum physiologique* (—□—) et différents modèles (Richardson et Zaki —■— ; Ganguly —◆— ; Hirata et Bulos —▲— ; Foscolo —×—)

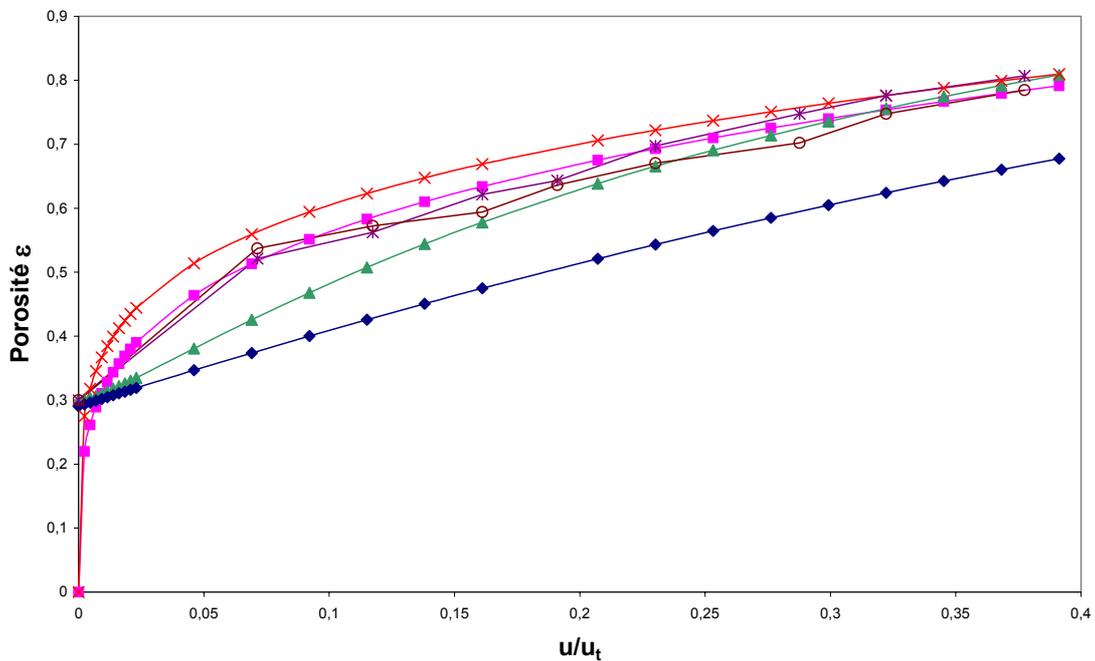


Figure 73 : Comparaison de l'évolution de la porosité en fonction de la vitesse d'entrée entre les résultats expérimentaux dans du *milieu de culture* (billes vides —\*— ; billes avec cellules —○—) et différents modèles (Richardson et Zaki —■— ; Ganguly —◆— ; Hirata et Bulos —▲— ; Foscolo —×—)

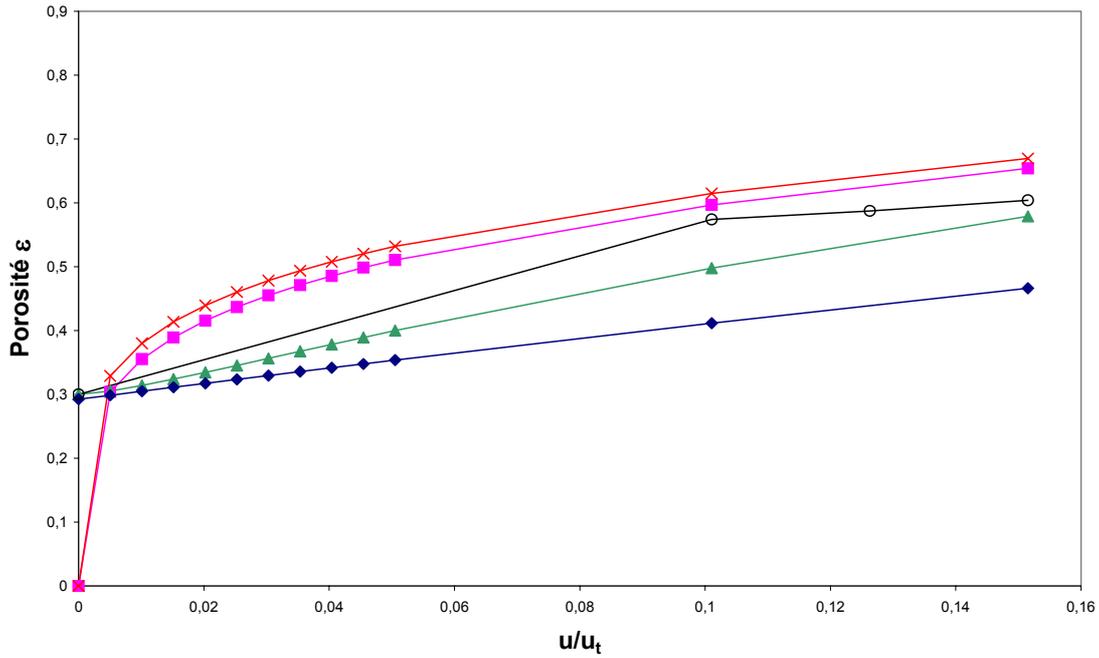


Figure 74 : Comparaison de l'évolution de la porosité en fonction de la vitesse d'entrée entre les résultats expérimentaux dans du *sérum de veau fœtal* (—□—) et différents modèles (Richardson et Zaki —■— ; Ganguly —◆— ; Hirata et Bulos —▲— ; Foscolo —×—)

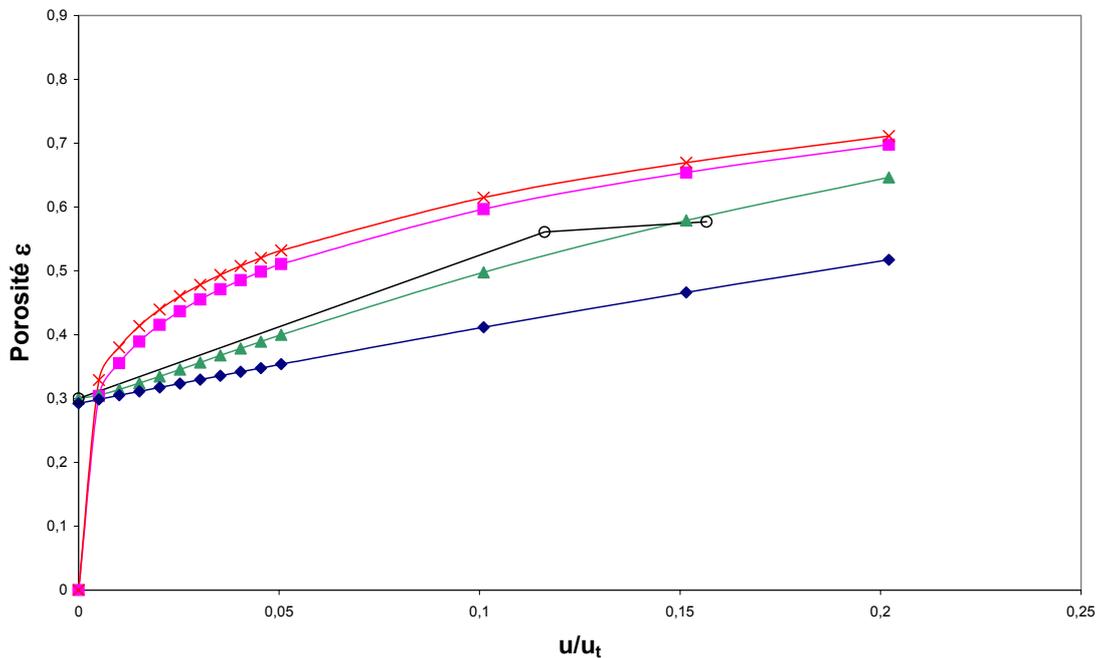


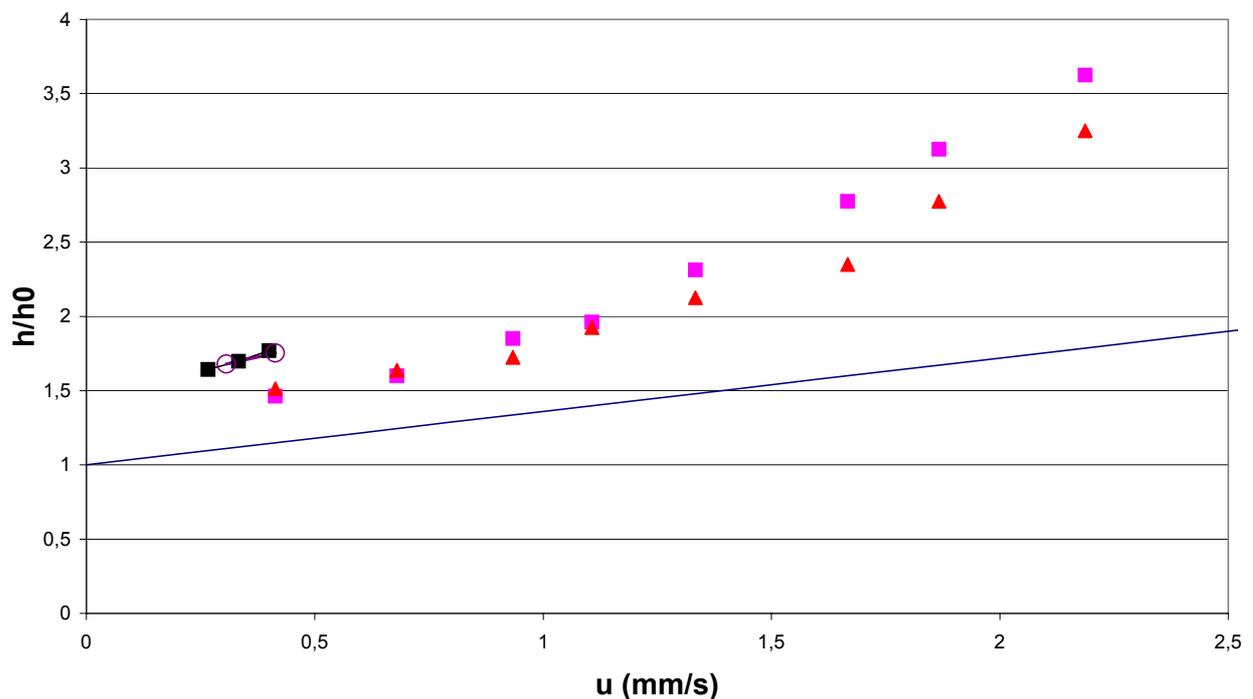
Figure 75 : Comparaison de l'évolution de la porosité en fonction de la vitesse d'entrée entre les résultats expérimentaux dans du *plasma bovin* (—□—) et différents modèles (Richardson et Zaki —■— ; Ganguly —◆— ; Hirata et Bulos —▲— ; Foscolo —×—)

Les modèles les plus proches de nos données expérimentales sont ceux développés par Hirata et Bulos et Richardson et Zaki. Ils offrent une estimation correcte pour l'ensemble de nos cas. Nous pouvons donc utiliser les lois de comportement correspondantes.

Dans un souci de simplification et donc de meilleure compréhension pour les non-spécialistes, la figure 44 montre l'évolution de la hauteur finale rapportée à la hauteur initiale en fonction de la vitesse de perfusion. Les mesures expérimentales préliminaires effectuées avec les billes vides dans du sérum physiologique avaient permis d'établir une corrélation très simple entre  $h/h_0$  et les vitesses d'entrée  $u$  :

$$h/h_0 = 1 + 359,5 u \quad (\text{avec } u \text{ en m/s}) \quad (IV.17)$$

Comme en témoigne la figure 76, pour les cas billes vides + MEM et billes L929 + MEM, on observe des valeurs supérieures à celles prédites par le modèle préliminaire pour une vitesse d'entrée donnée.



**Figure 76 : Comparaison de la hauteur du lit fluidisé adimensionnée entre des billes vides + sérum physiologique (—) ; billes vides + MEM(■) ; billes L929 + MEM(▲) ; billes vides +SVF (■)et billes vides + plasma bovin(○)**

Cette interpolation semble donc trop simple pour le modèle *in vitro* actuel de foie bioartificiel.

### 6.3.Redimensionnement

Dans ces conditions, à partir de ces résultats obtenus avec des conditions expérimentales plus proches des conditions cliniques, il est nécessaire de proposer un ajustement des dimensions du foie bioartificiel à lit fluidisé. Pour proposer une correction des dimensions du bioréacteur, nous nous sommes appuyés sur les essais réalisés avec du sérum de veau fœtal dans le bioréacteur taille 1 pour un volume de bille de 350 ml. Le but de ce nouveau dimensionnement est de déterminer l'ergonomie du bioréacteur permettant d'assurer les conditions émises dans le cahier des charges :

- Le débit plasmatique maximal est de 50 ml/min
- Les billes d'alginate ont un volume apparent total maximal de 400 ml

Deux approches existent pour le redimensionnement

#### 1. On conserve le même diamètre de bioréacteur

Pour un débit de 50 ml/min, la vitesse de perfusion  $u$  est donc de 0,667 mm/s. On peut estimer la porosité du lit fluidisé dans ces conditions d'après les modèles de Richardson et Zaki, ou Hirata et Bulos, qui décrivent assez bien le comportement.

On trouve, à l'aide des relations (IV.14) et (IV.10).

$$\varepsilon \text{ Richardson et Zaki} = \mathbf{0,733}$$

$$\varepsilon \text{ Hirata et Bulos} = \mathbf{0,703}$$

On peut donc calculer les hauteurs finales de fluidisation :

$$\frac{h_f}{h_0} = \frac{1 - \varepsilon_0}{1 - \varepsilon} = 2,62 \text{ (avec Richardson et Zaki)}$$

$$\frac{h_f}{h_0} = 2,36 \text{ (avec Hirata et Bulos)}$$

Soit un volume fluidisé global  $V_f$  de :

$$\frac{V_f}{V_0} = \frac{h_f}{h_0} = 1048 \text{ ml (avec Richardson et Zaki)}$$

$$\frac{V_f}{V_0} = \frac{h}{h_0} = 944 \text{ ml (avec Hirata et Bulos)}$$

Le volume mort dans cette nouvelle géométrie est de :

648 ml (avec Richardson et Zaki)

544 ml (avec Hirata et Bulos)

## 2. On modifie le diamètre du bioréacteur.

Dans ce cas, il convient de travailler à une vitesse de perfusion suffisante, mais ne générant pas une surélévation trop forte du lit. On peut choisir la vitesse de  $u=0,27 \text{ mm/s}$ , qui assure une bonne mise en fluidisation des particules. L'expansion du lit est de 64 %, d'après

nos valeurs expérimentales, ce qui correspond à  $\frac{h}{h_0} = 1,64$

La section du bioréacteur vaut alors :

$$S = \frac{Q}{u} = 20,8 \text{ cm}^2$$

Le volume final est donc de :

$$V_f = 1,64 \times h_0 \times S = 1,64 \times V_0 = 656 \text{ ml}$$

Les deux approches sont résumées dans le tableau 15 :

| Volume de billes (ml) | Section du bioréacteur (cm <sup>2</sup> ) | Vitesse de perfusion (mm/s) | Porosité du lit | Volume de la colonne (ml) | Volume mort (ml) |
|-----------------------|---|-----------------------------|-----------------|---------------------------|------------------|
| 400                   | 12,6                                      | 0,67                        | 0,70-0,73       | 944-1048                  | 544-648          |
| 400                   | 20,8                                      | 0,27                        | 0,57            | 656                       | 256              |

**Tableau 15 : récapitulatif des possibilités de dimensionnement du bioréacteur pour un débit d'entrée  $Q=50\text{ml/min}$**

Il apparaît donc plus profitable d'augmenter la section du bioréacteur que d'accroître la hauteur de la colonne. Ceci impose donc de fabriquer un nouveau bioréacteur muni d'une nouvelle buse de répartition.

## 7. Conclusion

Nous pouvons donc conclure que la présence de cellules dans les billes d'alginate n'est pas à l'origine des différences de comportement observées pendant les expérimentations *in vivo*. La différence de comportement du lit fluidisé est due aux différences de masse volumique des fluides utilisés. La masse volumique des billes étant constante (très faible variation avec des cellules), l'augmentation de masse volumique du fluide diminue le rapport masse volumique des billes / masse volumique du fluide ce qui aboutit à la surélévation du lit de billes. Dans ces dimensions actuelles, le bioréacteur ne permet donc pas de respecter le cahier des charges en terme de débit de perfusion maximale. Une solution consiste à concevoir un second bioréacteur grâce aux données présentées dans ce chapitre. Une autre solution à ce problème serait d'alourdir les billes d'alginate, par adjonction de grains de magnétite ou de billes de verre micrométriques par exemple, puisque le fluide de perfusion, en conditions cliniques, est du plasma dont la masse volumique est évidemment impossible à modifier.

## **Partie II : Etude des transferts de matière en fonction du soluté dans du plasma**

---

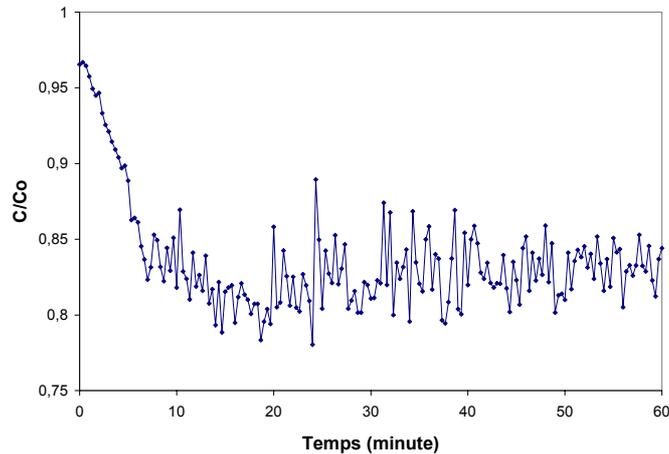
### **1.Introduction**

L'immobilisation d'hépatocytes dans des billes d'alginate est une méthode simple et peu coûteuse. Les billes d'alginate présentent un rapport surface/volume élevé favorable aux échanges et leur structure poreuse doit préserver les cellules contre les attaques immunitaires (IgG, PM = 150 000 Da) sans toutefois empêcher leurs fonctions synthétiques (synthèse d'albumine par exemple) et interactions avec des substances situées dans le plasma (ammoniac, métabolites résiduels...). En conséquence, une étude approfondie des transferts de matière entre le fluide et les billes est nécessaire afin de vérifier l'efficacité du procédé. En configuration dynamique, l'apport de la fluidisation sur les transferts, donc de la convection, est analysé avec différents solutés. La méthodologie est décrite au paragraphe 6.3 du chapitre II. Les résultats obtenus dans du plasma pourront être comparés à ceux obtenus par E.Doré (1) avec une solution physiologique. Ces résultats sont représentés par des courbes de concentration normalisée en fonction du temps. Dans tous les cas, l'axe des ordonnées représente la concentration  $C$  divisée par la concentration initiale  $C_0$  du soluté et l'axe des abscisses le temps. L'intérêt étant de vérifier si un élément de poids moléculaire connu (Vitamine B<sub>12</sub> 0,2 g/l, PM = 1355 Da ; Cytochrome C 0,125 g/l, PM = 12400 Da) peut entrer puis sortir des billes, dans un deuxième temps, un bilan de masse est effectué afin d'évaluer les masses de soluté diffusées et relarguées par les billes dans du plasma.

### **2.Transferts de masse pour la vitamine B<sub>12</sub>**

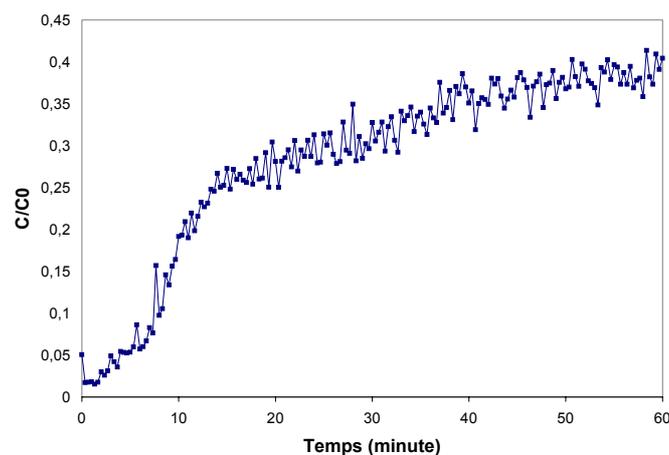
Le bioréacteur utilisé est le bioréacteur de taille  $\frac{1}{4}$ . Le débit est de 16 ml/mn, le lit occupe la totalité du bioréacteur : quelques billes sortent de la colonne et recirculent dans le circuit. Lors du passage de celles-ci au niveau du spectrophotomètre, elles provoquent du bruit dans le signal (pics).

En phase d'« **absorption** » (Figure 77), l'élément rentre dans les billes comme en témoigne la baisse de la concentration en vitamine B 12 dans le réservoir qui alimente le circuit de mesure. L'équilibre est plus long à s'établir (10 minutes) qu'avec du sérum physiologique (5 minutes). A 30 minutes, la valeur de  $C/C_0$  est proche de celle mesurée dans du sérum physiologique (0,83 / 0,85).



**Figure 77 : Absorption de vitamine B 12 dans du plasma**

En « **relargage** » (Figure 78), le soluté sort des billes comme en témoigne cette fois la hausse de la concentration dans le réservoir. La sortie du soluté semble, là aussi, retardée, l'équilibre des concentrations n'étant pas obtenu au bout d'une heure (contre 25 minutes pour du sérum physiologique). La valeur de  $C/C_0$  est une nouvelle fois plus haute (0,3) que celle observée avec du sérum physiologique (0,2).



**Figure 78 : Relargage de vitamine B 12 dans du plasma**

A partir de ces résultats, on peut calculer si la quantité de matière relarguée correspond à la quantité absorbée. Après une heure de fluidisation, la masse de vitamine B 12 absorbée est de 4,85 mg et celle relarguée de 2,53 mg. Cependant, l'état d'équilibre n'étant pas atteint lors de la phase de relargage, on peut supposer qu'une partie du soluté est encore dans les billes. On peut supposer que cette différence est due au débit plus faible que celui utilisé dans les études précédentes (16 contre 30 ml/min).

### 3. Transferts de masse pour du cytochrome C

Les figures 79 et 80 représentent l'évolution des concentrations normalisées par rapport à la concentration initiale. En « **absorption** », la diminution de la concentration du soluté dans le réservoir est très progressive. L'évolution est comparable à celle obtenue en solution saline bien que les valeurs finales soient plus faible. On remarque que le rapport  $C/C_0$  descend à un niveau plus bas que la valeur observée avec la vitamine B 12 alors que le poids moléculaire du cytochrome C est dix fois supérieur. Ceci peut être le signe de l'adsorption du soluté sur les billes.

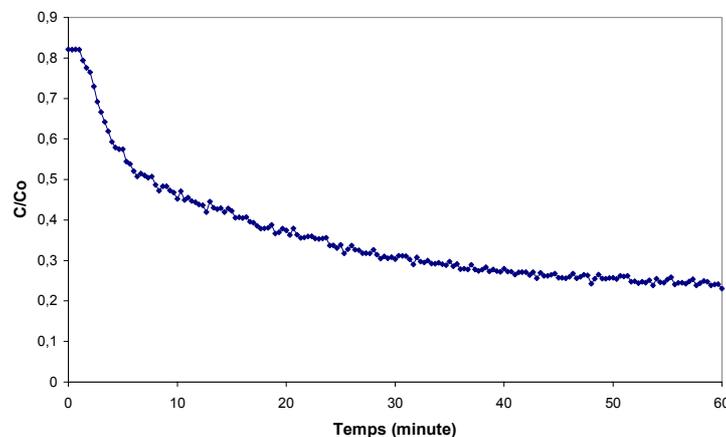
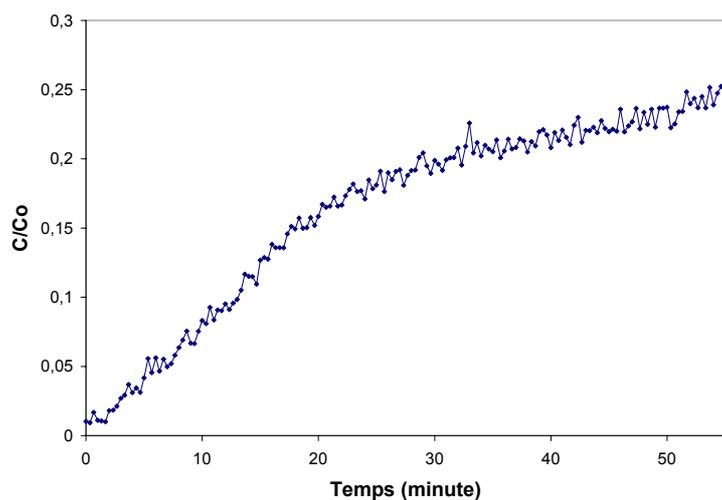


Figure 79 : Absorption de cytochrome C dans du plasma



**Figure 80 : Relargage de cytochrome C dans du plasma.**

Les transferts de matière sont semblables à ceux observés dans du sérum physiologique. Les masses **absorbée** et **relarguée** sont respectivement de 9 mg et 1,1 mg, ce qui traduit manifestement une rétention de Cytochrome C dans les billes ou sur les billes.

Les transferts de matière sont plus lents dans du plasma mais les quantités échangées restent les mêmes. Une adsorption du soluté sur les billes d'alginate reste à étudier, pour expliquer les écarts observés.

#### **4. Commentaires et analyse**

##### **4.1. Etude de l'adsorption éventuelle de la vitamine B 12 et du Cytochrome C sur les billes**

Après la phase d'absorption de vitamine B12, on rince au maximum le bioréacteur en circuit ouvert jusqu'à obtenir une DO nulle (témoignant de l'absence du soluté considéré dans le liquide de rinçage) en sortie du bioréacteur. La décroissance de la densité optique nous permet de suivre en temps réel l'efficacité du processus. Pour cela, le circuit de mesure est légèrement modifié, l'entrée du bioréacteur est placée au niveau d'un réservoir contenant trois litres de solution physiologique. La sortie du bioréacteur est directement reliée à la cuve en quartz à circulation. A la sortie de la cuve, on place un réservoir permettant de recueillir le liquide de rinçage.

Au cours du temps le soluté se répartit de la façon suivante (Tableau 16):

|   |             | Masse (mg) |
|---|-------------|------------|
| Masse initiale dans le réservoir (circuit vide)                 | (1)         | 45,2       |
| Masse en fin d'absorption dans le réservoir (circuit plein) (2) | (2)         | 35         |
| Masse dans le circuit en fin d'absorption                       | (3)         | 31,33      |
| Masse piégée dans les billes après absorption                   | (1)-(2)=(4) | 10,2       |
| Masse théorique totale à récupérer                              | (3)+(4)     | 41,53      |

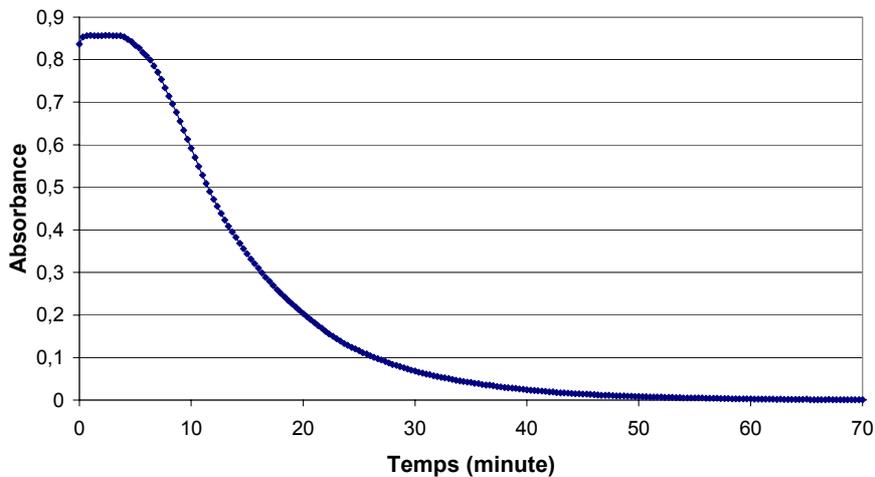
**Tableau 16 : Répartition de la vitamine B 12 au cours d'une manipulation d'absorption rinçage**

Sachant qu'une DO de 1 correspond à une concentration de vitamine B 12 de 0,17 g/l, on peut calculer la concentration de soluté pour chaque valeur de DO (Figure 81). Le volume de rinçage est de 1216,85 ml de sérum physiologique (débit de 16 ml/mn). On peut réaliser un bilan massique : la masse rincée correspond à la surface sous la courbe. On a :

$$\text{Masse rincée} = \sum_{j=i}^f Q * C_j * \Delta t$$

Avec f = t final et i = t initial ; Q et  $\Delta t$  = constantes

Après calcul de l'aire sous la courbe, on retrouve une masse évacuée de 38 mg pour une masse théorique de 41,5 mg.



**Figure 81 : Evolution de l'absorbance de vitamine B 12 lors d'un rinçage du bioréacteur avec du sérum physiologique.**

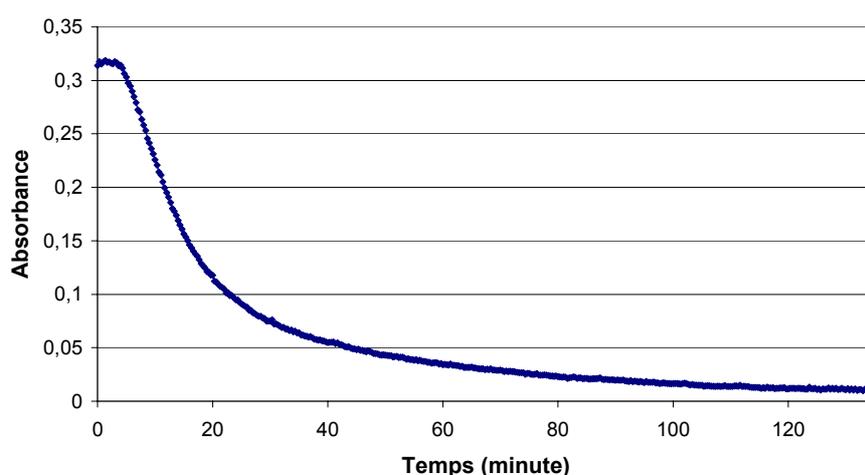
Dans le cas du cytochrome C (Figure 82), le volume de rinçage est de 2220 ml de sérum physiologique (16ml/mn). Ceci indique donc une sortie nettement plus lente du Cytochrome C par rapport à la Vitamine B 12. Ceci est logique étant donné les différences de poids moléculaire des deux éléments.

Au cours du temps le soluté se répartit de la façon suivante (Tableau 17) :

|   |             | Masse (mg) |
|---|-------------|------------|
| Masse initiale dans le réservoir (circuit vide)             | (1)         | 25         |
| Masse en fin d'absorption dans le réservoir (circuit plein) | (2)         | 8,7        |
| Masse dans le circuit en fin d'absorption                   | (3)         | 8,7        |
| Masse piégée dans les billes après absorption               | (1)-(2)=(4) | 16,3       |
| Masse théorique totale à récupérer                          | (3)+(4)     | 25         |

**Tableau 17 : Répartition du Cytochrome C au cours d'une manipulation d'absorption rinçage.**

Une DO de 1 correspond à une concentration de cytochrome C de 0,13 g/l. On effectue le même calcul que pour la vitamine B12. La masse évacuée est de 18 mg pour une masse théorique de 25 mg.



**Figure 82 : Evolution de l'absorbance de cytochrome C lors d'un rinçage du bioréacteur avec du sérum physiologique**

La masse de vitamine B12 récupérée après rinçage est de 3 mg inférieure à la masse théorique (soit un écart de 5 % non significatif). Pour le Cytochrome C, la masse récupérée est de 7 mg inférieure soit un écart de 28 %. Ceci signifie que le Cytochrome C piégé dans les billes d'alginate ne peut en sortir en totalité ou bien que celui ci s'est adsorbé à la surface des billes.

#### 4.2. Calcul du coefficient de transfert de masse global dans le lit fluidisé

On peut envisager de mettre en place un modèle simple de transfert de masse pour caractériser les échanges dans le bioréacteur. Ce type de modèle a déjà été employé dans les cas statiques ou dynamiques (agitation) au sein de notre équipe et par d'autres auteurs (69). Il s'agit d'une approche globale qui considère les deux phases :

**1.FLUIDE**, de concentration homogène  $C_f$ , de volume total  $V_f$  (réservoir+ligne+bioréacteur).

**2.SOLIDE**, on suppose que la concentration est homogène à l'intérieur des billes ( $C_b$ ). Le volume accessible à la diffusion est noté  $V_a$ .  $V_a = \alpha V_b$ ,  $V_b$  étant le volume occupé par les billes.  $\alpha$  a été déterminé précédemment et vaut 0,6.

A l'interface fluide/billes, on suppose que le mécanisme de transfert de matière est purement diffusif et décrit par la loi de Fick. De la même façon que l'on écrit les bilans de masse en hémodialyse, on peut considérer que la masse de soluté dans le fluide  $M_f$  varie selon l'équation (IV.18) :

$$\frac{dM_f}{dt} = \frac{d(V_f C_f)}{dt} = -KA(C_f - C_b) \quad (\text{IV.18})$$

Avec  $K$  le coefficient global de transfert de masse et  $A$  la surface externe des billes.

Ce qui est perdu par le fluide est gagné par les billes, si on néglige les phénomènes d'adsorption. La masse de soluté dans les billes  $M_b$  évolue donc suivant l'équation (IV.19) :

$$\frac{dM_b}{dt} = \frac{dV_a C_b}{dt} = \frac{d(\alpha V_b) C_b}{dt} = KA(C_f - C_b) \quad (\text{IV.19})$$

Les conditions aux limites sont :

$$\text{à } t = 0 : C_f = C_0 \quad C_b = 0$$

$$\text{à } t = \infty \text{ (équilibre)} : C_f = C_b = C_{\text{équilibre}} = C_{eq}$$

Après combinaison des 2 équations différentielles, on trouve que

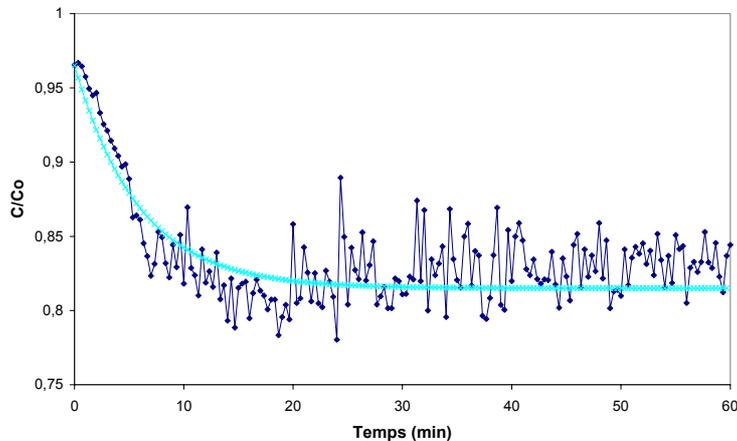
$$C_f(t) = C_{eq} - (C_0 - C_{eq}) \exp\left[\frac{-KA}{\alpha V_b V_f} (\alpha V_b + V_f)t\right] \quad (\text{IV.20})$$

On peut donc déduire K de cette équation, en traçant :

$$\ln\left(\frac{C_f - C_{eq}}{C_0 - C_{eq}}\right) = \frac{KA(\alpha V_b + V_f)}{\alpha V_b V_f} t \quad (\text{IV.21})$$

et en recherchant une interpolation de type linéaire passant par l'origine.

Cette approche peut être appliquée à la vitamine B12 qui ne s'adsorbe pas sur les billes. On prévoit une évolution exponentielle de la concentration dans le surnageant en fonction du temps, qui est confirmée sur la figure 83.



**Figure 83 : Evolution exponentielle de la concentration de vitamine B12 dans le surnageant en fonction du temps ( $\diamond$  : mesure ; \* modèle de l'équation (IV.21))**

Bien que simplifié et reposant sur des hypothèses forte, cette description nous permet donc d'accéder à un coefficient de transfert de masse. Le tableau 18 résume les résultats obtenus dans différentes conditions expérimentales.

| Fluide             |                     | Vitesse d'entrée<br>u (m/s) | Porosité<br>$\varepsilon$ | Coefficient K (m/s) |
|--------------------|---------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------|
| <b>Bécher</b>      |                     |                             |                           |                     |
| statique           | Sérum physiologique | -                           | 0,3                       | $2,7 \cdot 10^{-8}$ |
| <b>Bioréacteur</b> |                     |                             |                           |                     |
| Lit fluidisé       | Sérum physiologique | $9,3 \cdot 10^{-4}$ m/s     | 0,63-0,7                  | $5,1 \cdot 10^{-7}$ |
| Lit fluidisé       | Plasma              | $5,2 \cdot 10^{-4}$ m/s     | 0,79-0,8                  | $2,2 \cdot 10^{-7}$ |

**Tableau 18 : Valeurs du coefficient de transfert de masse K obtenus dans différentes conditions expérimentales**

La valeur du coefficient de transfert de masse K en régime dynamique dans le plasma est inférieure à celle dans du sérum physiologique. Cependant, celle-ci reste 10 fois supérieure à la valeur calculée en statique.

## 5. Conclusions

Ces expérimentations avaient pour but de vérifier la possibilité pour des solutés de poids moléculaire connu de rentrer et sortir des billes d'alginate en fluidisation dans du plasma. Les courbes de concentration  $C/C_0$  en fonction du temps montrent que l'équilibre est plus lent à se produire pour les solutés étudiés dans du plasma que dans du sérum physiologique. Ce résultat est confirmé par le calcul du coefficient de transfert de masse K. Cependant, après 30 minutes de fluidisation, les valeurs  $C/C_0$ , pour chacun des solutés, sont proches de celles enregistrées dans du sérum physiologique. De plus, il est nécessaire de rappeler que les conditions expérimentales avec du plasma ont imposé un débit maximum de 16 ml/min alors que les précédentes expérimentations avec du sérum physiologique avaient été réalisées sous un débit de 30 ml/min. Cette différence, ainsi que la plus grande viscosité du plasma, peut expliquer que l'équilibre est plus lent à s'installer mais que les valeurs  $C/C_0$  soient proches en fin de manipulation.

Nous notons également qu'il est impossible de quantifier les cinétiques de transferts de masse du cytochrome C, car celui-ci s'adsorbe sur les billes.

Enfin, nous avons choisi de ne pas étudier la diffusion de l'albumine dans du plasma, E.Doré ayant conclu à l'impossibilité de mettre en évidence le transfert de ce soluté par la technique employée. Cependant, grâce à un résultat présenté au chapitre V, une estimation du

seuil de coupure de la bille qui, jusqu'à présent, n'avait pu être clairement établi par les expérimentations de transferts de masse, a été estimé, à travers la possibilité de l'albumine de sortir de la bille d'alginate, à environ 65000 Dalton.

## Conclusion Chapitre IV

Le but de cette partie était en quelque sorte d'effectuer, avec un esprit critique, le lien entre les résultats obtenus précédemment au laboratoire dans un modèle expérimental simple *in vitro* par E.Doré (1) et ceux observés pendant une expérimentation animale « lourde » chez notre partenaire de Rennes, équipe INSERM U 456.

On peut conclure que la présence de cellules au sein des billes d'alginate n'influence en rien le comportement du lit fluidisé de billes à l'intérieur du bioréacteur et n'est donc en rien responsable des problèmes rencontrés lors des expérimentations *in vivo* à Rennes. Au contraire, pour un même volume initial de billes d'alginate, la hauteur maximale du lit de billes est sensiblement inférieure en leur présence. En revanche, le fluide de perfusion semble avoir de l'influence comme en témoignent les différences enregistrées avec des milieux de masses volumiques croissantes. L'augmentation de masse volumique du fluide diminue le rapport masse volumique des billes / masse volumique du fluide, ce qui aboutit à la surélévation du lit de billes. Cet effet est ici très remarquable car les billes d'alginate ont une masse volumique très proche de celle du plasma. Pour mieux répondre au cahier des charges *in vivo*, nous proposons un redimensionnement du bioréacteur selon les calculs présenté au paragraphe (6.3.2). Une autre approche serait d'alourdir les billes pour être moins dépendant des caractéristiques de la phase fluide et des conditions de perfusion.

De plus, l'ensemble des résultats présentés dans la partie 2 permet d'apprécier quantitativement les transferts de matière entre le plasma et les billes d'alginate. D'un point de vue global, les transferts de masse sont donc du même type que ceux observés dans du sérum physiologique : si les cinétiques sont plus lentes dans du plasma, les quantités échangées demeurent les mêmes.

Le seuil de coupure des billes d'alginate n'a pas été évalué. Néanmoins, l'utilisation de marqueurs de poids moléculaire (Vitamine B<sub>12</sub>, PM = 1355 Da ; Cytochrome C, PM =

12400 Da) connu permet d'affirmer que les substances de faibles tailles, comme l'ammoniac, devant être pris en charge par les hépatocytes lors d'une insuffisance hépatique aiguë par exemple, pourront rentrer en contact avec les cellules encapsulées. Ceci reste cependant à vérifier par une étude de l'activité métabolique des hépatocytes encapsulés.

**Chapitre V : Etude de la  
morphologie et de l'activité  
métabolique des hépatocytes,  
encapsulés ou sur fond de boîte de  
culture**

---



## Avant Propos

Le foie doit assurer un large éventail de fonctions métaboliques et physiologiques essentielles au maintien de la vie.

Après examen des systèmes de suppléance hépatique et de leur efficacité, présentée dans le chapitre 1 paragraphe, nous pouvons émettre plusieurs critiques profitables pour mettre en place un modèle *in vitro* d'évaluation de l'efficacité intrinsèque du foie bioartificiel à lit fluidisé. La majorité des groupes s'abolissent d'évaluer les performances de leur système de suppléance à travers des expérimentations *in vitro*. Les principaux objectifs sont, apparemment, d'entreprendre des expérimentations sur l'animal ou d'être rapidement autorisés aux essais cliniques.

Devant ce constat et à partir des résultats relativement décevants observés lors de l'application de notre dispositif à un modèle animal porcin, nous avons fait le choix de mettre en place un modèle *in vitro* permettant de valider les fonctionnalités de notre concept original.

Dans l'optique d'offrir un système capable de suppléer le large éventail de fonctions normalement assurées par le foie, comme évoqué au chapitre I, les hépatocytes humains issus de greffons constituent la meilleure source. Cependant, il est difficile d'en obtenir. C'est pourquoi de nombreux groupes de recherche se tournent vers les hépatocytes d'origine animale et en particulier porcine, plus facile d'accès. Cependant, on peut émettre quelques réserves sur l'utilisation de tels hépatocytes. Outre le risque immunologique, on peut légitimement se demander si ce type de cellules animales est réellement en mesure de mimer les fonctions hépatiques humaines en ce qui concerne les protéines plasmatiques par exemple, qui présentent des caractères spécifiques à l'espèce.

En ce sens, le choix d'une lignée cellulaire d'origine humaine, telle que la lignée C3a, se justifie, car elle permet de concevoir un modèle d'évaluation humain du système de suppléance étudié. En culture, sa morphologie est identique aux hépatocytes non issus d'une lignée. Elle est capable de synthétiser le large éventail de protéines normalement fournies par le foie (72) comme par exemple l'albumine qui requiert l'expression de gènes spécifiques

aussi bien dans les mécanismes de transcription que de sécrétion (de la part de la cellule hépatique) (152). Les C3a peuvent assurer les réactions de transamination et désamination aboutissant à la formation de l'urée. Néanmoins, le principal inconvénient de l'utilisation d'une lignée cellulaire est la difficulté de la gestion du stock des boîtes de culture. En effet, dans une application de foie bioartificiel, le nombre théorique nécessaire est très élevé ( $1,5 \cdot 10^{10}$  hépatocytes).

En terme de conception, les systèmes extracorporels sont souvent figés. Hormis ceux de Flendring et Dixit, les systèmes proposés contiennent un nombre d'hépatocytes fixé par la capacité du système qui, dans le cas des fibres creuses, peut être cependant contourné par le branchement de plusieurs bioréacteurs en série, ce qui conduit à une circulation extracorporelle plus complexe et certainement plus coûteuse. En second lieu se pose la question de la protection des cellules présentes dans le système de suppléance, vis à vis du système immunitaire du patient. Dans la plupart des cas, l'administration d'un traitement immunosuppresseur, coûteux, permet de contourner cet inconvénient. L'encapsulation et l'utilisation de fibres creuses avec un seuil inférieur à 150000 Dalton, empêchent le contact direct entre les deux éléments et donc le rejet, tout en autorisant les transferts entre les hépatocytes encapsulés et le milieu environnant pour les solutés de poids moléculaire inférieur à ce seuil. En règle générale, on part du principe que plus le nombre d'hépatocytes est grand, plus le système sera potentiellement performant. C'est oublier que cette haute densité cellulaire pénalise grandement les possibilités d'échange et d'oxygénation, aboutissant à une mortalité élevée, rapide de la population cellulaire. La configuration doit donc être aérée tout en possédant une architecture favorable à la viabilité cellulaire. Avec l'encapsulation, ce problème est a priori résolu.

# **Partie I : Etude de la morphologie des hépatocytes encapsulés par MEB**

---

## **1.Introduction**

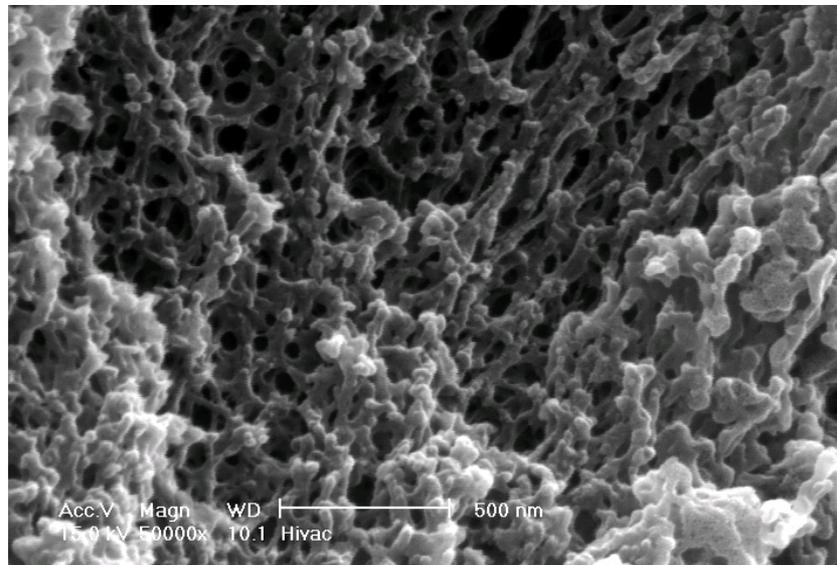
L'étude des billes d'alginate en microscopie électronique n'a pas été simple à réaliser. Dans un premier temps, il avait été prévu d'utiliser la microscopie électronique environnementale (ESEM). Cette technique, ne nécessitant aucune préparation de l'échantillon avant observation, s'est révélée impossible à mettre en œuvre avec des billes d'alginate. Le vide créé dans le dispositif en début de manipulation provoque le passage de l'eau d'une phase liquide à une phase gazeuse, ce qui conduit bien évidemment à la destruction de l'échantillon lorsqu'il est très riche en eau. C'est pourquoi notre choix s'est porté sur la microscopie électronique à balayage (MEB). Cette technique d'observation nécessite de fixer, déshydrater puis sécher au point critique les échantillons. Autant d'étapes qu'il nous a fallu apprendre à maîtriser afin de ne pas trop endommager la structure de nos billes qui sont constituées à 95,5 % d'eau. Ainsi, la déshydratation s'est traduite par une réduction de la taille des billes de 1 mm à 330  $\mu\text{m}$  en moyenne. Les cellules adhérentes sur fond de boîte de culture ont pu être observées en microscopie électronique environnementale.

L'intérêt de cette approche est de connaître les possibilités de réorganisation des cellules unitaires au sein de la bille par une meilleure connaissance de la structure microscopique du gel d'alginate.

## **2.Structure d'une bille d'alginate (concentration du gel 2,2%) en MEB.**

L'observation de la figure 84 montre que, en coupe, les billes d'alginate présentent une structure poreuse et dense avec des pores interconnectés. L'interprétation de cette figure est rendue difficile par le fait que, après déshydratation, étape obligatoire à la mise en œuvre de la microscopie électronique à balayage, l'échantillon a été réduit en taille des 2/3. Ainsi, la taille de ces pores est comprise entre 50 et 80 nanomètres de diamètre. On peut estimer une

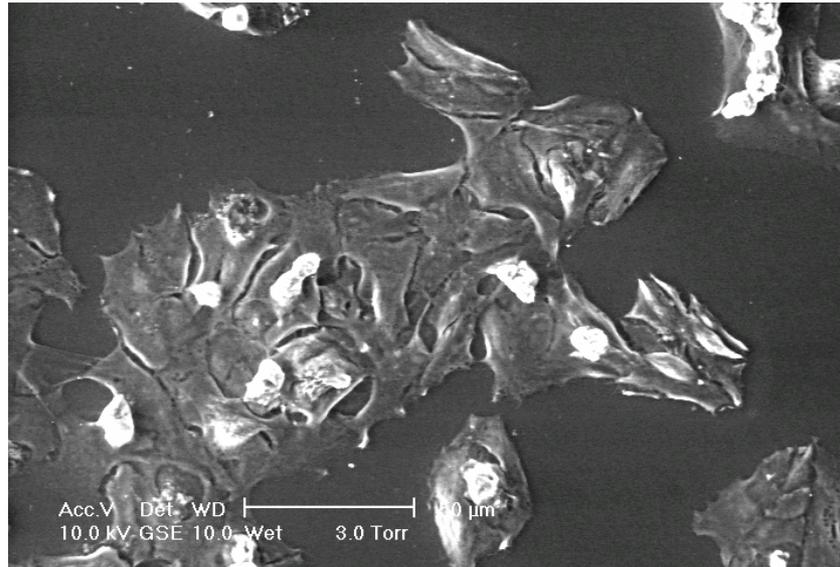
taille moyenne de pores allant de 150 à 240 nm au maximum pour une bille de 1 mm non déshydratée.



**Figure 84 : Structure de l'alginate en coupe transversale (MEB)**

### **3. Etude de la morphologie des hépatocytes C3a sur fond de boîte de culture en ESEM**

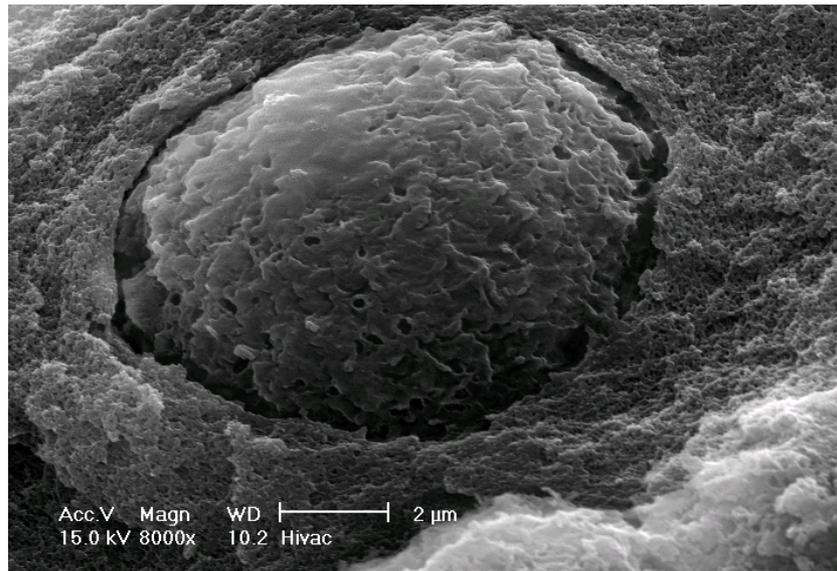
En microscopie électronique environnementale, donc sans préparation particulière pouvant modifier l'état de l'échantillon, la figure 85 montre que sur fond de boîte de culture, les cellules s'étalent. Elles sont donc dans un même plan, et ne forment pas d'amas cellulaire. La taille moyenne d'un hépatocyte dans cette configuration est de 10 à 15  $\mu\text{m}$  environ.



**Figure 85 : Hépatocytes sur fond de boite (ESEM)**

#### **4. Etude de la morphologie des cellules C3a immobilisées dans une bille d'alginate (MEB)**

En microscopie électronique à balayage, en coupe, l'observation de la figure 86 montre que l'hépatocyte adopte une forme grossièrement sphérique au sein de la bille d'alginate. Il ne semble pas que la cellule adhère au matériau. Une nouvelle fois, l'interprétation de cette figure est difficile. En effet, on ne peut affirmer que les deux éléments se déshydratent d'une façon équivalente. Un taux de déshydratation plus grand de la part de la cellule pourrait être à la base de l'observation selon laquelle la cellule ne semble pas être adhérente à l'alginate. Il est donc indispensable de prendre des précautions dans l'interprétation de cette figure 86.



**Figure 86 : Hépatocyte piégé dans l'alginate (MEB)**

## **5. Commentaires et Analyses**

Il est donc nécessaire de prendre du recul par rapport aux images que nous fournit la microscopie électronique à balayage, car la simple observation pourrait nous conduire à des interprétations erronées.

Le succès du développement de substituts biologiques comme les organes bioartificiels, passe par l'utilisation de matériau fournissant aux cellules une structure tridimensionnelle adaptée, censée recréer l'organisation spatiale de l'organe natif et ainsi en favoriser le bon fonctionnement. Pour être appliqué à l'homme, un système de suppléance hépatique doit avoir d'une part une « masse » suffisante de cellules hépatiques afin de fournir des fonctions satisfaisantes et d'autres part une barrière immunoprotective efficace protégeant les cellules du système immunitaire du patient traité.

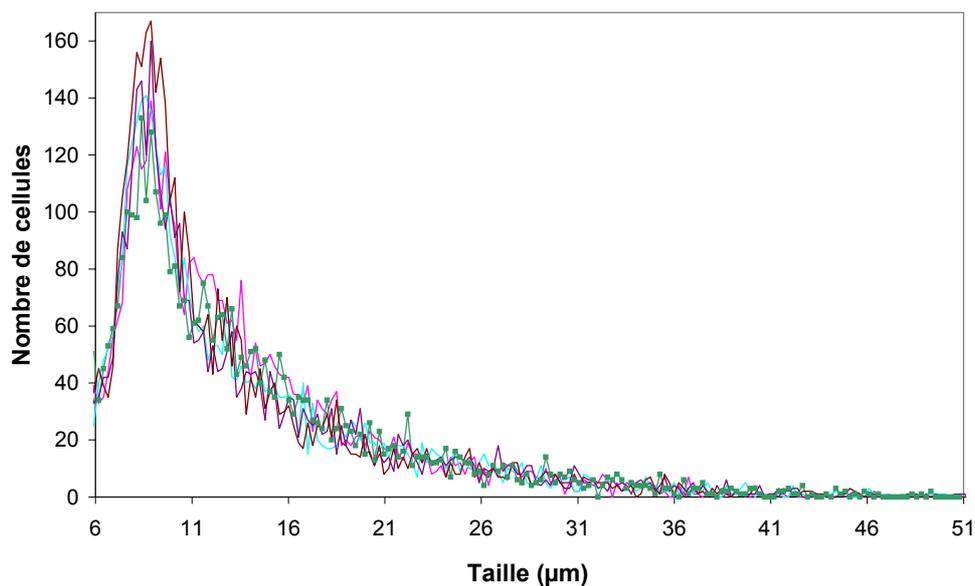
La structure de la bille d'alginate se caractérise par une structure poreuse avec une moyenne de diamètre de pores de 150 à 240 nm au maximum et présente des pores interconnectés. Une telle structure permet de protéger les cellules encapsulées du système immunitaire d'un receveur. Joly et al (148) ont démontré l'efficacité des billes d'alginate pour la protection de cellules encapsulées contre les immunoglobulines du receveur. La porosité du gel d'alginate a été évaluée entre 10 nm et 200 nm. Cette porosité est, théoriquement, jugée

suffisante pour prévenir tout passage de grosses molécules comme les immunoglobulines tout en permettant le transport de l'oxygène et des nutriments (149).

De plus, une bille de 1 mm offre un volume suffisant pour abriter un grand nombre de cellules. En effet, dans notre application, si on estime à 1000 le nombre de cellules immobilisées dans une bille de 1 mm de diamètre, on peut calculer que le volume occupé par les cellules représente 0,4 %. Ceci nous montre que le nombre de cellules peut être augmenté, en cas de besoin.

La matrice formée par l'alginate ne permet pas l'adhésion des hépatocytes. Ceci peut être expliqué par la forte surface hydratée anionique. Une surface principalement composée d'eau présente un nombre négligeable de points d'ancrage pour les protéines. En conséquence, les hépatocytes ne s'attachent pas à l'alginate. Ces observations ont aussi été effectuées par Glicklis et al (164). Certains auteurs ont néanmoins noté que la non adhésion s'accompagnait d'une mort cellulaire et par une perte de fonctionnalité à court terme (150).

Ici, nous avons enregistré une viabilité maintenue sur plusieurs jours (test au bleu trypan), ainsi qu'une absence de prolifération comme le montre la figure 87.



**Figure 87 : Evolution du nombre d'hépatocytes encapsulés dans une bille d'alginate pendant 12 jours (jour 0 ; 3 ; 6 ; 9 ; 12)**

Bien qu'elles ne s'attachent pas, les cellules conservent une haute viabilité (> 85 %) et leurs fonctionnalités comme nous le verrons ultérieurement.

La fonctionnalité des hépatocytes est maximale lorsqu'ils sont regroupés en amas. Dans une boîte de culture (Figure 85), les cellules s'étalent et sont donc dans un même plan. La coopération n'est donc pas, en théorie, la meilleure possible. Comme le montre les clichés obtenus en microscopie électronique à balayage, la taille des pores (estimation de 150 à 240 nm) rend impossible toute migration des cellules (taille moyenne des hépatocytes de 10  $\mu\text{m}$ ) afin de former des amas. On peut imaginer qu'une matrice, moins hydrophile donc plus propice à l'adhésion cellulaire, avec des tailles de pores plus importants permettrait la migration puis l'agrégation des hépatocytes afin de palier à l'impossibilité d'adhésion sur la matrice directement. Ce comportement est observé avec des matrices très hydrophiles (151). Ceci peut constituer une perspective intéressante pour l'évolution de notre système.

## **6. Conclusion**

Le but de notre étude était de définir le métabolisme basal des hépatocytes encapsulés, en cela, le choix d'une dissociation cellulaire poussée jusqu'au stade 3 à 4 cellules se justifie dans un souci d'uniformisation et de reproductibilité des manipulations. Grâce à la microscopie électronique, la structure interne du gel est connue. Nous savons désormais qu'il est impossible pour les hépatocytes de migrer les uns vers les autres et ainsi de former des amas cellulaires favorables à leur fonctionnalité. A l'avenir, il sera préférable d'introduire les hépatocytes directement sous forme d'amas. Ceci passe par l'utilisation d'une technique de culture cellulaire favorisant la formation de tels amas.

## Partie II : Etude de l'activité métabolique des hépatocytes

---

### 1.Introduction

Le pouvoir thérapeutique d'un foie bioartificiel dépend des performances métaboliques des hépatocytes contenus dans le bioréacteur. En évaluer la performance est difficile car il n'existe pas un marqueur unique pouvant témoigner de leur fonctionnalité. Comme nous l'avons vu au chapitre I paragraphe 1, le foie assure des très nombreuses fonctions. Il est donc nécessaire de retenir les plus représentatives de la fonction hépatique. Le projet foie bioartificiel ne portant pas exclusivement sur l'étude du métabolisme des hépatocytes C3a, il a fallu choisir parmi les fonctions les plus étudiées, celles pouvant apporter le plus d'informations non seulement sur le métabolisme des cellules C3a immobilisées dans une bille d'alginate placée dans un lit fluidisé mais aussi en terme de transfert de masse. Nous avons choisi d'étudier la fonctionnalité des hépatocytes en évaluant leur capacité à synthétiser les protéines totales, l'albumine, à produire l'urée et à former et éliminer l'ammoniac.

Le but de ce chapitre est de présenter les résultats du modèle *in vitro* mis en place, permettant d'évaluer les fonctions des hépatocytes C3a dans des conditions opératoires différentes. Il est impossible d'affirmer, a priori, que les hépatocytes C3a conservent leur pleine et entière potentialité d'une part, lorsqu'ils sont immobilisés dans une bille d'alginate et d'autre part, lorsque ces mêmes billes sont soumises à un régime fluidisé au sein du bioréacteur. C'est pourquoi une étude systématique est nécessaire. Nous avons donc mis en œuvre 3 modes de culture différents, le cas 1 évalue les fonctions assurées par les C3a adhérentes sur fond de boîte de culture (durant 12 heures), cette configuration constituant notre valeur de référence. Le cas 2 caractérise la fonctionnalité des cellules C3a encapsulées dans des billes d'alginate placées dans un flacon de culture en conditions statiques (durant 12 heures). Enfin, le cas 3, évalue les fonctions des C3a encapsulées dans des billes d'alginate mais cette fois, placées dans le bioréacteur en condition dynamique (durant 6 heures ; le bioréacteur étant destiné à traiter un patient par session journalière de 6 heures). L'évaluation des fonctions hépatiques spécifiques dans les 3 configurations permettra d'une part d'évaluer

l'influence de l'encapsulation sur la fonctionnalité des hépatocytes C3a encapsulés (cas 2) par rapport au témoin (cas 1) et d'autre part d'étudier l'influence du lit fluidisé (cas 3) en terme de métabolisme et de transfert de masse des marqueurs choisis.

## **2.Evaluation du foie bioartificiel en conditions expérimentales *in vitro***

Le but de notre étude est de mettre au point un modèle *in vitro* afin d'évaluer les performances d'un nouveau type de bioréacteur servant de foie bioartificiel. Les figures suivantes représentent la masse cumulée néo-synthétisée et retrouvée dans le surnageant des marqueurs considérés rapportés à la concentration initiale en fonction du temps, après les bilans de masse décrits au chapitre II paragraphe 7.2. Les cas 2 et 3 nous offrent deux enseignements. En effet, les résultats correspondent non seulement à la capacité d'un marqueur à être produit par les hépatocytes C3a encapsulés mais aussi à la capacité de ce marqueur de diffuser de l'intérieur de la bille vers le fluide environnant. Toutes les manipulations ont été effectuées dans du MEM SVF 10%. Pour le bioréacteur (cas 3), le suivi du métabolisme n'est effectué que sur 6 heures, ce qui correspond à la durée journalière du traitement par le foie bioartificiel à lit fluidisé. Pour le témoin fond de boîte (cas 1) et les billes en statique (cas 2), le suivi du métabolisme est effectué sur 12 heures. Chaque manipulation est menée avec un lot de billes neuves. Pour chaque dosage, un test statistique de Student a été réalisé entre les différents cas (degrés de significativité :  $0,05 < p < 0,02$  (\*);  $0,02 < p < 0,01$  (\*\*);  $p < 0,001$  (\*\*\*) ; différence non significative (Ns)). Le nombre d'essais effectués dans chaque cas est précisé sur les légendes des figures.

En annexe (1 à 5) sont présentés des résultats relatifs à une série de manipulations conduite avec un intervalle de temps de 2 heures entre chaque point de mesure. Les écarts-types de ces résultats ont été jugés trop important, ce qui nous a contraints à poursuivre l'étude par une seconde série de manipulations avec comme pas de temps 6 heures. En 2 heures, les cellules ne synthétisent qu'une faible quantité de marqueur, difficilement détectable, car se situant au seuil de sensibilité des techniques de dosage employées. Travailler sur un intervalle de 6 heures permet d'une part, de réduire les écarts types, et d'autres part, d'effectuer une étude statistique plus cohérente sur les résultats obtenus. Néanmoins, cette première série semble montrer que la formation ainsi que la diffusion des marqueurs, se fait dans le surnageant de façon continue au cours du temps.

## 2.1.Sécrétion de protéines par les hépatocytes C3a

Les protéines sécrétées par les C3a adhérentes sur fond de boîte de culture (cas 1), encapsulées dans des billes d'alginate placées dans un flacon de culture en conditions statiques (cas 2) et encapsulées puis placées dans le bioréacteur en condition dynamique (cas 3) ont été dosées dans le milieu de culture à la 0, 6 et 12 heures pour les deux premiers cas et 0 et 6 heures pour le bioréacteur. Les densités cellulaires ont été évaluées par un comptage des cellules sur fond de boîte au terme des 12 heures et après dissolution du gel d'alginate pour les billes soit au bout de 6 ou 12 heures suivant le cas. La viabilité a été estimée par un test au bleu trypan. Les résultats sont présentés sur la figure 88 en masse cumulée néo-synthétisée rapportée au temps 0 par million de cellules. La valeur de référence est celle obtenue en fond de boîte de culture.

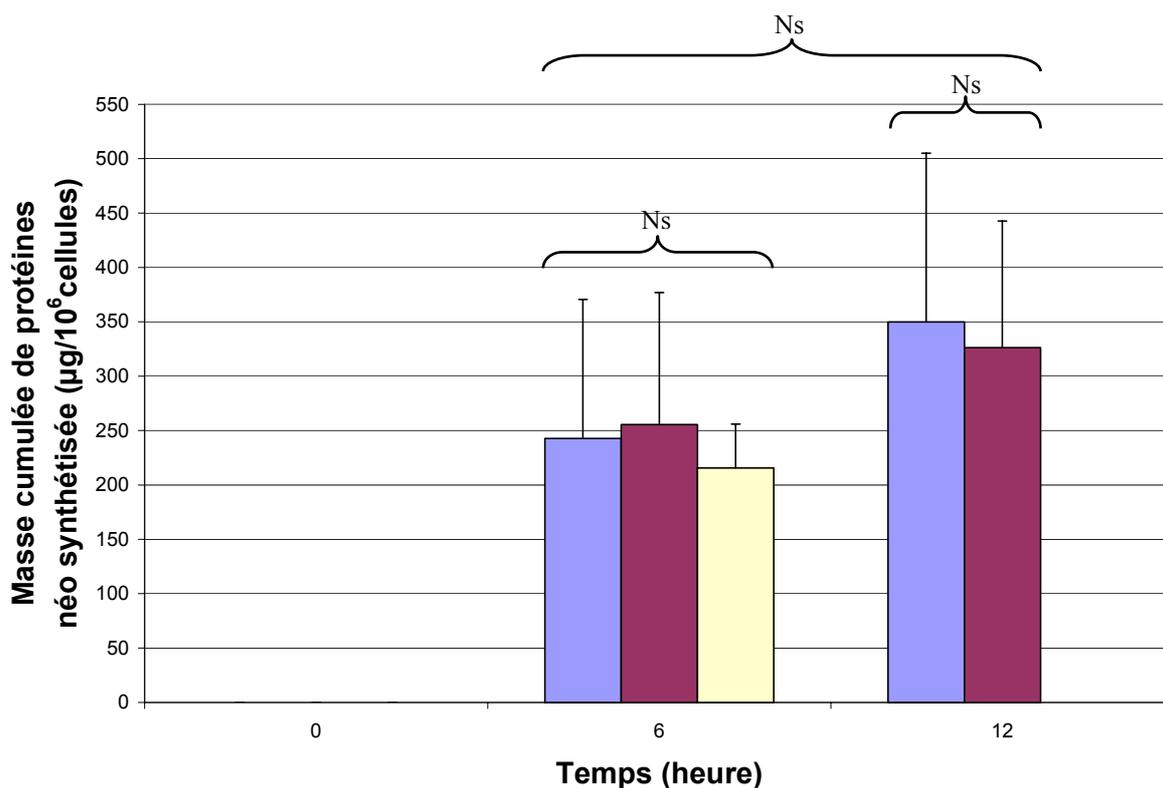
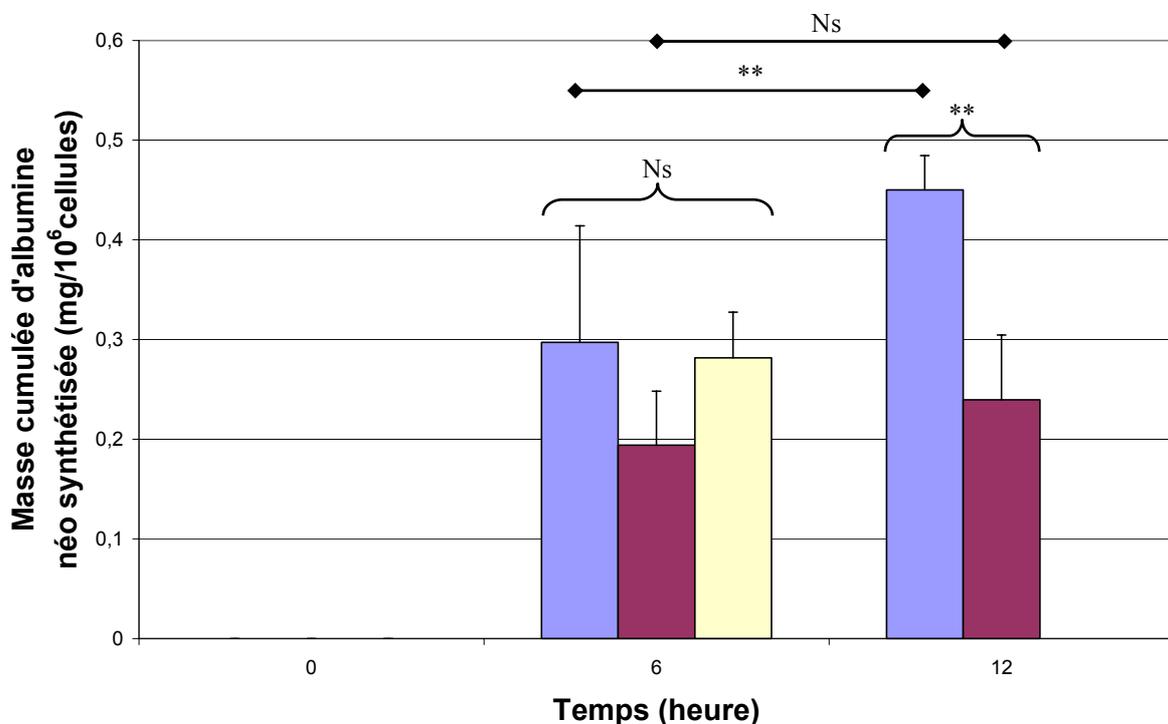


Figure 88 : Synthèse de protéines par les C3a  
(■ Boite (n=7); ■ Bille (n=7); ■ Bioréacteur(n=5))

Pour les cellules C3a adhérentes sur fond de boîte de culture (cas 1), on constate que la synthèse de protéines semble continue au cours du temps. Cependant, la différence entre les valeurs à 12 heures ( $349\pm 154$ )  $\mu\text{g}$  / million de cellules et à 6 heures ( $242\pm 127$ )  $\mu\text{g}$  / million de cellules n'est pas significative. La capacité de synthèse de protéines est préservée pour les billes hébergeant des cellules en conditions statiques (cas 2). A 6 heures, la valeur est voisine de celle observée sur fond de boîte ( $255\pm 121$ )  $\mu\text{g}$  / million de cellules tout comme celle à 12 heures ( $326\pm 116$ )  $\mu\text{g}$  / million de cellules. Le dernier cas, billes hébergeant des hépatocytes placés dans le bioréacteur en régime dynamique, montre une valeur à 6 heures de ( $215\pm 40$ )  $\mu\text{g}$  / million de cellules, assez semblable aux autres cas. La viabilité cellulaire est comprise entre 95 et 97 %.

## 2.2.Sécrétion d'albumine par les hépatocytes C3a

La sécrétion d'albumine par les C3a adhérentes pour les cas 1,2 et 3 a été mesurée dans le milieu de culture à 0, 6 et 12 heures pour les deux premiers cas et 0 et 6 heures pour le cas 3 par un test ELISA. Les résultats sont présentés sur la figure 89 comme précédemment en masse cumulée néo-synthétisée rapportée au temps 0 par million de cellules.

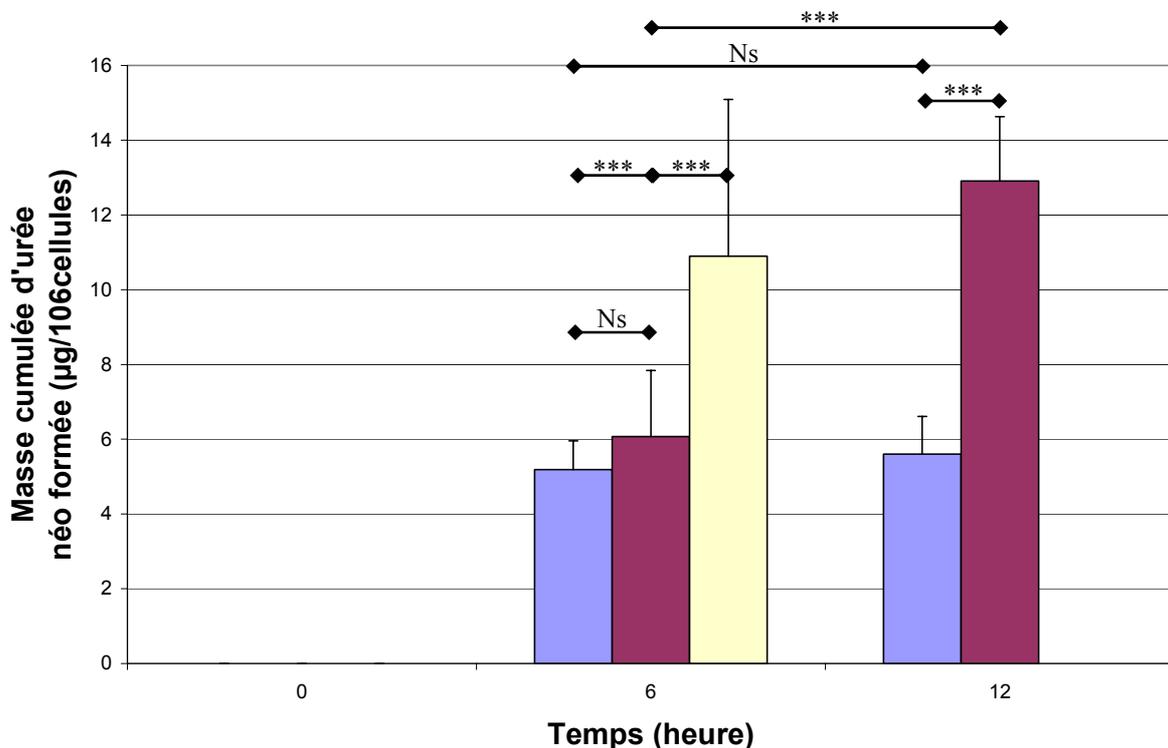


**Figure 89 : Synthèse d'albumine par les C3a**  
 (■ Boite (n=6); ■ Bille (n=6); ■ Bioréacteur (n=5))

Pour les cellules C3a adhérentes sur fond de boîte de culture (cas 1), on observe une augmentation de la masse d'albumine dans le surnageant au cours du temps. La valeur à 12 heures ( $0,45 \pm 0,034$ ) mg / million de cellules est supérieure à celle observée pour 6 heures ( $0,297 \pm 0,1$ ) mg / million de cellules. Pour les billes hébergeant des cellules en conditions statiques (cas 2), à 6 heures, la valeur est de ( $0,194 \pm 0,054$ ) mg / million de cellules et de ( $0,239 \pm 0,065$ ) mg / million de cellules à 12 heures. Le cas 3 montre une valeur à 6 heures de ( $0,282 \pm 0,046$ ) mg / million de cellules. Pour l'ensemble des manipulations réalisées, la viabilité cellulaire est supérieure à 95 %.

### 2.3.Sécrétion d'urée par les hépatocytes C3a

Les résultats (en masse cumulée néo-synthétisée rapportés au temps 0 par million de cellules viables) observés pour les cas 1,2 et 3 sont présentés dans la figure 90. La valeur de référence nous est toujours fournie par les cellules sur fond de boîte.



**Figure 90 : Formation d'urée par les C3a**  
 (■ Boite (n=8); ■ Bille (n=9); ■ Bioréacteur (n=5))

Pour le cas 1, on constate une très légère augmentation de la masse d'urée dans le surnageant au cours du temps. La valeur à 12 heures ( $5,6 \pm 1$ )  $\mu\text{g}$  / million de cellules est légèrement supérieure à celle observée pour 6 heures ( $5,1 \pm 0,7$ )  $\mu\text{g}$  / million de cellules. La synthèse d'urée par les hépatocytes semble continue pour le cas 2. Si à 6 heures, la valeur est voisine de celle observée sur fond de boîte ( $6 \pm 1,7$ )  $\mu\text{g}$  / million de cellules, en revanche la masse d'urée synthétisée à 12 heures ( $12,9 \pm 1,7$ )  $\mu\text{g}$  / million de cellules est augmentée de 100 %. La valeur enregistrée pour le cas 3 ( $13,9 \pm 4$ )  $\mu\text{g}$  / million de cellules, en 6 heures est voisine de celle enregistrée à 12 heures pour le cas 2 (viabilité cellulaire : 95 %).

#### 2.4.Sécrétion d'ammoniac par les hépatocytes C3a

La production d'ammoniac dans les cas 1 et 2 a été évaluée dans le milieu de culture pendant 12 heures à raison d'un dosage toutes les deux heures et pendant 6 heures pour le cas 3 avec le même intervalle de temps entre deux mesures (Figure 91). Les densités cellulaires ainsi que la viabilité (supérieure à 95 %) ont été mesurées comme précédemment.

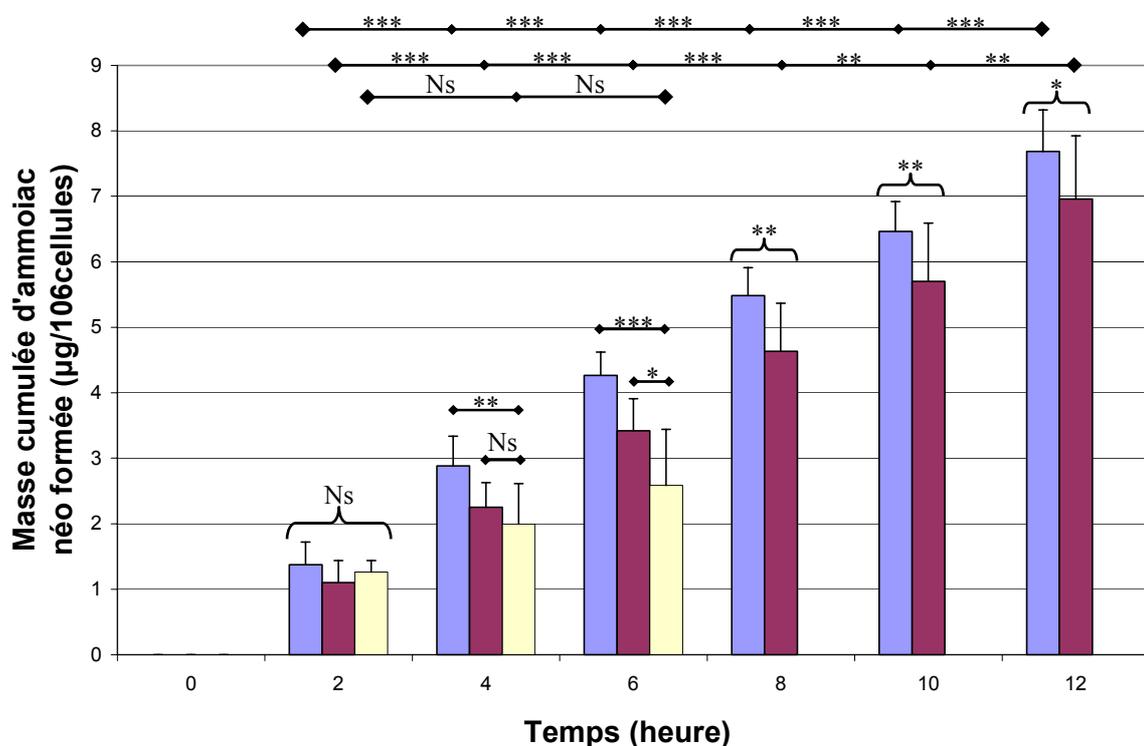


Figure 91 : Formation d'ammoniac par les C3a  
 (■ Boîte (n=10); ■ Bille (n=10); ■ Bioréacteur(n=5))

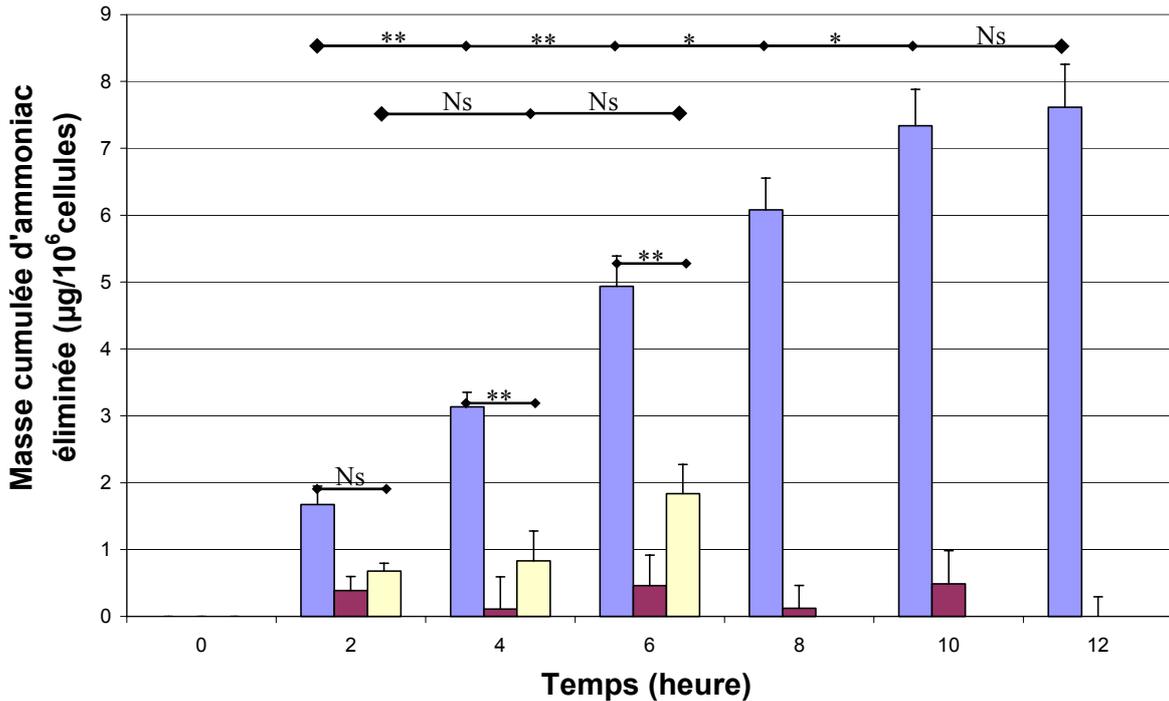
La bonne sensibilité du test de dosage a permis de réduire l'intervalle de temps entre deux mesures et ainsi d'évaluer au mieux la cinétique de sécrétion d'ammoniac par les hépatocytes C3a. Dans les 3 cas, on observe un relargage progressif d'ammoniac dans le milieu de culture. Les valeurs mesurées pour les cellules sur fond de boîte (cas 1) sont supérieures à celles observées pour les billes en conditions statiques (cas 2), elles-même supérieures aux valeurs mesurées pour les billes dans le bioréacteur (cas 3).

## **2.5.Élimination d'ammoniac par les hépatocytes C3a**

L'intérêt de ce test est de vérifier la capacité des hépatocytes C3a à prendre en charge l'élimination d'une surcharge d'ammoniac (1 mmol/l) introduit dans le surnageant.

L'élimination d'ammoniac dans les cas 1 et 2 a été suivie dans le milieu de culture pendant 12 heures à raison d'un dosage toutes les deux heures et pendant 6 heures pour le cas 3 avec le même intervalle de temps entre deux mesures (Figure 92). Les densités cellulaires ainsi que la viabilité (95 et 97 %) ont été évaluées comme précédemment.

Comme nous l'avons déjà dit, la bonne sensibilité du test de dosage permet d'avoir un intervalle de temps aussi réduit que possible entre deux mesures. Ceci est d'autant plus intéressant dans le cas de la mesure de l'élimination d'ammoniac par les hépatocytes. Cela permet de vérifier si cette élimination est continue au cours du temps.



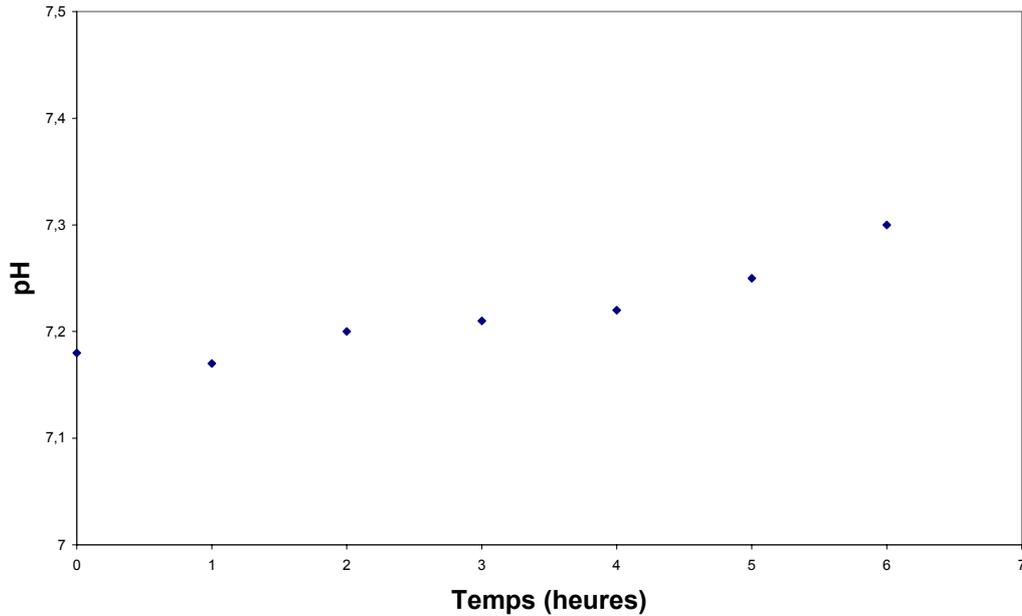
**Figure 92 : Comparaison de l'élimination d'ammoniac par les C3a ( suite à une surcharge dans le milieu de culture)**  
 (■ Boite (n=4); ■ Bille (n=4); ■ Bioréacteur(n=4))

Les 3 cas étudiés ne montrent pas le même profil d'évolution. Les valeurs enregistrées indiquent que seules les cellules sur fond de boîte (cas 1) et les cellules immobilisées dans des billes d'alginate en mouvement dans le bioréacteur sont capables de prendre en charge l'élimination de l'ammoniac. Il faut souligner que, bien que le profil des cinétiques soit comparable, la capacité d'élimination ne l'est pas. En effet, à 2 heures, la valeur du cas 1 ( $1,67 \pm 0,27$ ) µg / million de cellules est environ 2,5 fois supérieure à celle du cas 3 ( $0,68 \pm 0,1$ ) µg / million de cellules. Cet écart reste constant au cours du temps.

Il semble que les cellules encapsulées en condition statique ne peuvent éliminer l'ammoniac comme en témoignent les résultats enregistrés. Au cours des 12 heures de l'expérimentation, les valeurs enregistrées restent faibles et relativement constante (de  $0,10 \pm 0,48$  à  $0,48 \pm 0,49$ ) µg / million de cellules et sont couvertes par leur écart type.

## 2.6. Evolution du pH au sein du bioréacteur

Le pH artériel est normalement maintenu entre 7,36 et 7,42. Des pH artériels de moins de 6,8 et de plus de 7,8 sont mortels (201).



**Figure 93 : Evolution du pH au sein du bioréacteur pendant une fluidisation de 6 heures avec des billes hébergeant des cellules dans du milieu de culture**

Au cours du temps, on observe une faible et lente augmentation non significative du pH vers 7,4 (Figure 93). Cette évolution est satisfaisante car les valeurs de pH restent physiologiques et donc, ne sont pas un obstacle à une viabilité et à une fonctionnalité cellulaire normales. Cependant, pour être en concordance avec la norme physiologique dès le départ du traitement, on pourra ajuster le pH au sein du bioréacteur par ajout d'ions  $\text{OH}^-$  sous forme de bicarbonate.

### 3. Commentaires et Analyses

Le but de notre étude est d'évaluer les performances d'un nouveau type de bioréacteur servant de foie bioartificiel à l'aide d'un modèle *in vitro* propre à notre laboratoire et représentatif de la réalité clinique.

Dans un premier temps, la synthèse de protéines a été mesurée. L'évaluation globale de la quantité de protéines retrouvées dans le surnageant montre des cinétiques comparables pour les 3 cas étudiés. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'albumine. La sécrétion spécifique d'albumine augmente avec le temps pour les 3 cas étudiés. Cependant, la comparaison des valeurs observées à 12 heures pour les cas 1 (témoin) et 2 (cellules encapsulées) montre l'influence relativement négative de l'encapsulation sur la présence d'albumine dans le surnageant. Les résultats obtenus amènent à envisager deux hypothèses

pour expliquer ce résultat. La première est que l'albumine synthétisée par les hépatocytes encapsulés a du mal à sortir de la bille, le seuil de coupure de la bille d'alginate devant être très voisin du poids moléculaire de l'albumine. En d'autres termes, la sortie de l'albumine de la bille par simple diffusion serait un phénomène limité et très lent. Pour considérer le rôle du bioréacteur, on note que la quantité sécrétée dans celui-ci après 6 heures est supérieure à celle obtenue en statique (cas 2) après 12 heures. De plus, la valeur enregistrée est égale à celle du témoin à 6 heures. Cependant, il est important de rappeler que, même dans le cadre d'un lit fluidisé, les échanges à l'intérieur des billes se font par diffusion. Dans le bioréacteur, les billes sont soumises à un régime fluidisé qui améliore uniquement le gradient de concentration local à l'interface des billes avec le surnageant. Donc l'amélioration des transferts de masse à l'extérieur de la bille aurait un effet indirect sur ceux de l'intérieur. La seconde hypothèse consiste à dire que les différences observées entre les cas 1 et 2 seraient causées par une éventuelle accumulation d'albumine dans les billes, ce qui provoquerait un certain retard de sa libération. Afin de vérifier l'une ou l'autre des hypothèses, il serait nécessaire de pouvoir mesurer la quantité d'albumine piégée dans une seule bille d'alginate au cours du temps. Bien que séduisante, cette idée semble difficilement réalisable car la sensibilité du test l'ELISA, bien que très satisfaisante pour 99% des applications, ne permet pas de détecter de si faibles concentrations. Une alternative serait d'utiliser une technique de biologie moléculaire, la réaction en chaîne de la polymérase ou PCR, lourde à mettre en pratique mais extrêmement sensible.

En ce qui concerne l'urée, soluté de faible poids moléculaire et très diffusible, la fluidisation semble également améliorer les transferts de masse entre les cellules encapsulées et le milieu de culture. La cinétique de sécrétion du témoin (cas 1) montre une synthèse d'urée continue avec une très faible augmentation de la 6<sup>ème</sup> à la 12<sup>ème</sup> heure. Le cas 2 (cellules encapsulées) est très différent : on enregistre une augmentation significative de la quantité d'urée présente dans le surnageant au cours des 12 heures (100%). Cette première constatation montre l'intérêt de la bioencapsulation dans le but de recréer un environnement favorable pour les hépatocytes et ainsi d'en augmenter les fonctionnalités. L'analyse du cas 3 (bioréacteur) montre qu'en 6 heures, les hépatocytes encapsulés sont capable de produire et de libérer une quantité d'urée équivalente au cas 2 pour 12 heures. Ceci témoigne de l'intérêt de la mise en mouvement des billes hébergeant des cellules dans un lit fluidisé. Ce procédé permet d'associer à la fois l'intérêt de la bioencapsulation en terme d'amélioration du

métabolisme, et du lit fluidisé en terme d'accélération des transferts de masses du compartiment interne de la bille vers le fluide environnant en atténuant la barrière que constitue la bille d'alginate en terme de diffusion.

Concernant l'ammoniac, l'étude a été menée en deux parties. La première concerne la formation basale d'ammoniac par les hépatocytes C3a par désamination des acides aminés, et la seconde s'intéresse à la capacité des hépatocytes C3a à éliminer l'ammoniac d'origine exogène.

Les profils de sécrétion pour les cas 1,2 et 3 sont comparables. La quantité d'ammoniac augmente avec le temps dans le surnageant. Les taux moyens dans le surnageant sont voisins et les différences enregistrées ne sont pas significatives au regard des écarts types. On ne peut donc pas conclure sur un éventuel effet du lit fluidisé sur le métabolisme dans ce cas. La seule information apportée par ce suivi est que l'ammoniac peut sortir des billes d'alginate.

Les profils d'élimination sont plus instructifs mais plus délicats à interpréter. En effet, il est difficile de savoir si l'apport exogène d'ammoniac bloque ou non la formation de l'ammoniac endogène. Ainsi, pour rendre l'interprétation possible, on pose comme hypothèse que l'apport d'ammoniac provoque l'arrêt de sa synthèse. Le signal enregistré ne correspondant alors qu'à son élimination.

Ainsi, le cas 1 (témoin) témoigne de la capacité de prise en charge de l'ammoniac par les C3a : lors d'un contact direct avec les hépatocytes, la disparition d'ammoniac dans le surnageant est régulière. La comparaison des taux moyens de synthèse et d'élimination montre que les hépatocytes peuvent éliminer une quantité d'ammoniac supérieure à celle qu'ils synthétisent. L'étude des deux autres cas est plus préoccupante. En effet, il apparaît que les hépatocytes immobilisés dans des billes en condition statique (cas 2) ne prennent pas en charge l'élimination de l'ammoniac. Les valeurs mesurées sont couvertes par leur écart type. Une nouvelle fois, la fluidisation semble avoir un effet bénéfique sur ce métabolisme. Dans le bioréacteur (cas 3), l'élimination de l'ammoniac est à nouveau observée, cependant avec un taux moins élevé que celui du témoin (60 % environ).

Néanmoins, on peut se poser la question de savoir si la décroissance observée est réellement due à la prise en charge de l'ammoniac par les hépatocytes encapsulés. Pour le cas 1, la réponse est indéniablement oui, puisque le surnageant et les cellules sont directement en contact. Pour les cas 2 et 3, la réponse est moins évidente. En effet, avant les manipulations dites de détoxification, les billes hébergeant des hépatocytes sont stockées dans du milieu de

culture frais. Ces billes renferment une quantité non négligeable de liquide (67). On peut donc envisager que la décroissance observée ne serait que le reflet de l'égalisation, par diffusion, des concentrations entre le surnageant et le liquide à l'intérieur des billes. Ceci pourrait expliquer le résultat observé pour le cas 2, car on sait qu'en conditions statiques les échanges par diffusion entre le surnageant et l'intérieur de la bille sont très lents. Apparemment, l'ammoniac (pourtant de faible poids moléculaire) aurait du mal à pénétrer à l'intérieur des billes. Cela pourrait provenir du fait que les cellules produisent initialement de l'ammoniac, car elles n'ont pas été en présence de l'ammoniac exogène. Le gradient de concentration entre l'intérieur et l'extérieur pourrait être très faible, voire nul. Pour étayer cette hypothèse, il serait intéressant de travailler avec de l'ammoniac exogène marqué, ce qui permettrait de distinguer, l'ammoniac d'origine exogène de l'ammoniac d'origine endogène. L'effet convectif provoqué par le lit fluidisé, cas 3, permettrait une égalisation des concentrations plus rapide et donc une certaine prise en charge de l'ammoniac par les hépatocytes.

La comparaison de résultats obtenus avec ceux rapportés dans la littérature est un exercice difficile.

Dans le cas d'un projet de foie bioartificiel, donc de suppléance de fonctions métaboliques normalement assurées par l'organe sain, deux modes de comparaison s'offrent à nous :

Un premier, le plus répandu, consiste à interpréter les performances du système étudié par rapport à celles d'un autre système reposant sur une autre technologie. Cependant, cette démarche ne permet pas d'extraire un critère objectif permettant de dire si l'un ou l'autre est plus performant. De plus, il s'ajoute une difficulté d'interprétation due à l'utilisation de cellules hépatiques de différentes provenances (souris, rat, lapin, cochon, homme).

Un second mode de comparaison consiste à interpréter les résultats en fonction des performances biologiques requises pour la suppléance d'une fonction métabolique. En d'autres termes, le système est-il capable d'assurer la synthèse d'un élément dans la même quantité que le ferait un organe en bonne santé? Ce mode de comparaison nous paraît plus justifié car il est basé sur les besoins physiologiques journaliers d'un être humain. Par exemple, il est intéressant de savoir si la quantité d'albumine synthétisée puis libérée dans un système de foie bioartificiel permettrait d'assurer avec succès la suppléance de la fonction considérée.

D'après Tavill et McCullough (154), un homme en bonne santé de 70 kilo-grammes produit 12 grammes d'albumine par 24 heures. En effet, les protéines d'un animal adulte ne sont pas stables pendant toute sa vie, mais au contraire, sont perpétuellement en train de se renouveler. Kamlot et collaborateurs (24) estiment à  $1,5 \cdot 10^{10}$ , le nombre d'hépatocytes nécessaire à la suppléance des fonctions hépatiques. Si on rapporte la masse d'albumine produite par 24 heures à ce nombre de cellules, ceci conduit à un taux moyen de 0,8 mg d'albumine par million de cellules (soit 0,4 mg en 12 heures et 0,2 mg en 6 heures). Cette estimation est en accord avec nos résultats dans l'ensemble des cas étudiés. En effet, la quantité d'albumine sécrétée pour le cas 1 (témoin) en 12 heures est de 0,45 mg/million cellules. Enfin, la masse d'albumine néo-synthétisée, mesurée à l'issue d'une fluidisation de 6 heures est de nouveau proche de la valeur théorique, 0,28 mg/million cellules. Il apparaît donc que notre système fournit des performances en adéquation avec les besoins physiologiques de l'être humain, pour la sécrétion d'albumine. De même, en ce qui concerne la synthèse de protéines chez un être humain, Thomas A. Depner (155) rapporte une masse synthétisée par le foie d'environ 20 grammes par 24 heures soit un taux moyen de 1300  $\mu\text{g}$  de protéines / million cellules / jour (soit 650  $\mu\text{g}$  pour 12 heures et 325  $\mu\text{g}$  en 6 heures). Dans notre travail, l'évaluation globale de la quantité de protéines montre, pour les 3 cas étudiés, des évolutions de sécrétion comparables et en accord avec les valeurs théoriques.

Ce mode de comparaison n'a pu être appliqué pour l'urée et l'ammoniac faute de données bibliographiques fiables et cohérentes entre elles.

Il apparaît, à travers ce premier mode de comparaison, que notre système offre des performances en concordance avec les nécessités biologiques d'une suppléance hépatique en ce qui concerne la synthèse d'albumine et le taux global de protéines. A travers ces résultats correspondant aux besoins biologiques d'un être humain, l'emploi de ce dispositif en vue d'une suppléance hépatique pourrait être envisagé, ce qui est très encourageant. Néanmoins, cette première approche n'a pas pu évaluer ses performances pour l'urée et l'ammoniac ce qui rend la confrontation de nos résultats avec ceux de la littérature indispensable.

Le tableau 19 présente une vue d'ensemble des résultats publiés par différents groupes de recherches concernant la synthèse de protéines totales, d'albumine et d'urée. Pour l'ammoniac, les données recueillies concernent son élimination. Le tableau 20, quant à lui, résume les résultats de la présente étude.

La comparaison des résultats est rendue difficile à cause de l'absence de normalisation des résultats entre les groupes. De nombreux auteurs rapportent seulement des concentrations mesurées dans le surnageant. De plus, la plupart des bioréacteurs sont chargés d'un nombre initial connu de cellules. Au cours du temps, si le support employé le permet, ces cellules vont se multiplier, rendant l'évaluation en nombre difficile. Cependant, l'examen le plus complet possible de la bibliographie permet d'en tirer des informations intéressantes.

Dans le tableau 19, les (\*) désignent les résultats rapportés ou recalculés par nos soins en terme de taux moyen de sécrétion.

| Auteurs           | Origine des hépatocytes | Support   | Protéine  | Albumine                                       | Urée   | Ammoniac (Elimination)                   |
|-------------------|-------------------------|---|---|--|--|--|
| Vilei, M.T (156)  | Humain (donneur)        | Biomatrix   |   |  | 9±3 *<br>µg/h/<br>10 <sup>6</sup> cellules       |  |
| Yoon, J.H (157)   | Humain (foetal)         | Primaria multiplates                                    |   | 0,125<br>µg/ml/<br>10 <sup>6</sup> cellules /h |  |  |
| Takagi, M (153)   | Humain (hep G2)         | Boite de culture  |   |  | 1 *<br>µg/h/<br>10 <sup>6</sup> cellules         | 0,675 *<br>µg/h/10 <sup>6</sup> cellules |
| Khalil, M (158)   | Humain (hep G2)         | Billes d'alginate                                       |   | 0,21 à 0,42<br>µg/10 <sup>6</sup> cellules /h  |  |  |
| Elcin, Y.M (141)  | Porc                    | Polystyrène recouvert de Chitosan-albumine et collagène | 12,5 à 16<br>µg/h/<br>10 <sup>6</sup> cellules* |  | 12 à 14 *<br>µg/h/<br>10 <sup>6</sup> cellules   |  |
| Morsiani, E (159) | Porc                    | Radial flow bioréacteur                                 |   | 0,16<br>ng/10 <sup>6</sup> cellules /h         |  | 33 µmol/l /h                             |
| Fukuda, J (160)   | Porc                    | bille   |   | 4,6 à 6,6 *<br>µg/10 <sup>6</sup> cellules /h  |  |  |
| Lorenti, A (142)  | Porc                    | Surface en plastique                                    | 2,5<br>mg/h/dl                                  |  |  |  |
| Vilei, M.T (156)  | Porc                    | Biomatrix   |   |  | 8,6±2 *<br>µg/h/<br>10 <sup>6</sup> cellules     |  |
| Bader, A (161)    | Porc                    | Membranes planes  |   | 0,05<br>µg/10 <sup>6</sup> cellules /h         |  |  |
| Hwang, Y.J (162)  | Porc                    | Billes d'alginate                                       |   |  |  | 0,375 *<br>µg/h/10 <sup>6</sup> cellules |
| Funatsu, K (163)  | Rat                     | Capillaires   |   |  |  | 2,2 *<br>µg/h/10 <sup>6</sup> cellules   |
| Glicklis, R (164) | Rat                     | Matrice poreuse 3 D                                     |   | 0,2 à 0,4<br>µg/10 <sup>6</sup> cellules /h    | 3,2 à 3,5 *<br>µg/h/<br>10 <sup>6</sup> cellules |  |
| Catapano, G (144) | Rat                     | Surface recouverte de collagène                         |   |  | 0,2 à 1<br>mM/h                                  |  |
| Nyberg, S.L (49)  | Rat                     | Fibres creuses  |   | 20 à 41<br>µg/ h                               | 8 à 12<br>µmol/h                                 |  |
| Vilei, M.T (156)  | Rat                     | Biomatrix   |   |  | 5±2 *<br>µg/h/<br>10 <sup>6</sup> cellules       |  |
| Canaple, L (165)  | Souris                  | Capsules d'alginate                                     | 2 à 3,3<br>µg/ml/h/<br>10 <sup>6</sup> cellules |  | 0,5 *<br>µg/h/<br>10 <sup>6</sup> cellules       |  |

Les \* signalent les valeurs pouvant être comparées à celles obtenues dans la présente étude

**Tableau 19 : Résumé des principales données bibliographiques**

Le tableau 16 résume les résultats obtenus dans le chapitre V Partie II par heure.

|   | Cas 1              | Cas 2              | Cas 3             |
|---|--------------------|--------------------|-------------------|
| Taux moyen de sécrétion<br>(en $\mu\text{g} / \text{h} / \text{million de cellules}$ )  |                    |                    |                   |
| Protéines   | 40<br>$\pm 21$     | 42<br>$\pm 20$     | 36<br>$\pm 7$     |
| Albumine  | 49,5<br>$\pm 15$   | 32,3<br>$\pm 9$    | 47<br>$\pm 7$     |
| Urée  | 0,85<br>$\pm 0,1$  | 1<br>$\pm 0,3$     | 2,3<br>$\pm 0,6$  |
| Ammoniac  | 0,64<br>$\pm 0,05$ | 0,58<br>$\pm 0,08$ | 0,43<br>$\pm 0,1$ |
| Taux moyen d'élimination<br>(en $\mu\text{g} / \text{h} / \text{million de cellules}$ ) |                    |                    |                   |
| Ammoniac  | 0,8<br>$\pm 0,08$  | ----               | 0,3<br>$\pm 0,07$ |

**Tableau 20 : Comparaison des taux moyens de sécrétion de protéines, d'albumine, d'urée et d'ammoniac et d'élimination d'ammoniac des cas 1,2 et 3 (en  $\mu\text{g} / \text{heure} / \text{million de cellules}$ )**

Ainsi, en terme de synthèse protéique et en particulier d'albumine, Elcin, Y.M (141) et Fukuda, Y (160) rapportent des valeurs (Tableau 15) en accord avec les nôtres. Il faut souligner la cohérence des résultats obtenus. En effet, on sait que l'albumine représente environ 60 % du total des protéines plasmatiques. Nos résultats se placent dans cette estimation. Les hépatocytes C3a confirment leur capacité de pouvoir assurer la synthèse de protéines de façon conséquente (166). Il reste maintenant à déterminer la quantité relative des principales protéines plasmatiques (facteurs de la coagulation par exemple) au sein de ce mélange protéique.

L'interprétation pour l'urée et l'élimination de l'ammoniac est rendue plus facile par le fait que les auteurs présentent leurs résultats en masse néoformée par millions de cellules donc équivalente à nos unités.

Ainsi pour l'urée, les valeurs de la littérature sont comprises dans une gamme de valeurs comprises entre 0,5 à 14  $\mu\text{g}/\text{h}/10^6$  cellules ce qui correspond à nos résultats. En ce qui concerne l'élimination de l'ammoniac, nos résultats sont en accord avec les données

bibliographiques. Il faut souligner la faible capacité d'élimination du bioréacteur ( $0,3 \mu\text{g/h}/10^6$  cellules). Cependant, elle peut être améliorée au vu du taux enregistré sur fond de boîte de culture ( $0,8 \mu\text{g/h}/10^6$  cellules).

De nouveau, les résultats obtenus permettent d'envisager avec optimisme, l'emploi de ce dispositif en vue d'une suppléance hépatique.

## **5.Conclusion Chapitre V**

La mise en place d'un modèle in vitro permet d'apprécier les capacités intrinsèques d'un système de suppléance quel qu'il soit. A partir des résultats présentés, on peut conclure que la viabilité et la fonctionnalité des cellules encapsulées dans le bioréacteur en régime fluidisé est conservée. Avec des molécules de hauts poids moléculaires comme l'albumine, la fluidisation semble légèrement améliorer les transferts de masse entre les cellules encapsulées et le milieu de culture. Pour l'urée, le bénéfice enregistré semble à la fois dû à l'encapsulation et à la fluidisation. Ainsi, considérant les fonctions métaboliques pouvant être assumées par les hépatocytes C3a encapsulés dans des billes d'alginate, et la possibilité de cryopréserver ces billes, on peut envisager l'emploi de ce dispositif en vue d'une suppléance hépatique.

Cette approche rigoureuse de l'étude de la fonctionnalité cellulaire, et la comparaison avec les données de la littérature, nous permet donc de valider notre concept et d'envisager une application clinique.



# **Chapitre VI : Etude des propriétés mécaniques de la bille d'alginate**

---



## **Avant propos**

A partir de l'examen de la littérature et des moyens disponibles à l'Université de Technologie de Compiègne, nous avons choisi de caractériser le comportement mécanique de la bille d'alginate en la soumettant à un test de compression. Nous disposons dans l'UMR d'un banc de compression qui nous permet de visualiser en temps réel la déformation de la bille immergée dans un milieu physiologique, tout en enregistrant les forces et les déplacements.

On peut légitimement se poser la question, comme ce fut le cas par le professeur A.Demetriou lors du XXIX congrès de la Société Européenne des Organes Artificiels (ESAO), Vienne, Autriche, 28-31 Août 2002, de la potentielle fragilisation des billes d'alginate. L'évaluation de ces forces de cisaillement est difficile à réaliser dans le cas d'un lit fluidisé. Il faut donc mettre en œuvre une méthode permettant d'apprécier les variations d'état de la structure de la bille.

En effet, elles sont soumises pendant les 6 heures de fonctionnement du bioréacteur, à des forces de cisaillement ainsi qu'à un contact permanent avec le fluide de perfusion.



## **Partie I : Caractérisation du matériau**

---

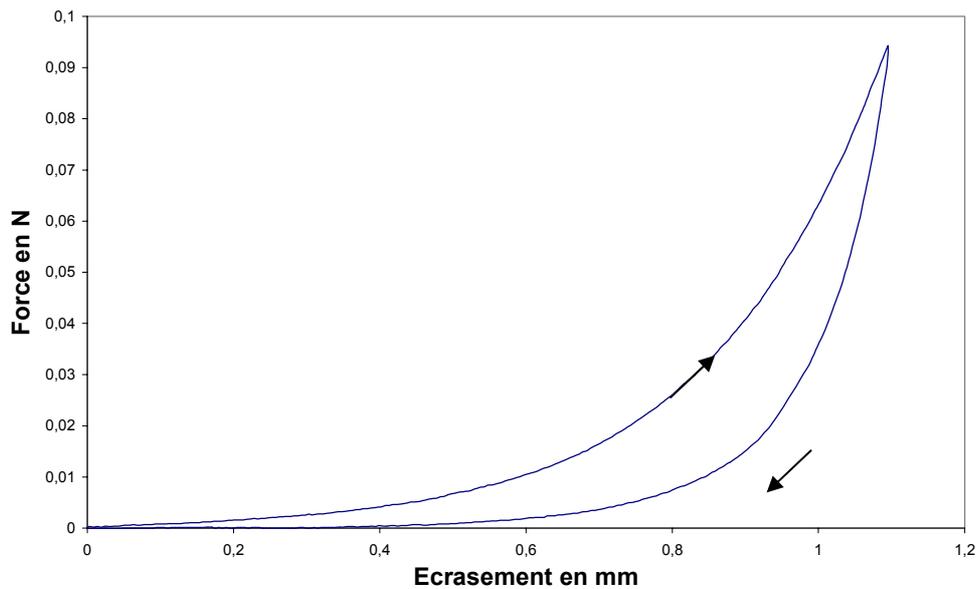
### **1.Introduction**

L'analyse des courbes force déplacement vise à mettre en évidence les différents types de comportement mécanique. Les résultats obtenus devraient permettre non seulement de caractériser le comportement mécanique des billes mais aussi d'étudier l'influence de divers paramètres comme le temps de réticulation et le diamètre des billes.

Afin de réaliser cette étude, nous avons débuté nos manipulations avec des billes d'alginate de 2 mm de diamètre, ne contenant pas de cellule dans le but de maîtriser le protocole de compression. Le choix de billes de 2 mm est venu de l'utilisation préalable, par Muriel Carin de l'équipe du Pr. D.Barthès-Biesel, du dispositif avec des capsules de diamètre de 3 à 4 mm. Nous nous sommes rapprochés de ce diamètre, dans la limite de nos possibilités de fabrication. La détection d'une bille de 2 mm est notamment beaucoup plus aisée que celle d'une bille de 1 mm. En effet, le contraste entre l'alginate et le liquide dans lequel baigne la bille pendant la manipulation de compression est faible. Ces travaux ont été en partie réalisés par une stagiaire de l'Ecole Polytechnique. Avec L.Barbe, ATER dans notre équipe, nous sommes ensuite passés à l'étude de billes de 1 millimètre.

### **2.Test de chargement**

La figure 95 illustre un exemple de courbe brute obtenue lors d'un essai de compression sur une bille d'alginate vide de 2 mm de diamètre. On a enregistré dans ce cas les phases de descente et de remonté du piston sous une vitesse constante.

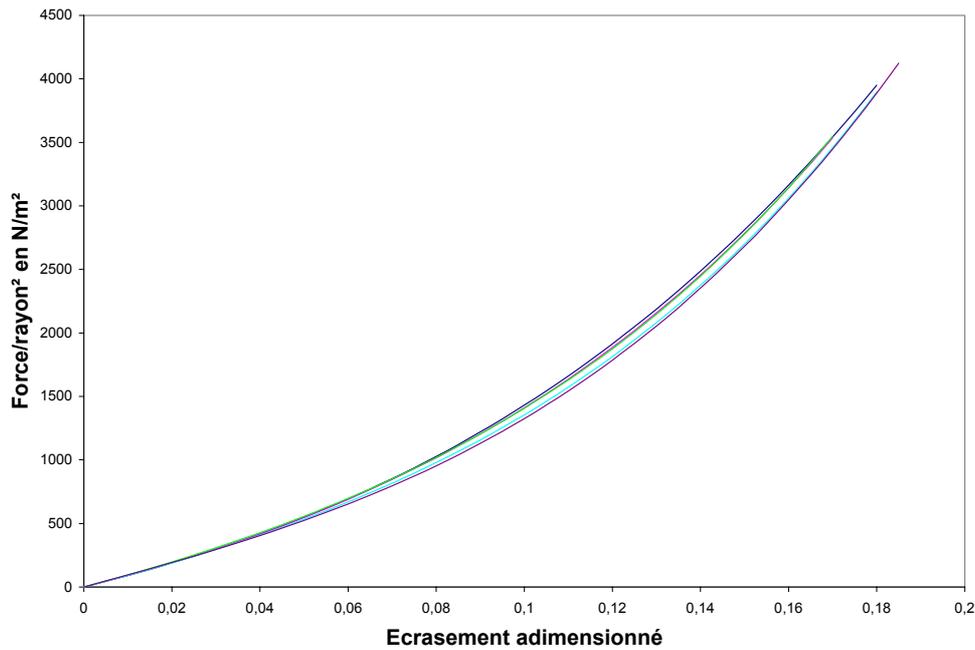


**Figure 95 : Exemple d'essai de compression obtenu pour une bille de 2mm ; temps de réticulation : 15min ; vitesse de compression : 0,6mm/min ; taux de compression de 50 %**

Ce comportement correspond au cas 2 décrit dans le chapitre I paragraphe 2.3.3. On se trouve donc en présence d'un matériau viscoélastique.

### 3. Test de fatigue

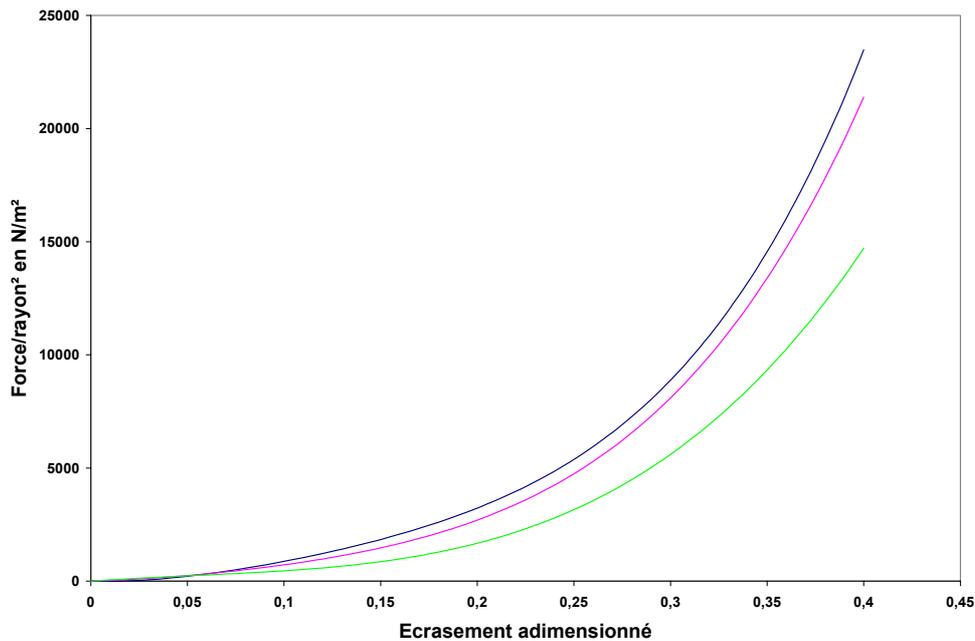
Il est nécessaire d'étudier la réaction des billes vis-à-vis de la fatigue. On effectue des cycles de chargement déchargement à vitesse constante sur une même bille (essai effectué sur 5 billes d'un même lot) (Figure 96).



**Figure 96 : Influence du nombre de compressions subies par une bille de 2 mm ; compression 1(—) ;2(—) ;3(—) ;4(—) ;5(—) ; temps de réticulation : 15min ; vitesse de compression : 0,6mm/min ; taux de compression de 18 %**

Il apparaît que les 5 compressions successives sont superposables pour un écrasement de l'ordre de 18%. La fatigue semble donc avoir peu d'influence sur le matériau de la bille pour un tel taux. De plus, nous nous situons bien dans le domaine élastique du matériau dans le sens où il n'y a pas apparition de déformation plastique de la bille.

Cependant, lorsque le taux de compression est augmenté à 40% environ, les courbes de compression ne sont plus superposables (Figure 97) : plus le nombre de compressions augmente, plus la force engendrée par un écrasement donné est faible.



**Figure 97 : Influence du nombre de compressions subies par une bille de 2 mm sur sa résistance mécanique ; compression 1(—) ;2(—) ;3(—) ; temps de réticulation : 15min ; vitesse de compression : 0,6mm/min ; taux de compression de 40 %**

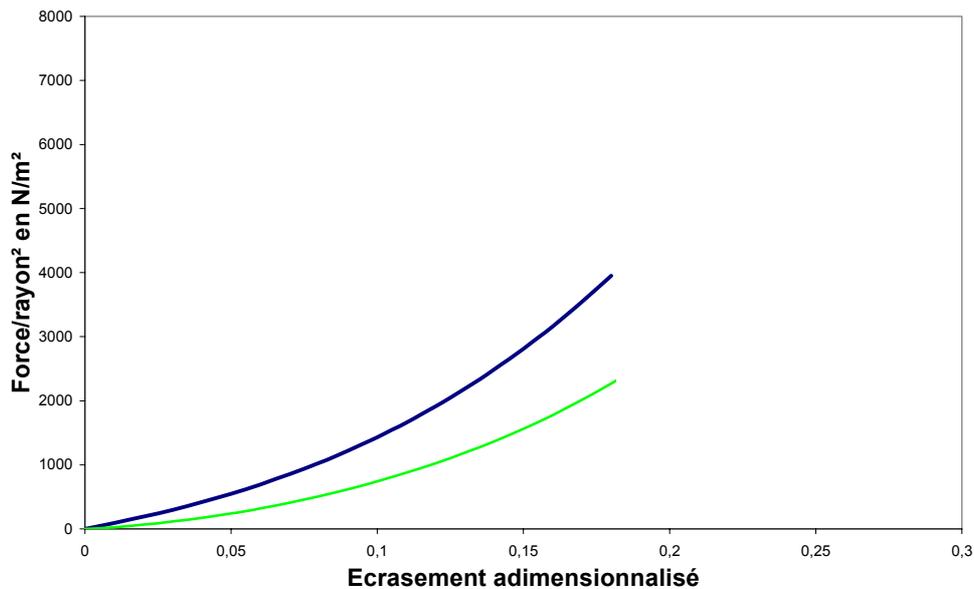
Des modifications de la structure interne du matériau sont susceptibles de se produire pour un tel taux d'écrasement.

**Tous les essais ultérieurs correspondent à l'expérience de première compression.**

#### **4.Influence du diamètre des billes**

Les essais initiaux sur les billes de 1 mm de diamètre ont montré que les manipulations sont plus délicates et les imprécisions sur les essais plus grandes. L'unique paramètre qui diffère lors de la fabrication des billes de diamètre 1 mm par rapport à celles de 2 mm est le débit du flux coaxial d'air. Leur temps de réticulation est de 15 min.

Nous avons donc étudié l'influence du diamètre des billes sur les courbes de compression (Figure 64). Etant donné que les deux types de billes étaient constituées du même matériau, une équivalence de comportement entre les deux diamètres aurait permis de travailler dans des conditions plus simples avec des billes de 2 mm.

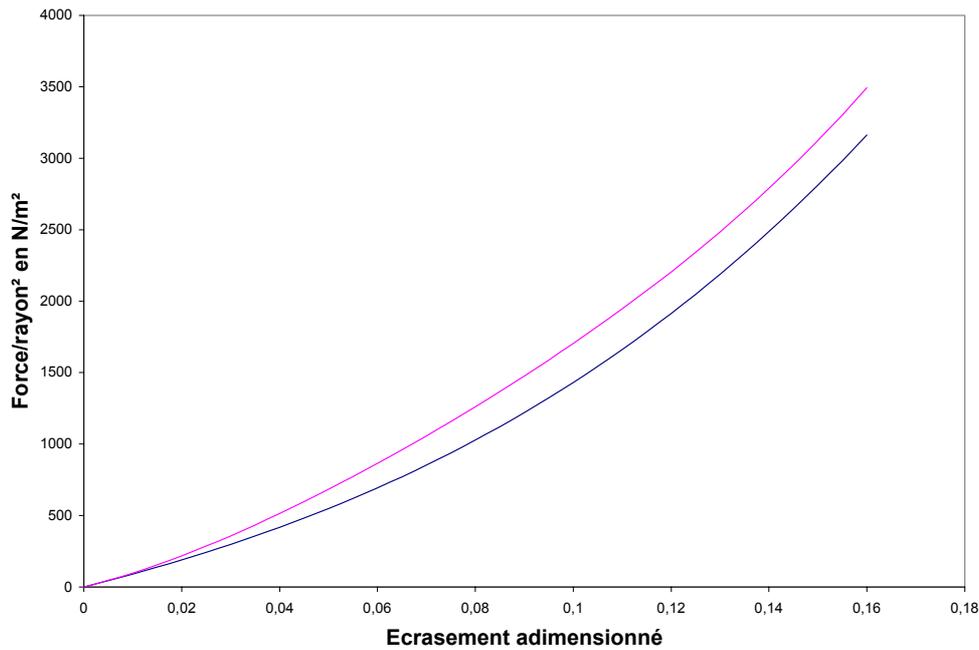


**Figure 98 : Influence du diamètre des billes d'alginate (—1mm ; —2mm) ; temps de réticulation : 15min ; vitesse de compression : 0,6mm/min ; taux de compression de 18 %**

La Figure 98 montre que le comportement mécanique des billes de 2 mm de diamètre n'est pas représentatif de celui des billes de 1 mm. Cependant, on peut se demander si cette différence est due au diamètre ou bien serait causé par des degrés de réticulation différents.

## 5. Influence du temps de réticulation

Nous avons vu que le cadre de l'application « foie bioartificiel », le temps de séjour maximal dans le bain de chlorure de calcium est de 15 minutes. Pour des billes de 2 mm de diamètre, ce temps peut paraître trop court pour autoriser une réticulation à cœur, et nous avons donc décidé de tester des billes de 2 mm avec un temps d'immersion de 30 minutes (Figure 99).



**Figure 99 : Influence du temps de réticulation (—15 minutes ; —30 minutes) avec des billes de 2mm ; vitesse de compression : 0,6mm/min ; taux de compression de 18 %)**

On observe qu’une augmentation du temps de réticulation de 15 min à 30 min semble entraîner un renforcement de la structure du gel d’alginate, puisque pour atteindre le même taux de compression une force d’écrasement plus importante est nécessaire. Cependant, on n’atteint pas les caractéristiques de la bille de 1 mm.

## 6. Evaluation du module de Hertz

Nos essais visent à mesurer la force s’exerçant sur le piston quand celui-ci comprime la bille d’alginate sous une déformation donnée. En 1882, Hertz a défini théoriquement la relation entre la déformation d’une sphère entre deux plans et la contrainte appliquée par la formule suivante.

$$F = \frac{5}{4} K_H r_0^2 \left[ 1 - \frac{D}{2r_0} \right]^{1,5} \quad \text{avec } K_H = \frac{64}{15} \mu \left[ \frac{3 + \frac{\mu}{K}}{3 + 4 \frac{\mu}{K}} \right] \quad (\text{VI.1})$$

F : force de répulsion élastique

$r_0$  : rayon initial de la bille

D : distance entre les deux plateaux

$\mu$  : module de cisaillement

K : module de compression

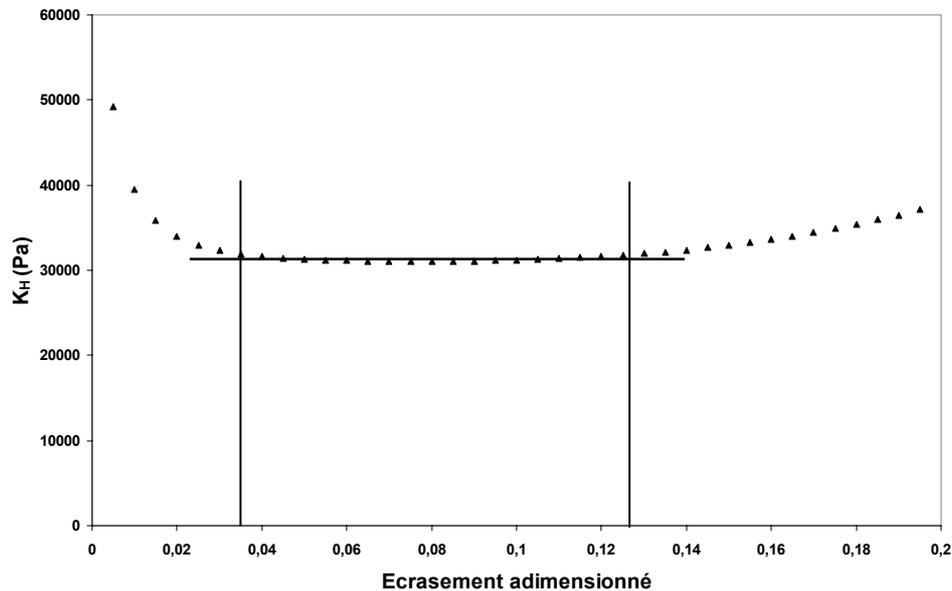
$K_H$  : module de Hertz.

Cette formule a été établie avec un certain nombre d'hypothèses (forces appliquée normalement à la surface, matériau homogène et élastique, rayon de la surface de contact très petite par rapport au rayon de la sphère c'est à dire domaine des petites déformations, pas de frottement entre bille et piston) (167-169) (184)

Cette théorie a été depuis lors appliquée à de nombreux cas, même si toutes les hypothèses ne sont pas vérifiées. Elle présente l'avantage de définir un coefficient, appelé module de Hertz  $K_H$ , qui est une constante caractéristique du matériau.

A partir de nos résultats, on peut donc calculer  $K_H$  par la formule :

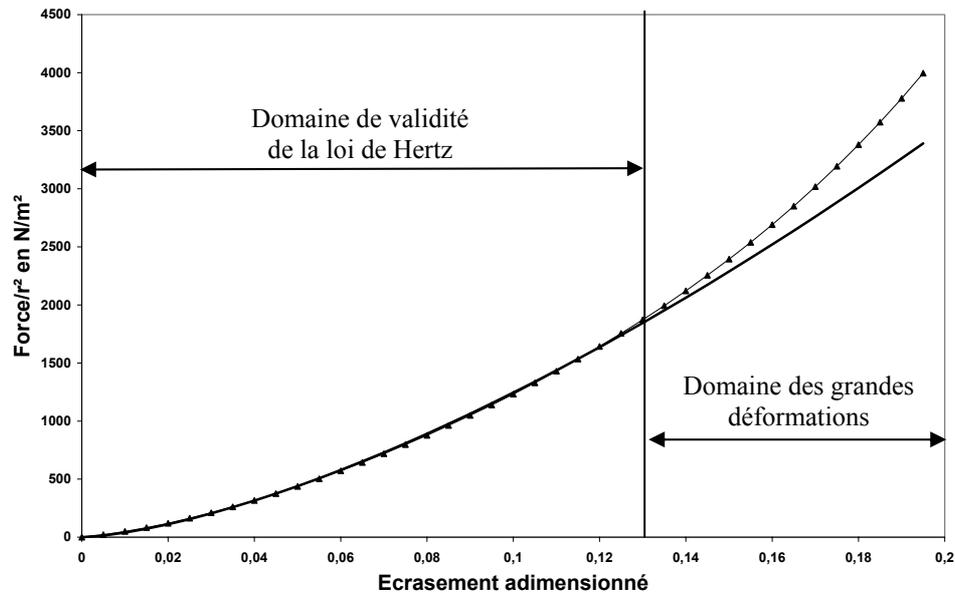
$$K_H = \frac{4}{5} \frac{F_{mesurée}}{r_0^2} \left[ 1 - \frac{D_{mesurée}}{2r_0} \right]^{-1,5} \quad (VI.2)$$



**Figure 100 : Tracé du module de Hertz en fonction de l'écrasement pour une bille de 1mm ; temps de réticulation 15 minutes ; taux de compression maximal de 18 %**

A titre d'exemple, la courbe (Figure 100) montre que ce module n'est pas tout à fait constant pour notre matériau mais qu'il semble se stabiliser dans une certaine gamme d'écrasement avec un  $K_H = 31000$  Pa. A partir de chaque courbe, nous avons défini un

coefficient  $K_H$  constant, de la façon indiquée sur la figure. C'est cette valeur que nous considérons pour caractériser le comportement de notre matériau et qui nous permettra de tracer la loi en puissance 1,5 de la théorie de Hertz. Dans ce cas,  $K_H$  a été déterminé à 31000 Pa. Cela nous permet d'effectuer la comparaison entre la courbe prédite par la théorie de Hertz et la courbe expérimentale (Figure 101).



**Figure 101 : Comparaison entre la courbe prédite par la théorie de Hertz (—) et la courbe expérimentale (—▲—) pour une bille de 1mm ; temps de réticulation 15 minutes ; taux de compression de 18 % avec un  $K_h$  fixé à 31000 Pa.**

La figure 101 détermine le domaine de validité de la loi de Hertz pour notre matériau viscoélastique. Malgré toutes les hypothèses de cette loi qui ne correspondent pas à notre étude, on s'aperçoit que les courbes théorique et expérimentale sont relativement proches jusqu'à un taux d'écrasement de 13 % qui définit la limite de validité de la loi de Hertz.

## 7. Commentaires et Analyses

Les différentes manipulations préliminaires nous ont permis de mieux connaître les caractéristiques mécaniques des billes d'alginate et de définir les conditions opératoires ultérieures. On se trouve donc en présence d'un matériau viscoélastique. Le comportement mécanique des billes de 2 mm de diamètre n'est pas représentatif de celui des billes de 1 mm, même en augmentant leur temps de réticulation. Malgré toutes les hypothèses de la loi de

Hertz qui ne correspondent pas à notre étude, les courbes théorique et expérimentale sont relativement proches jusqu'à un taux d'écrasement de 13%, et le module de Hertz sera donc retenu comme un des paramètres pouvant différencier les propriétés mécaniques de différents types de billes.

## **Partie II : Etude des caractéristiques mécaniques de la bille d'alginate en lit fluidisé**

---

### **1.Introduction**

Pour répondre à la question de la potentielle altération des propriétés mécaniques des billes d'alginate, le test de compression mis au point dans la première partie de cette étude constitue un outil qualitatif performant, capable de fournir des données permettant de comparer l'état initial et final des billes d'alginate. L'utilisation du module de Hertz, comme critère caractéristique, introduit un caractère quantitatif dans notre étude.

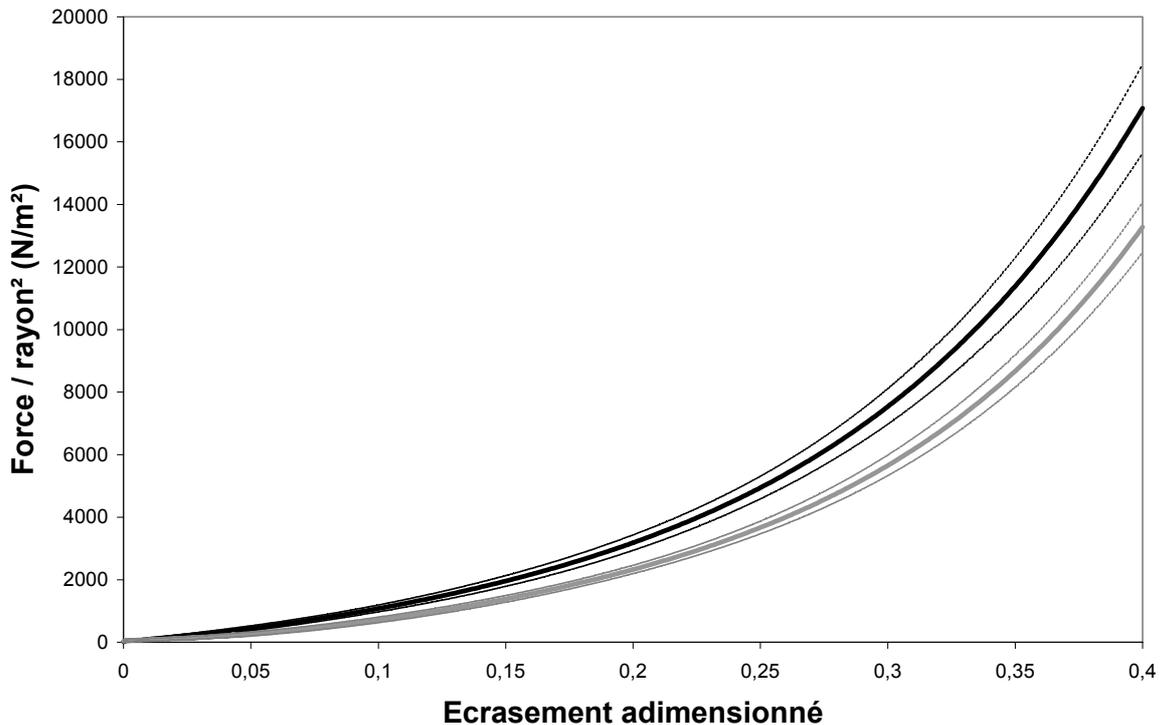
Le but de ce chapitre est d'étudier l'impact du passage des billes d'alginate de 1 millimètre dans le bioréacteur sur leur résistance à l'écrasement. Pour chacun des fluides de perfusion, sérum physiologique, milieu de culture et sérum de veau fœtal, 2 séries de manipulations sont menées, l'une avec des billes sans cellules dites « vides » et l'autre avec des billes contenant environ 1000 hépatocytes appelées « pleines ». On réalise des essais de compression sur 10 billes différentes avant et après passages dans le lit fluidisé (la durée de fluidisation est de 6 heures ce qui correspond à la durée de traitement journalier). Chaque manipulation est réalisée avec un lot de billes « neuves ». Le taux d'écrasement final est de 40 % pour étudier le comportement du gel dans le domaine des grandes déformations. Ce taux est le même pour tous nos essais. La vitesse de déplacement du piston est de 0,6 mm/s.

### **2.Dans du sérum physiologique**

Les figures 102 et 103 présentent la comparaison des courbes moyennes de compression obtenues avec des billes « vides » et « pleines » avant et après passage dans le bioréacteur perfusé par du sérum physiologique. Pour un lot de billes donné, chaque essai de compression est réalisé sur 10 billes différentes. La durée du séjour des billes à l'intérieur du

bioréacteur est de 6 heures pour un débit de perfusion de 25 ml/min (soit une vitesse de 0,9 mm/sec).

## 2.1. Billes vides

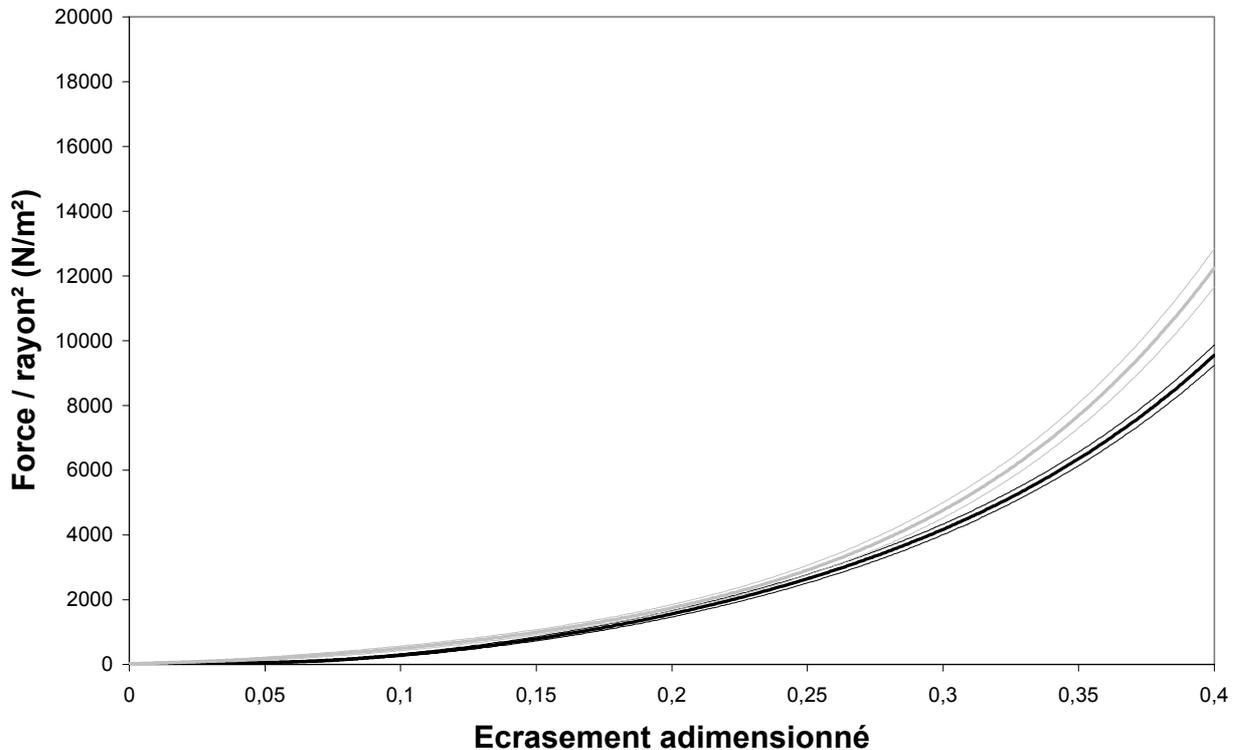


**Figure 102 : Comparaison des courbes moyennes  $\pm$ SEM de compression de billes vides avant (—) et après (—) passage dans le bioréacteur (6 heures) perfusé par du sérum physiologique**

L'observation des courbes dans du sérum physiologique pour des billes vides semble montrer une augmentation plus rapide de la pente de la courbe de compression des billes n'étant pas passées dans le bioréacteur (Figure 102). Plus le taux d'écrasement est grand, plus cette différence est marquée. Les valeurs de  $F/r_0^2$  enregistrées pour des billes ayant séjournées dans le bioréacteur durant 6 heures sont plus faibles que celles observées pour des billes avant passage dans le bioréacteur. Les valeurs finales sont respectivement de 13000 N/m<sup>2</sup> et 17000 N/m<sup>2</sup>. La diminution de cette valeur caractéristique du lot de billes utilisé traduit la diminution de la résistance des billes à l'écrasement. Le module de compression  $K_H$  obtenu est de 17000 Pascal pour les billes après passage dans le bioréacteur, chiffre qui est à comparer à celui de

27444 Pascal avant utilisation du lit fluidisé, ce qui confirme l'observation directe des courbes. Cette différence est significative

## 2.2. Billes pleines

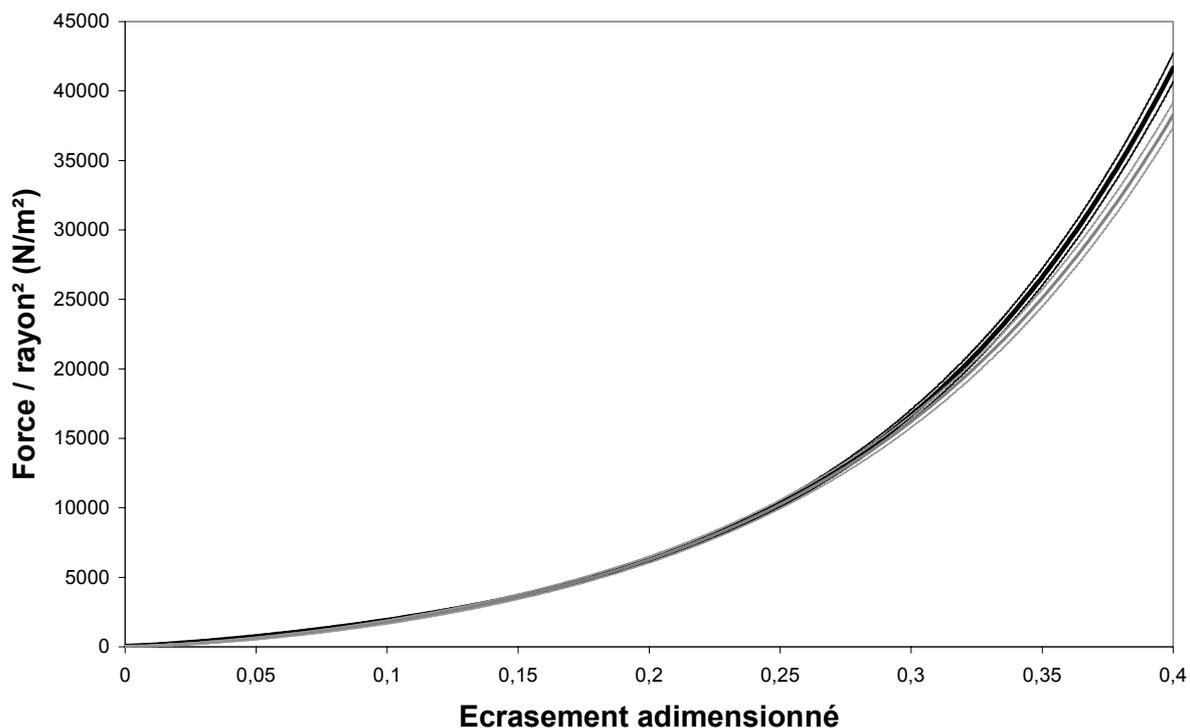


**Figure 103 : Comparaison des courbes moyennes  $\pm$ SEM de compression de billes avec cellules avant (—) et après (—) passage dans le bioréacteur (6 heures) perfusé par du sérum physiologique**

Dans ce cas (sérum physiologique et billes pleines), la tendance observée pour le cas précédant ne se confirme pas. En effet, les courbes avant et après passage dans le bioréacteur sont quasiment confondues pour la première moitié de l'écrasement (Figure 103). La seconde moitié voit la courbe après passage passer au-dessus de celle avant passage. Les valeurs finales sont respectivement de 12000 N/m<sup>2</sup> contre 10000 N/m<sup>2</sup>, ce qui traduit un léger durcissement des billes. Il faut noter que les pentes des courbes avec cellules augmentent moins vite que celles avec cellules. Le module de compression  $K_H$  obtenu est de 13400 Pascal pour les billes « après passage », contre 9800 Pascal avant utilisation du lit fluidisé. Cette différence est significative.

### 3. Dans du milieu complet (MEM SVF 10%)

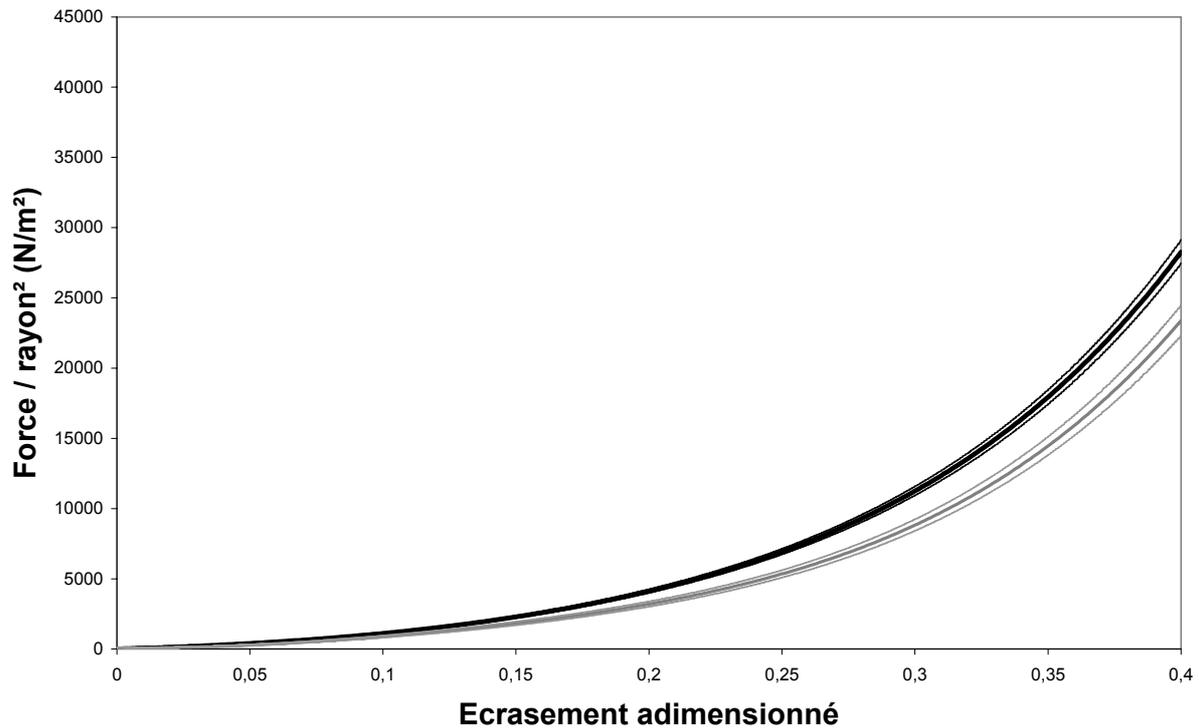
#### 3.1. Billes vides



**Figure 104 : Comparaison des courbes moyennes  $\pm$ SEM de compression de billes vides avant (—) et après (—) passage dans le bioréacteur (6 heures) perfusé par du milieu de culture**

Dans du milieu de culture, pour des billes vides, les courbes de compression (avant et après bioréacteur) sont quasiment confondues dans le domaine des petites déformations (Figure 104). Quand le taux d'écrasement augmente, on observe une résistance légèrement accrue pour des billes n'étant pas passés dans le bioréacteur. Les valeurs finales de  $F/r_0^2$  enregistrées sont respectivement de 38000 N/m<sup>2</sup> et 41000 N/m<sup>2</sup> (après et avant passage dans le bioréacteur). Le module de compression  $K_H$  obtenu est de 46300 Pascal pour les billes « après passage », contre 47700 Pascal avant utilisation du lit fluidisé. Cependant, cette différence n'est pas significative.

### 3.2. Billes pleines

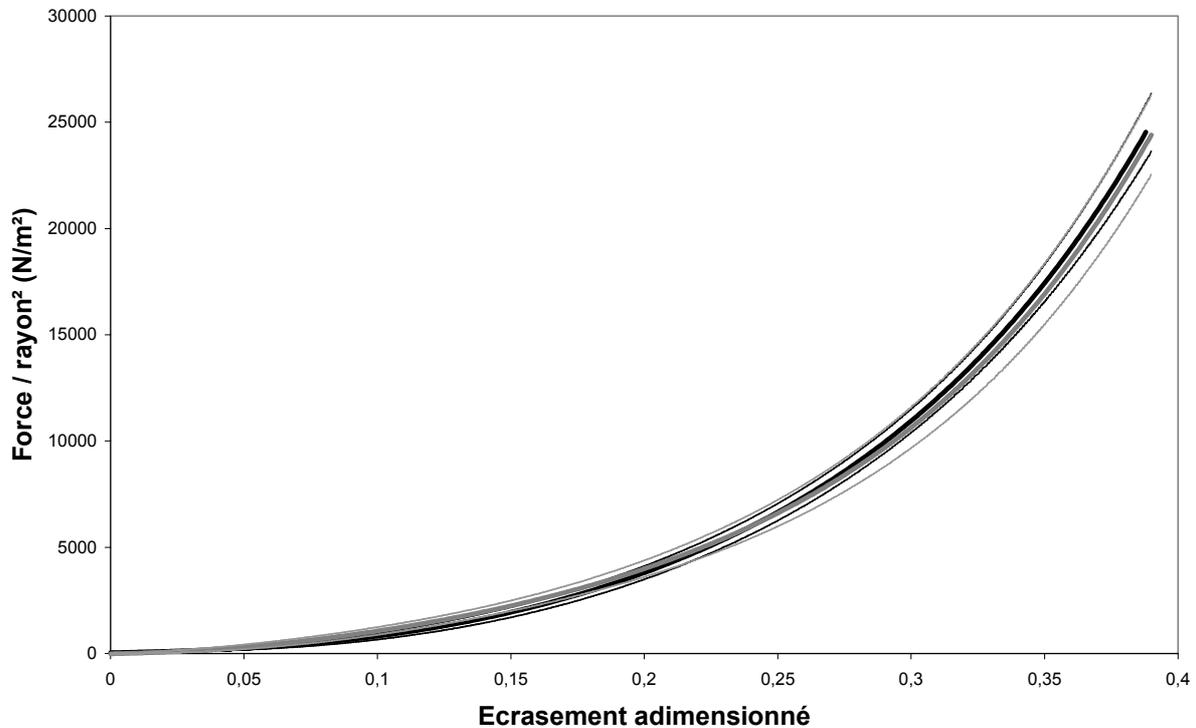


**Figure 105 : Comparaison des courbes moyennes  $\pm$ SEM de compression de billes avec des cellules avant (—) et après (—) passage dans le bioréacteur (6 heures) perfusé par du milieu de culture**

Ici encore, on retrouve que les valeurs de  $F/r_0^2$  enregistrées pour des billes pleines ayant séjourné dans le bioréacteur perfusé par du milieu de culture sont plus faibles que celles observées pour des billes pleines avant passage dans le bioréacteur (Figure 105). Les valeurs finales sont respectivement de 23000 N/m<sup>2</sup> contre 28000 N/m<sup>2</sup>. Les valeurs du module de compression sont de 24200 Pascal après passage et de 30444 Pascal avant passage dans le lit fluidisé. Cette différence est significative. Une nouvelle fois, il semble que la résistance à l'écrasement diminue légèrement après passage dans le bioréacteur.

## 4. Dans du Sérum de veau foetal

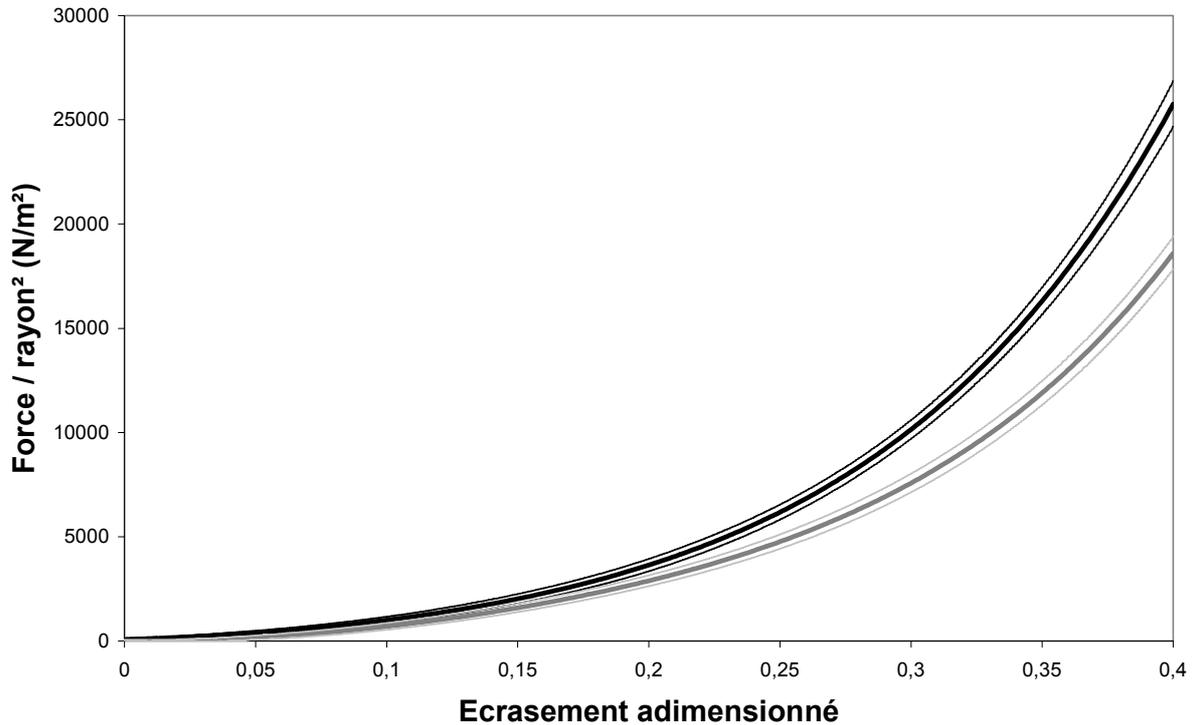
### 4.1. Billes vides



**Figure 106 : Comparaison des courbes moyennes  $\pm$ SEM de compression de billes vides avant (—) et après (—) passage dans le bioréacteur (6 heures) perfusé par sérum de veau foetal**

L'observation des courbes obtenues avec des billes vides et du sérum de veau foetal montre que celles ci sont confondues pour la totalité de l'écrasement (Figure 106). La valeur finale de  $F/r_0^2$  enregistrée pour des billes ayant séjourné dans le bioréacteur et celle mesurée pour des billes avant passage sont très proches,  $24400 \text{ N/m}^2$  contre  $24500 \text{ N/m}^2$ . Le module de compression  $K_H$  obtenu est de  $27857 \text{ Pascal}$  pour les billes après passage, contre  $21857 \text{ Pascal}$  avant utilisation du lit fluidisé. Cette différence n'est pas significative. Dans ce cas, il semble que l'état initial et final des billes en terme de résistance à l'écrasement n'a pas évolué.

## 4.2. Billes pleines



**Figure 107 : Comparaison des courbes moyennes  $\pm$ SEM de compression de billes avec des cellules avant (—) et après (—) passage dans le bioréacteur (6 heures) perfusé par sérum de veau fœtal**

Ce dernier cas semble confirmer la tendance enregistrée pour les autres cas. En effet, avec des billes pleines et du sérum de veau fœtal, on observe à nouveau une augmentation plus rapide de la pente de la courbe de compression des billes n'étant pas passées dans le bioréacteur. Plus le taux d'écrasement est grand, plus cette différence est marquée (Figure 107). Les valeurs finales de  $F/r_0^2$  à 40 % de compression sont respectivement de 18000 N/m<sup>2</sup> contre 25000 N/m<sup>2</sup>. La résistance des billes à l'écrasement diminue après passage dans le bioréacteur. Le module de compression  $K_H$  obtenu est de 20500 Pascal pour les billes « après passage », chiffre contre 28778 Pascal avant utilisation du lit fluidisé. Cette différence est significative.

## 5. Commentaires et Analyses

### 5.1. Module de Hertz

Le tableau 21 reprend l'ensemble des modules de Hertz calculés à partir des courbes précédentes. Pour mémoire, plus le  $K_H$  est élevé, plus la bille résiste à l'écrasement.

| Fluides de perfusion | Nature des billes |       | $K_H$ (Pa)   | Limite de validité (% d'écrasement) | Test de Student |
|----------------------|-------------------|-------|--------------|-------------------------------------|-----------------|
| Sérum physiologique  | Billes vides      | Avant | 27444± 2304  | 18                                  | **              |
|                      |                   | Après | 17000± 1903  | 13                                  |                 |
|                      | Billes pleines    | Avant | 9800± 727    | 13                                  | **              |
|                      |                   | Après | 13400± 1077  | 15                                  |                 |
| Milieu de culture    | Billes vides      | Avant | 47700± 1585  | 14                                  | Ns              |
|                      |                   | Après | 46300± 2486  | 13                                  |                 |
|                      | Billes pleines    | Avant | 30444± 988   | 14                                  | **              |
|                      |                   | Après | 24200± 1659  | 15                                  |                 |
| Sérum de veau fœtal  | Billes vides      | Avant | 21857± 2931  | 13                                  | Ns              |
|                      |                   | Après | 27857± 2980  | 13                                  |                 |
|                      | Billes pleines    | Avant | 28778 ± 2253 | 17                                  | *               |
|                      |                   | Après | 20500 ± 2970 | 14                                  |                 |

différence significative : (\*)  $0,05 < p < 0,02$  ; (\*\*)  $0,02 < p < 0,01$  ; (\*\*\*)  $p < 0,001$  ; (Ns) différence non significative

**Tableau 21 : Récapitulatif des valeurs de  $K_H$  (Pa) obtenues pour les cas étudiés**

Le but de notre étude est d'étudier l'effet du passage de billes d'alginate à l'intérieur d'un bioréacteur à lit fluidisé. Les résultats montrent que le bioréacteur semble légèrement affecter la résistance des billes à l'écrasement, mais pas de façon dramatique. A aucun moment, il n'a été observé de rupture prématurée de billes lors des tests de chargement. Bien que logique, ce résultat vise à rassurer les futurs utilisateurs potentiels de ce type de foie bioartificiel.

On peut aussi analyser les résultats en considérant l'effet de la présence de cellules dans les billes (Tableau 22).

| Fluides de perfusion | Billes sans cellules | Billes avec cellules | Test de Student |
|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------|
| Sérum physiologique  | 27444                | 9800                 | ***             |
| Milieu de culture    | 47700                | 30400                | ***             |
| Sérum de veau fœtal  | 21900                | 28800                | Ns              |

différence significative : (\*)  $0,05 < p < 0,02$  ; (\*\*)  $0,02 < p < 0,01$  ; (\*\*\*)  $p < 0,001$  ; (Ns) différence non significative

**Tableau 22 : Récapitulatif des valeurs de  $K_H$  (Pa) obtenues pour les billes avec et sans cellules avant passage dans le bioréacteur**

Pour le sérum physiologique et le milieu de culture, il semble que la présence de cellules au sein des billes d'alginate provoque une fragilisation de la structure comme en témoignent les valeurs de  $K_H$ . La valeur de  $K_H$  pour le milieu de culture est très supérieure à celle du sérum physiologique. Ceci pourrait être dû à la présence de chlorure de calcium ( $CaCl_2$ ) à une concentration non négligeable (200 mg/l) dans le Minimum Essentiel Medium, comme l'indique la fiche technique de celui-ci (annexe 6), entrant pour 90 % en volume dans la composition du milieu de culture complet. Pour expliquer cette constatation, on peut émettre l'hypothèse que, au bout de 15 minutes, la réticulation n'est pas complète, et que celle-ci se poursuit pendant la phase de « stockage » des billes (12 heures) jusqu'à leur utilisation dans le bioréacteur.

Ces résultats montrent que deux effets semblent se superposer :

- 1.Effet de la présence de cellules
- 2.Effet du milieu

On peut estimer que la solution physiologique permet d'observer l'effet de la présence de cellules car ce milieu à une composition chimique proche de celle de la bille d'alginate, ce qui réduit les risques d'interactions entre les deux éléments. Il apparaît donc que la présence de cellules à l'intérieur de la bille la fragilise et donc la rende moins résistante à l'écrasement. L'évolution du  $K_H$  dans le cas du milieu de culture semble confirmer cette hypothèse.

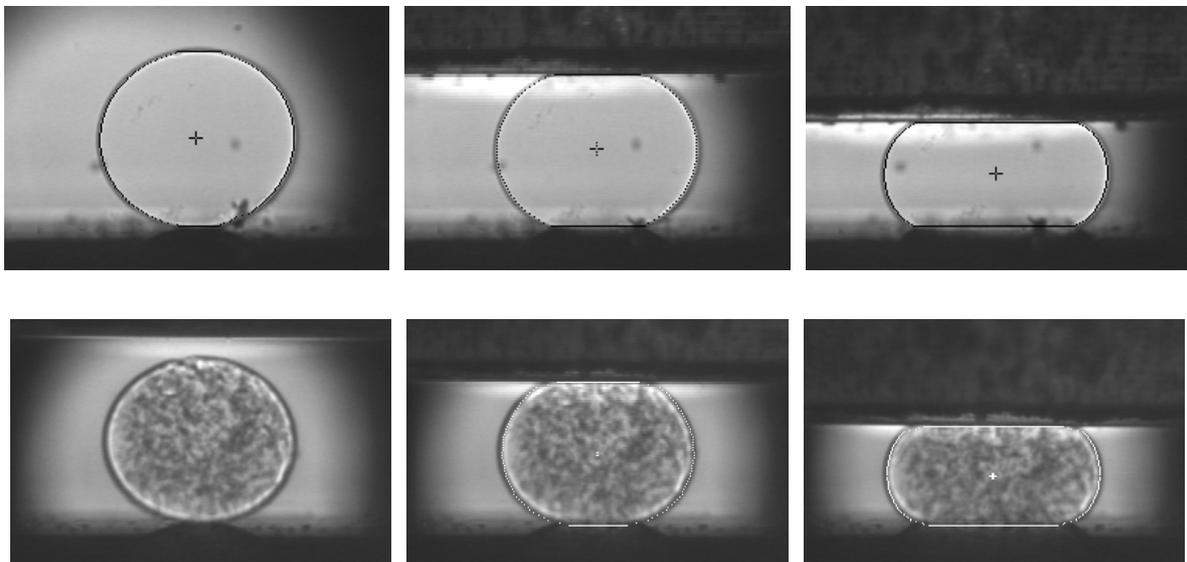
Notre dernier cas est loin d'être facile à interpréter. Pour mieux cerner l'influence du sérum de veau fœtal (et donc de protéines), nous avons réalisé une manipulation complémentaire. Des tests de chargement ont été effectués dans du MEM contenant du sérum de veau fœtal de concentration croissante (0, 5 et 10%), afin de quantifier cet effet.

Les courbes de compression obtenues sont très proches les une des autres et ne permettent pas de mettre en évidence une différence (et donc une tendance) de comportement en fonction du milieu. De même, le calcul des  $K_H$  pour chacune des billes montre que les valeurs obtenues sont toutes très proches. Il est donc très difficile de cerner l'influence du sérum de veau fœtal. Existerait-il un effet masquant du SVF ou bien des ions présents en solution ?

La variation des valeurs de  $K_H$  doit être relativisée car la théorie de Hertz n'est valable que pour des matériaux homogènes, dans le domaine des petites déformations, ce qui n'est nullement le cas des billes d'alginate, surtout lorsqu'elles contiennent des cellules. Par ailleurs, les propriétés mécaniques des cellules biologiques sont encore mal connues et font toujours l'objet de nombreuses recherches.

## 5.2. Critère géométrique

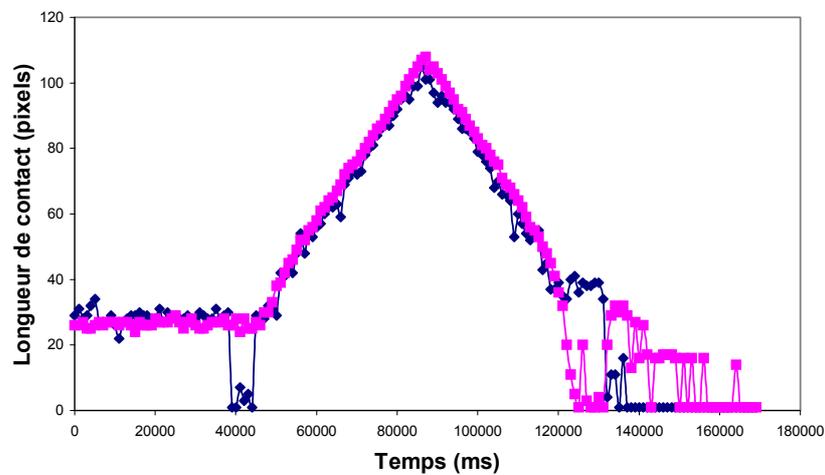
Afin de tirer un critère comparatif de nos essais en grande déformation, nous avons donc souhaité introduire un autre paramètre. En cela, l'acquisition vidéo en temps réel nous fournit une autre possibilité d'analyse des résultats que nous pouvons qualifier de géométrique. Grâce au logiciel Scion image (Scion Image, version Beta4.0.2, Scion Corporation, Maryland, USA), on peut détecter les contours de la bille, vide ou pleine, au cours de la manipulation d'écrasement (Figure 108). Notre intérêt s'est porté sur les surfaces de contact des interfaces bille-piston et bille-support. Ces surfaces peuvent être calculées à partir des mesures des longueurs de contact effectués sur les image 2D recueillies au cours de la compression.



**Figure 108 : Billes d'alginate de 1 mm vides (en haut) et hébergeant des cellules (en bas) avant compression (à gauche) et pendant la compression (au milieu (taux de compression de 14%) et à droite (taux de compression de 40%))**

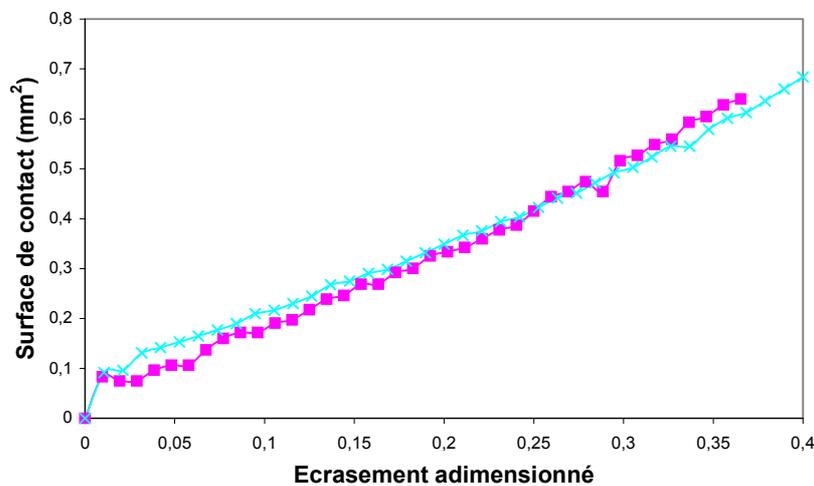
La figure 109 montre l'évolution de la longueur de la zone de contact au cours de l'écrasement d'une bille de 1 millimètre vide. La partie ascendante représente le chargement

et la partie descendante le déchargement. On ne s'intéresse qu'à la partie correspondant au chargement.



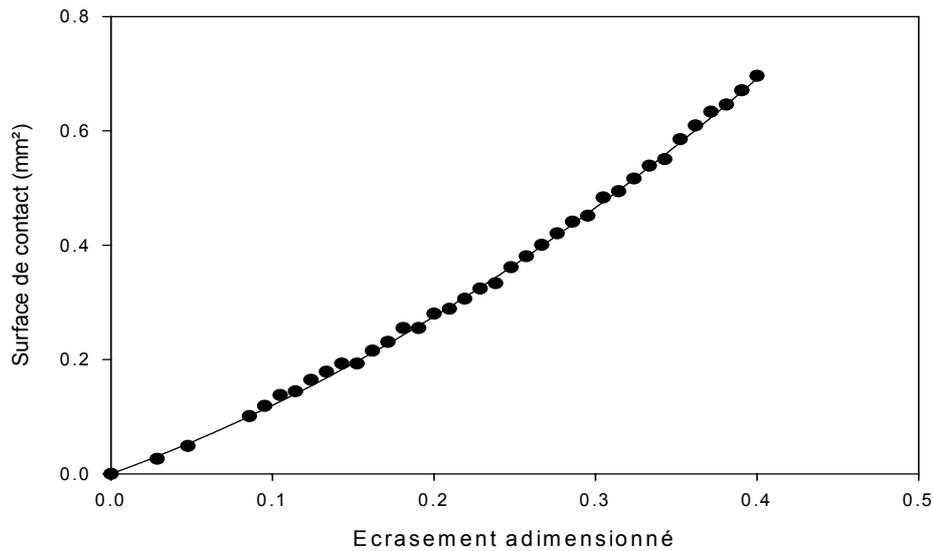
**Figure 109 : Valeurs brutes de la longueur de contact (—◆—longueur de contact piston-bille ; —■— longueur de contact bille-support)**

Après synchronisation des images avec le temps, on peut calculer la surface de contact en fonction de l'écrasement adimensionné (Figure 110). La surface de contact est calculée à partir de la vue 2D en supposant que l'écrasement est axisymétrique.



**Figure 110 : Exemple de calcul de la surface de contact en fonction de l'allongement pour deux billes (—■—bille 1 ; —×—bille 2)**

On constate que la surface de contact varie plus ou moins linéairement avec l'écrasement. Cependant, une interpolation plus précise peut être obtenue avec un polynôme d'ordre :  $y = ax + bx^2$  (Figure 111)



**Figure 111 : Interpolation en  $y = ax + bx^2$  de la surface de contact bille-piston en fonction de l'écrasement adimensionné**

Ainsi, le coefficient géométrique  $b$  pourra être employé comme critère de compression entre les différents cas étudiés. Si l'on compare deux billes, pour un déplacement donné, lorsque «  $b$  » augmente, la surface de contact augmente ce qui signifie que le matériau devient plus « mou ». Autrement dit, pour un même diamètre, un matériau moins résistant à la compression s'étale plus qu'un matériau plus rigide, ce qui se traduit par une surface de contact plus grande. Plus «  $b$  » est petit, plus la bille résiste à l'écrasement (Tableau 23 ). Ce coefficient évolue donc inversement au coefficient de Hertz  $K_H$ .

| Fluides de perfusion | Nature des billes |       | Coefficient<br>ax+bx <sup>2</sup> (x10 <sup>6</sup> ) | Test de<br>Student |
|----------------------|-------------------|-------|---|--------------------|
| Sérum physiologique  | Billes vides      | Avant | 1,23183   | ***                |
|                      |                   |       | ± 0,0854368   |                    |
|                      | Billes pleines    | Après | 1,54377   |                    |
|                      |                   |       | ± 0,0566253   |                    |
| Milieu de culture    | Billes vides      | Avant | 1,86629   | Ns                 |
|                      |                   |       | ± 0,163736  |                    |
|                      | Billes pleines    | Après | 0,93848   |                    |
|                      |                   |       | ± 0,263096  |                    |
| Sérum de Veau Fœtal  | Billes vides      | Avant | 0,839582  | *                  |
|                      |                   |       | ± 0,123362  |                    |
|                      | Billes pleines    | Après | 0,791074  |                    |
|                      |                   |       | ± 0,0489113   |                    |
| Sérum de Veau Fœtal  | Billes vides      | Avant | 0,981089  | Ns                 |
|                      |                   |       | ± 0,241485  |                    |
|                      | Billes pleines    | Après | 1,38106   |                    |
|                      |                   |       | ± 0,189627  |                    |
| Sérum de Veau Fœtal  | Billes vides      | Avant | 2,196   | Ns                 |
|                      |                   |       | ± 0,2567  |                    |
|                      | Billes pleines    | Après | 2,023   |                    |
|                      |                   |       | ± 0,4159  |                    |
| Sérum de Veau Fœtal  | Billes vides      | Avant | 1,467   | Ns                 |
|                      |                   |       | ± 0,3263  |                    |
|                      | Billes pleines    | Après | 1,222   |                    |
|                      |                   |       | ± 0,3443  |                    |

différence significative : (\*) 0,05 < p < 0,02 ; (\*\*) 0,02 < p < 0,01 ; (\*\*\*) p < 0,001 ; (Ns) différence non significative

**Tableau 23 : Récapitulatif des valeurs du coefficient b**

Cette méthode a pour avantage de prendre en compte l'ensemble de la courbe de compression, correspondant à la grande déformation, et non plus simplement la partie initiale, correspondant à la petite déformation.

Le tableau 24 présente la comparaison du sens de l'évolution des valeurs de  $K_H$ , du coefficient b et de la Force finale à 40% / rayon<sup>2</sup> pour l'ensemble des cas étudiés.

| Fluides de perfusion | Nature des billes  |       | Evolution Du $K_H$ | Evolution De b | Evolution Force/rayon <sup>2</sup> |
|----------------------|--------------------|-------|--------------------|----------------|------------------------------------|
| Sérum physiologique  | Billes vides       | Avant |                    |                |                                    |
|                      |                    | Après |                    |                |                                    |
|                      | Billes pleines     | Avant |                    |                |                                    |
|                      |                    | Après |                    |                |                                    |
| Milieu de culture    | Billes vides (*)   | Avant |                    |                |                                    |
|                      |                    | Après |                    |                |                                    |
|                      | Billes pleines     | Avant |                    |                |                                    |
|                      |                    | Après |                    |                |                                    |
| Sérum de veau fœtal  | Billes vides       | Avant |                    |                |                                    |
|                      |                    | Après |                    |                |                                    |
|                      | Billes pleines (*) | Avant |                    |                |                                    |
|                      |                    | Après |                    |                |                                    |

**Tableau 24 : Comparaison de l'évolution des valeurs de  $K_H$  et du coefficient b décrivant la surface d'écrasement et de la valeur finale de  $F/r_o^2$**

Si on part du principe que le coefficient “b” évolue inversement à  $K_H$ , dans deux tiers des cas, les résultats obtenus avec les deux méthodes sont en accord. Ainsi par exemple, une diminution de la valeur de  $K_H$  se traduit par une augmentation du coefficient « b ». Autrement dit, le matériau, en devenant moins résistant à l'écrasement, voit sa surface de contact avec le piston s'accroître. Cependant, ceci n'est pas vérifié pour deux cas indiqués par une (\*) dans le tableau. Pour le premier cas (billes vides dans du milieu de culture), les valeurs de  $K_H$  et du coefficient b avant et après passage dans le bioréacteur, sont très proches et couvertes par leur SEM. L'impossibilité de mettre en évidence une quelconque évolution cohérente, est certainement due à l'insuffisance de sensibilité de nos méthodes d'analyse. Pour le second cas (billes pleines dans du sérum de veau fœtal), les valeurs de  $K_H$  calculées montrent qu'il existe une différence significative entre l'état initial de la bille et l'état final après passage dans le lit

fluidisé. La diminution du  $K_H$  traduisant une diminution de la résistance à l'écrasement nous aurions du observer une augmentation de "b", ce qui n'est nullement le cas.

Dans ces cas, le critère géométrique nous paraît plus fiable car il prend en compte l'ensemble de la compression. On peut considérer que les incertitudes sont plus grandes dans le domaine des petites déformations, notamment au niveau de la mesure de la force.

Une dernière possibilité d'analyse est la comparaison de l'évolution, avant et après passage dans le bioréacteur, du coefficient de Hertz  $K_H$  et du coefficient géométrique  $b$ , avec celle des courbes expérimentales force / rayon<sup>2</sup> en fin de compression. Ainsi, l'observation directe des figures 102 à 107, montre que, dans la plupart des cas, les courbes après passage sont en dessous des courbes avant passage. Pour un déplacement donné, la résistance à l'écrasement diminue. Ceci confirme l'analyse faite grâce aux coefficients de Hertz et géométrique.

## **6. Conclusion Chapitre VI**

Comme nous venons de le voir, la caractérisation des propriétés mécaniques de billes d'alginate hébergeant des cellules est très délicate. Elle nécessite un nombre important d'expériences. Par ailleurs, nous avons dû faire face à de nombreuses difficultés pour mettre au point le protocole d'écrasement de billes d'alginate. Cependant, les premiers résultats nous ont permis de déceler l'influence de certains paramètres sur les propriétés viscoélastiques des billes. Ainsi, l'étude de l'effet du diamètre des billes a montré que les propriétés mécaniques du matériau constituant des billes de 1 mm et de 2 mm ne sont pas les mêmes. Les billes de 2 mm bien que plus simple à manipuler, ne peuvent donc pas être utilisées pour accéder aux propriétés des billes de 1 mm.

Les hypothèses des théories existantes sur lesquelles nous nous sommes basées étaient relativement éloignées des conditions expérimentales de notre étude. Cependant, les paramètres  $K_H$  (module de Hertz) et le coefficient géométrique que nous avons décidé d'utiliser permettent d'effectuer une étude comparative des divers facteurs pouvant influencer le comportement des billes. On se posait notamment le problème de l'effet du bioréacteur lors d'un séjour de 6 heures des billes d'alginate. Pendant ces 6 heures, les billes sont en

mouvement permanent et subissent des contraintes mécaniques difficilement quantifiables. Elles sont aussi en contact avec un fluide complexe dans sa composition. Les deux paramètres que nous avons choisi d'analyser semblent montrer que la détérioration des propriétés mécaniques des billes dans le bioréacteur est faible. En revanche, la présence même de cellules dans le matériau poreux, introduisant un caractère biphasique, est responsable d'une diminution de la résistance à l'écrasement. Enfin, il semble que la composition physico-chimique du milieu environnant les billes ait une influence directe sur l'état de réticulation du biomatériau.



# Conclusions et perspectives

---



Ce mémoire de thèse présente les différentes étapes nécessaires à la mise en place d'un modèle d'évaluation « *in vitro* » d'un système extracorporel de suppléance hépatique. Notre système se présente sous forme d'un bioréacteur contenant des hépatocytes immobilisés dans des billes d'alginate situé en aval d'un appareil de plasmaphérèse. Les auteurs ayant fait le choix de s'abroger de cette étude *in vitro* sont bien souvent dans l'incapacité de valider le fonctionnement même du foie bioartificiel. Notre objectif a été d'analyser le fonctionnement du système de suppléance hépatique extracorporel, en respectant le cahier des charges préalablement défini.

Dans un premier temps, le comportement des billes d'alginate dans un lit fluidisé a été étudié pour des conditions « *in vitro* » se rapprochant au mieux de celles rencontrées « *in vivo* ». L'objectif était de faire le lien entre les résultats précédemment obtenus dans le cadre d'un modèle expérimental *in vitro* simple avec ceux observés pendant une expérimentation animale chez notre partenaire de Rennes. A travers les résultats des études menées pendant cette thèse, il apparaît que la présence de cellules au sein des billes d'alginate n'a pas d'influence sur le comportement global du lit fluidisé à l'intérieur du bioréacteur. La surélévation du lit de billes, observée lors de l'expérimentation animale, semble due au fluide de perfusion, les billes d'alginate ayant alors une masse volumique très proche de celle du plasma. Afin de conserver des conditions de fluidisation satisfaisantes dans le bioréacteur *in vivo*, nous proposons deux solutions : la première consiste en un redimensionnement du bioréacteur suivant les nouvelles données proposées au chapitre IV, la seconde envisage un alourdissement des billes, à l'aide de grains de magnétite ou de microbilles de verres, ce qui permettrait d'être moins dépendant des caractéristiques de la phase fluide. De même, les transferts de matière, c'est à dire les possibilités d'échanges entre les billes et le plasma, dans des conditions dynamiques, ont été évaluées quantitativement. Les cinétiques sont plus lentes que celles observés dans du sérum physiologique mais les quantités échangées sont les mêmes. Ceci est confirmé par les calculs, après modélisation des échanges des coefficients de transfert de masse globaux.

Dans un second temps, la mise en place d'un modèle « *in vitro* » a permis d'apprécier les capacités intrinsèques du système bioartificiel. L'organisation des hépatocytes à l'intérieur des billes d'alginate ainsi que leur viabilité et leur fonctionnalité ont été étudiés. Il apparaît que la bille offre une structure tridimensionnelle favorable aux hépatocytes mais cependant, ne permet pas à ceux-ci de migrer les uns vers les autres. Leur viabilité ne semble pas être

affectée par l'encapsulation ou la mise en mouvement dans le bioréacteur. De même, encapsulés puis placés dans le bioréacteur, les hépatocytes gardent leurs pleines potentialités métaboliques. Dans certains cas, l'encapsulation semble même améliorer le métabolisme. L'utilisation du lit fluidisé prend ici tout son sens car il permet de favoriser légèrement les transferts de masse entre les cellules encapsulées et le milieu de culture. Cette approche rigoureuse de l'étude de la fonctionnalité cellulaire nous permet de valider notre concept de « Foie bioartificiel à lit fluidisé ».

Les perspectives offertes par cette étude sont multiples. La présente étude constituant une première étape de son évaluation, nous nous sommes concentrés sur le suivi du métabolisme des cellules encapsulées sur 12 heures au maximum, ce qui a rendu le dosage des marqueurs très délicats. Or, la plupart des études présentent des valeurs pour 24 heures. Il serait donc intéressant de poursuivre l'étude par le suivi du métabolisme des hépatocytes encapsulés sur 24 heures, voire 48 à 72 heures afin d'estimer le moment auquel les cellules encapsulées présentent un métabolisme optimal. Il sera aussi nécessaire d'étudier l'influence de l'introduction d'amas d'hépatocytes dans les billes plutôt que des cellules unitaires. Cela passe par une redéfinition de la technique de culture employée pour obtenir des agrégats de cellules. Enfin, un dernier point intéressant serait de mener une étude de l'interaction entre la cellule, l'hépatocyte, et le biomatériau, l'alginate.

Enfin, l'influence du lit fluidisé sur les propriétés mécaniques des billes d'alginate hébergeant des cellules a été caractérisée. Tout d'abord, les propriétés mécaniques du matériau constituant des billes ont été étudiées. On se trouve en présence d'un matériau viscoélastique. L'analyse des tests de chargement a été rendue possible par l'utilisation de la théorie de Hertz. Ensuite, une étude comparative des divers facteurs pouvant influencer le comportement mécanique des billes d'alginate a été entreprise. Ainsi, il apparaît que le bioréacteur à lit fluidisé ne provoque qu'une faible altération des propriétés mécaniques des billes d'alginate après 6 heures d'utilisation. La présence de cellules dans la bille conduit à une diminution de la résistance à l'écrasement. Il semble que la composition physico-chimique du milieu environnant les billes ait une influence directe sur la résistance à l'écrasement du biomatériau. La théorie de Hertz n'étant valable que dans le domaine des faibles déformations, nous avons choisi d'introduire un nouveau mode d'analyse basé sur la détection en temps réel des contours de la structure grâce à un système d'acquisition vidéo. Le paramètre géométrique défini dans le chapitre VI donne des tendances comparables à celles de la théorie de Hertz. Afin de compléter cette étude, d'autres paramètres pourraient être

testés tels que l'influence du temps de réticulation sur les billes avec cellules, l'influence du pourcentage d'alginate dans la composition du gel, le domaine de rupture de la bille, l'influence de la méthode de stérilisation du gel d'alginate, etc. Certains de ces travaux sont actuellement à l'étude dans le laboratoire. Pour avoir plus de précision, il serait nécessaire de disposer d'un capteur de force plus sensible. Deux axes de recherche sont envisageables pour l'étude du comportement mécanique des billes d'alginate en grandes déformations : l'utilisation de solutions semi-analytiques comme le propose Y. Tatara (170; 171) dans son étude sur les sphères de caoutchouc soumises à une compression uni axiale ou bien la mise en œuvre d'un modèle numérique sous éléments finis.

Au vu des fonctions métaboliques assumées par les hépatocytes C3a encapsulés dans des billes d'alginate, l'emploi de ce dispositif en vue d'une suppléance hépatique peut être envisagé avec optimisme. Cette démarche de mise en place d'un modèle d'évaluation est rendue inévitable pour un projet aussi complexe que le foie bioartificiel devant assurer de multiples fonctions. Elle montre l'apport que peut fournir une équipe de recherche en Génie Biomédical à une approche clinique plus directe.



# Références bibliographiques

---



1. Dore, E. Conception d'un foie bioartificiel à lit fluidisé. 140 p. Thèse de doctorat : Génie biomédical : Université de Technologie de Compiègne : 1999.
2. Worobetz, L. J., Hilsden, R. J., Shaffer, E. A., Simon, J. B., Paré, P., Bain, V. G., Ma, M., Wong, F., Blendis, L., Adams, P., Heathcote, J., Lee, S. S., Lilly, L. B., Hemming, A. W., and Levy, G. A. Le Foie. In: Principes fondamentaux de gastro-entérologie, 3<sup>e</sup> édition, ed. par Association canadienne de gastro-entérologie, AstraZeneca, 2000, p. 520-629.
3. Moore, K. L. and Dalley, A. F. Anatomie médicale, 1<sup>ère</sup> édition. ed. par De Boeck & Larcier, Paris, 2001.
4. Marieb Elaine. Nutrition, métabolisme et thermorégulation. In: Anatomie et physiologie humaines, ed. par Editions du renouveau pédagogique, DeBoeck Université, Bruxelles, 1999, p 912-971.
5. Guillouzo, A. Biotransformation of drugs by Hepatocytes. In: In Vitro Methods in Pharmaceutical Research, ed. par Castell et Gomez-Lechon, Academic Press, 1997, p. 412-431.
6. Vickers, A. Experimental In Vitro Models to evaluate Hepatotoxicity. In: In Vitro Methods in Pharmaceutical Research, ed. par Castell et Gomez-Lechon, Academic Press, 1997, p.103-127.
7. Moseley, R. H. Evaluation of abnormal liver function tests. Med.Clin.North Am 1996, 80 (5) : 887-906.
8. McNair, A. N., Tibbs, C. J., and Williams, R. Hepatology 1995, 311 (7016) : 1351-1355.
9. Ministère de la santé. Hépatite B. [http://www.sante.gouv.fr/htm/actu/hepat\\_b/index.htm](http://www.sante.gouv.fr/htm/actu/hepat_b/index.htm). 2002.
10. Ministère de la santé. Hépatite C. <http://www.sante.gouv.fr/htm/pointsur/hepatitec/>. 2002.
11. Gerlach, J., Ziemer, R., and Neuhaus, P. Fulminant liver failure: relevance of extracorporeal hybrid liver support systems. Int.J.Artif Organs 1996, 19 (1) : 7-13.
12. Eguchi, S., Kamlot, A., Ljubimova, J., Hewitt, W. R., Lebow, L. T., Demetriou, A. A., and Rozga, J. Fulminant hepatic failure in rats: survival and effect on blood chemistry and liver regeneration. Hepatology 1996, 24 (6) : 1452-1459.
13. Sussman, N. L. and Kelly, J. H. Artificial liver support. Clin.Invest Med. 1996, 19 (5) : 393-399.
14. Mas, A. and Rodes, J. Fulminant hepatic failure. Lancet 1997, 349 (9058) : 1081-1085.

15. Villeneuve, J. P., Dagenais, M., Huet, P. M., Roy, A., Lapointe, R., and Marleau, D. The hepatic microcirculation in the isolated perfused human liver. *Hepatology* 1996, 23 (1) : 24-31.
16. Friedman, A.L. : Why bioartificial liver support remains the holy grail. *ASAIO J.* 1998, 241-243.
17. O'Grady, J. G., Alexander, G. J., Hayllar, K. M., and Williams, R. Early indicators of prognosis in fulminant hepatic failure. *Gastroenterology* 1989, 97 (2) : 439-445.
18. Tygstrup, N. and Ranek, L. Assessment of prognosis in fulminant hepatic failure. *Semin.Liver Dis.* 1986, 6 (2) : 129-137.
19. Hughes, R. D., Wendon, J., and Gimson, A. E. Acute liver failure. *Gut* 1991, Suppl : S86-S91.
20. Edmond, J. C., Aran, P. P., Whittington, P. F., Broelsch, C. E., and Baker, A. L. : Liver transplantation in the management of fulminant hepatic failure . *Gastroenterology* 1989, (96 ) : 1583-1588.
21. Bismuth, A., Arulnaden, J. L., Samuel, D., David, M. F., Pichon, F., Mathieu, D., Farahmand, H., Farrokhi, P., Feray, C., Brechot, C., and . Relapse prevention in liver transplant patients treated for liver involvement due to hepatitis B virus. *Rev.Fr.Transfus.Hemobiol.* 1992, 35 (2) : 107-123.
22. Iwatsuki, S., Stieber, A. C., Marsh, J. W., Tzakis, A. G., Todo, S., Koneru, B., Makowka, L., Gordon, R. D., and Starzl, T. E. Liver transplantation for fulminant hepatic failure. *Transplant.Proc.* 1989, 21 (1 Pt 2) : 2431-2434.
23. Vickers, C., Neuberger, J., Buckels, J., McMaster, P., and Elias, E. Transplantation of the liver in adults and children with fulminant hepatic failure. *J.Hepatol.* 1988, 7 (2) : 143-150.
24. Kamlot, A., Rozga, J., Watanabe, F., and Demetriou, A. A. Review : Artificial liver support systems. *Biotechnology and bioengineering* 1996, 50 : 382-391.
25. Sussman, N. L. and Lake, J. R. Treatment of hepatic failure : current concepts and progress toward liver dialysis. *Am.J.Kidney Dis.* 1996, 27 (5) : 605-621.
26. Hughes, R. D. and Williams, R. Use of bioartificial and artificial liver support devices. *Semin.Liver Dis.* 1996, 16 (4) : 435-444.
27. Matsubara, S., Okabe, K., Ouchi, K., Miyazaki, Y., Yajima, Y., Suzuki, H., Otsuki, M., and Matsuno, S. Continuous removal of middle molecules by hemofiltration in patients with acute liver failure. *Crit Care Med.* 1990, 18 (12) : 1331-1338.

28. Sarnatskaya, V. V., Nikolaev, V. G., Osipova, L. A., Ivanov, A. I., Maslenny, V. N., Ivanyuk, A. A., and Yushko, L. A. Peritoneal dialysis for the removal of protein-bound markers of hepatic insufficiency. *Artif.Organs* 1993, 17 (10) : 828-836.
29. Kondrup, J., Almdal, T., Vilstrup, H., and Tygstrup, N. High volume plasma exchange in fulminant hepatic failure. *Int.J.Artif.Organs* 1992, 15 (11) : 669-676.
30. Yoshiba, M., Sekiyama, K., Iwamura, Y., and Sugata, F. Development of reliable artificial liver support (ALS) plasma exchange in combination with hemodiafiltration using high-performance membranes. *Dig.Dis.Sci.* 1993, 38 (3) : 469-476.
31. O'Grady, J. G., Gimson, A. E., O'Brien, C. J., Pucknell, A., Hughes, R. D., and Williams, R. Controlled trials of charcoal hemoperfusion and prognostic factors in fulminant hepatic failure. *Gastroenterology* 1988, 94 (5 Pt 1) : 1186-1192.
32. Hughes, R. D., Nagaki, M., Keane, H., Sheron, N., and Williams, R. Artificial liver support in acute liver failure: a review of studies at King's. *Artif.Organs* 1992, 16 (2) : 167-170.
33. Matsushita, M. and Nose, Y. Artificial liver. *Artif.Organs* 1986, 10 (5) : 378-384.
34. Iseki, J., Touyama, K., Nakagami, K., Takagi, M., Hakamada, K., Ooba, N., and Mori, N. Plasma adsorption to charcoal and ion-exchange resin for treating postoperative hepatic failure. *Hepatogastroenterology* 1995, 42 (4) : 394-398.
35. Konstantin, P., Chang, J., Otto, V., and Brunner, G. Artificial liver. *Artif.Organs* 1992, 16 (3) : 235-242.
36. Sussman, N. L. and Kelly, J. H. Extracorporeal liver support: cell-based therapy for the failing liver. *Am.J.Kidney Dis.* 1997, 30 (5 Suppl 4) : S66-S71.
37. Hughes, R. D., Pucknell, A., Routley, D., Langley, P. G., Wendon, J. A., and Williams, R. Evaluation of the BioLogic-DT sorbent-suspension dialyser in patients with fulminant hepatic failure. *Int.J.Artif.Organs* 1994, 17 (12) : 657-662.
38. Stange, J. and Mitzner, S. A carrier-mediated transport of toxins in a hybrid membrane. Safety barrier between a patients blood and a bioartificial liver. *Int.J.Artif.Organs* 1996, 19 (11) : 677-691.
39. Benoist, S., Sarkis, R., Chafai, N., Barbu, V., Honiger, J., Lakehal, F., Becquemont, L., Baudrimont, M., Capeau, J., Housset, C., and Nordlinger, B. Survival and differentiation of porcine hepatocytes encapsulated by semiautomatic device and allotransplanted in large number without immunosuppression. *J Hepatol.* 2001, 35 (2) : 208-216.
40. Benoist, S., Sarkis, R., Barbu, V., Honiger, J., Baudrimont, M., Lakehal, F., Becquemont, L., Delelo, R., Housset, C., Ballardur, P., Capeau, J., and Nordlinger, B.

Survival and functions of encapsulated porcine hepatocytes after allotransplantation or xenotransplantation without immunosuppression. *Surgery* 2001, 129 (5) : 606-616.

41. Sorrentino, F. Prime ricerche per la realizzazione di un fegato artificiale. *Chir Patol Sper* 1956, (4) : 1401-1414.
42. Nose, Y., Mikami, J., and Kasai, S. An experimental artificial liver utilizing extracorporeal metabolism with slices or granulated canine liver. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 1963, 9 (358) : 362.
43. Wolf, C. F. W. and Munkelt, B. E. : Bilirubin conjugation by an artificial liver composed of cultured cells and synthetic capillaries. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 1975, (21) : 16-27.
44. Matsumura, K. N., Guevera, G. R., Huston H., Hamilton, W. L., and Rikimaru, M. Hybrid bioartificial liver in hepatic failure: Preliminary clinical report. *Surgery* 1987, (101) : 99-103.
45. Margulis, M. S., Erukhimov, E. A., Andreiman, L. A., and Viksna, L. M. Temporary organ substitution by hemoperfusion through suspension of active donor hepatocytes in a total complex of intensive therapy in patients with acute hepatic insufficiency. *Resuscitation* 1989, 18 (1) : 85-94.
46. Legallais, C., David, B, and Dore, E. Bioartificial liver (BAL): current technological aspects and future developments. *Journal of Membrane Science* 2001, (181) : 81-95.
47. Patzer, J. F., Mazariegos, G. V., Lopez, R., Molmenti, E., Gerber, D., Riddervold, F., Khanna, A., Yin, W. Y., Chen, Y., Scott, V. L., Aggarwal, S., Kramer, D. J., Wagner, R. A., Zhu, Y., Fulmer, M. L., Block, G. D., and Amiot, B. P. Novel bioartificial liver support system: preclinical evaluation. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1999, 875 : 340-352.
48. Sussman, N. L., Gislason, G. T., and Kelly, J. H. Extracorporeal liver support. Application to fulminant hepatic failure. *J.Clin.Gastroenterol.* 1994, 18 (4) : 320-324.
49. Nyberg, S. L., shatford, R. A, Peshwa, M. V., white, J. G., Cerra, F. B., and Wei-Shou Hu. Evaluation of a hepatocyte-Entrapment Hollow fiber bioreactor : A potential bioartificial Liver. *Biotechnology and bioengineering* 1993, 41 : 194-203.
50. Nyberg, S. L. and Misra, S. P. Hepatocyte liver assist systems a clinical update. *Mayo Clin.Proc.* 1998, 73 (8) : 765-771.
51. Gerlach, J. C., Encke, J., Hole, O., Muller, C., Courtney, J. M., and Neuhaus, P. Hepatocyte culture between three dimensionally arranged biomatrix- coated independent artificial capillary systems and sinusoidal endothelial cell co-culture compartments. *Int.J.Artif.Organs* 1994, 17 (5) : 301-306.

52. Gerlach, J. C. Development of a hybrid liver support system: a review. *Int.J.Artif.Organs* 1996, 19 (11) : 645-654.
53. Bader, A., Knop, E., Boker, K., Fruhauf, N., Schuttler, W., Oldhafer, K., Burkhard, R., Pichlmayr, R., and Sewing, K. F. A novel bioreactor design for in vitro reconstruction of in vivo liver characteristics. *Artif.Organs* 1995, 19 (4) : 368-374.
54. Uludag, H., De Vos, P., and Tresco, P. A. Technology of mammalian cell encapsulation. *Adv.Drug Deliv.Rev.* 2000, 42 (1-2) : 29-64.
55. Poncelet.D., Poncelet.B., Smet, D., Beaulieu, C., and Neufeld, R. J. Scale-up of gel bead and microcapsule production in cell immobilization. 1993, 113-142.
56. Brandenberger, H. and Widner, F. A new multinozzle encapsulation/immobilization system to produce uniform beads or alginates. *J.Biotechnol* 1998, (63) : 73-80.
57. De Vos, P., De Haan, B. J., and Van Schilfgaarde, R. Upscaling the production of microencapsulated pancreatic islets. *Biomaterials* 1997, 18 (16) : 1085-1090.
58. Quong, D. and Neufeld, R. J. DNA encapsulation within co-guanidine membrane coated alginate beads and protection from extracapsular nuclease. *J.Microencapsul.* 1999, 16 (5) : 573-585.
59. Ribeiro, A. J., Neufeld, R. J., Arnaud, P., and Chaumeil, J. C. Microencapsulation of lipophilic drugs in chitosan-coated alginate microspheres. *Int.J Pharm.* 30-9-1999, 187 (1) : 115-123.
60. Wu, Z. G., Shi, Z. Q., Lu, Z. N., Yang, H., Shi, F. Y., Zheng, X. R., and Sun, A. M. In vitro culture and transplantation of encapsulated human fetal islets as an artificial endocrine pancreas. *ASAIO Trans* 1989, 35 (3) : 736-738.
61. Gin, H., Dupuy, B., Baquey, C., Ducassou, D., and Aubertin, J. Agarose encapsulation of islets of Langerhans: reduced toxicity in vitro. *J Microencapsul.* 1987, 4 (3) : 239-242.
62. Dixit, V. Development of a bioartificial liver using isolated hepatocytes. *Artif.Organs* 1994, 18 (5) : 371-384.
63. Dixit, V. and Gitnick, G. Artificial liver support: state of the art. *Scand.J.Gastroenterol.Suppl* 1996, 220 : 101-114.
64. Dixit, V. and Gitnick, G. The bioartificial liver: state-of-the-art. *Eur.J.Surg.Suppl* 1998, (582) : 71-76.
65. Shiraha, H., Koide, N., Hada, H., Ujike, K., Nakamura, M., Shinji, T., Gotoh, S., and Tsuji, T. Improvement of serum amino acid profile in hepatic failure with the

- bioartificial liver using multicellular hepatocyte spheroids. *Biotechnology and bioengineering* 1996, 50 : 416-421.
66. Fremond, B., Malandain, C., Guyomard, C., Chesne, C., Guillouzo, A., and Campion, J. P. Correction of bilirubin conjugation in the Gunn rat using hepatocytes immobilized in alginate gel beads as an extracorporeal bioartificial liver. *Cell Transplant.* 1993, 2 (6) : 453-460.
  67. Dore, E. and Legallais, C. A new concept of bioartificial liver based on a fluidized bed bioreactor. *Ther.Apher.* 1999, 3 (3) : 264-267.
  68. Brissova, M., Lacik, I., Powers, A. C., Anilkumar, A. V., and Wang, T. Control and measurement of permeability for design of microcapsule cell delivery system. *J Biomed.Mater.Res.* 1998, 39 (1) : 61-70.
  69. Lewinska, D., Rosinski, S., Hunkeler, D., Poncelet, D., and Werynski, A. Mass transfer coefficient in characterization of gel beads and microcapsules. *Journal of Membrane Science* 2002, (209) : 533-540.
  70. Crooks, C. A., Douglas, J. A., Broughton, R. L., and Sefton, M. V. Microencapsulation of mammalian cells in a HEMA-MMA copolymer: effects on capsule morphology and permeability. *J Biomed.Mater.Res.* 1990, 24 (9) : 1241-1262.
  71. Halle, J. P., Leblond, F. A., Landry, D., Fournier, A., and Chevalier, S. Studies of 300-microns microcapsules: I. Use of arginine esterase release by microencapsulated prostatic cells as a measure of membrane permeability. *Transplant.Proc.* 1992, 24 (6) : 2930-2932.
  72. Uludag, H. and Sefton, M. V. Microencapsulated human hepatoma (HepG2) cells: in vitro growth and protein release. *J Biomed.Mater.Res.* 1993, 27 (10) : 1213-1224.
  73. Uludag, H., Hwang, J. and Sefton, M. V. Microencapsulated human hepatoma (HepG2) cells: capsule-to-capsule variation in protein secretion and permeability. *J.Control.Release* 1995, ( 33) : 273-283.
  74. Loudovaris, T., Charlton, B., Hodgson, R. J., and Mandel, T. E. Destruction of xenografts but not allografts within cell impermeable membranes. *Transplant.Proc.* 1992, 24 (5) : 2291-2292.
  75. Brauker, J., Martinson, L. A., Young, S. K., and Johnson, R. C. Local inflammatory response around diffusion chambers containing xenografts. Nonspecific destruction of tissues and decreased local vascularization. *Transplantation* 1996, 61 (12) : 1671-1677.
  76. Roitt, Brostoff, and Male. *Transplantation et réaction de rejet.* In: *Immunologie*, ed. par De Boeck-Wesmael, Bruxelles, 1994, 3 (23), p. 1-14.

77. Zekorn, T., Siebers, U., Bretzel, R. G., Renardy, M., Planck, H., Zschocke, P., and Federlin, K. Protection of islets of Langerhans from interleukin-1 toxicity by artificial membranes. *Transplantation* 1990, 50 (3) : 391-394.
78. Cole, D. R., Waterfall, M., McIntyre, M., and Baird, J. D. Microencapsulated islet grafts in the BB/E rat: a possible role for cytokines in graft failure. *Diabetologia* 1992, 35 (3) : 231-237.
79. Darquy, S., Pueyo, M. E., Capron, F., and Reach, G. Complement activation by alginate-polylysine microcapsules used for islet transplantation. *Artif Organs* 1994, 18 (12) : 898-903.
80. Tse, M., Uludag, H., and Sefton, M. V. Secretion of recombinant proteins from hydroxyethyl methacrylate-methyl methacrylate capsules. *Biotechnol. Bioeng.* 1996, (51) : 271-280.
81. Iwata, H., Morikawa, N., Fujii, T., Takagi, T., Samejima, T. and Ikada, Y. Does immunoisolation need to prevent the passage of antibodies and complements ? *Transplant. Proc.* 1995, 27 (6) : 3224-3226.
82. Hagihara, Y., Saitoh, Y., Iwata, H., Taki, T., Hirano, S., Arita, N., and Hayakawa, T. Transplantation of xenogeneic cells secreting beta-endorphin for pain treatment: analysis of the ability of components of complement to penetrate through polymer capsules. *Cell Transplant.* 1997, 6 (5) : 527-530.
83. Zekorn, T., Endl, U., Horcher, A., Siebers, U., Bretzel, R. G., and Federlin, K. Mixed lymphocyte islet culture for assessment of immunoprotection by islet microencapsulation. *Transplant. Proc.* 1995, 27 (6) : 3362-3363.
84. Koo, J. and Chang, T. M. Secretion of erythropoietin from microencapsulated rat kidney cells: preliminary results. *Int. J Artif Organs* 1993, 16 (7) : 557-560.
85. Liu, H. W., Ofose, F. A., and Chang, P. L. Expression of human factor IX by microencapsulated recombinant fibroblasts. *Hum. Gene Ther.* 1993, 4 (3) : 291-301.
86. Cieslinski, D. A. and Humes, H. D. Tissue engineering of a bioartificial kidney. *Biotechnol. Bioeng.* 2002, (43) : 678-681.
87. Chang, T. M. Hybrid artificial cells: microencapsulation of living cells. *ASAIO J* 1992, 38 (2) : 128-130.
88. Aebischer, P., Goddard, M., Signore, A. P., and Timpson, R. L. Functional recovery in hemiparkinsonian primates transplanted with polymer-encapsulated PC12 cells. *Exp. Neurol.* 1994, 126 (2) : 151-158.
89. Pronova. General Technical Information I. Alginate application 2000.

90. Pronova. General Technical information II. Alginate application 2000.
91. Garçon, N. L'encapsulation des vaccins, une voie d'avenir. *Biofutur mars* 1994, 31-32.
92. Strullu, D.G. and Plenchette, C. Encapsulation de mycorhizes. *Biofutur mars* 1994, 35-36.
93. Soon-Shiong, P. Treatment of type I diabetes using encapsulated islets. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1999, 35 (2-3) : 259-270.
94. Matthew, H. W., Salley, S. O., Peterson, W. D., and Klein, M. D. Complex coacervate microcapsules for mammalian cell culture and artificial organ development. *Biotechnol Prog.* 1993, 9 (5) : 510-519.
95. Lee, C. S. and Chu, I. M. Characterization of modified alginate-poly-L-lysine microcapsules. *Artif Organs* 1997, 21 (9) : 1002-1006.
96. Hsu, H. C. and Chu, I. M. Poly(ethyleneimine)-reinforced liquid-core capsules for the cultivation of hybridoma cells. *Biotechnol. Bioeng.* 1992, (40) : 1300-1308.
97. Levey, R. H., Trainin, N. and Law, L. W. Evidence for function of thymic tissue in diffusion chambers implanted in neonatally thymectomized mice. *J. Natl. Cancer Inst* 1963, (31) : 199-217.
98. Lacik, I., Brissova, M., Anilkumar, A. V., Powers, A. C., and Wang, T. New capsule with tailored properties for the encapsulation of living cells. *J Biomed. Mater. Res.* 1998, 39 (1) : 52-60.
99. Peirone, M., Ross, C. J., Hortelano, G., Brash, J. L., and Chang, P. L. Encapsulation of various recombinant mammalian cell types in different alginate microcapsules. *J Biomed. Mater. Res.* 1998, 42 (4) : 587-596.
100. Leblond, F. A., Tessier, J. and Halle, J. P. Quantitative method for the evaluation of biomicrocapsule resistance to mechanical stress. *Biomaterials* 1996, 17 (21) : 2097-2102.
101. Williams, D. F. Summary and définitions. In: *Progress in Biomedical Engineering: Definition in Biomateriels*, ed. Par Elsevier, Amsterdam, 1987, p. 66-71
102. Rihova, B. Immunocompatibility and biocompatibility of cell delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 20-8-2000, 42 (1-2) : 65-80.
103. Mikos, A. G., McIntire, L. V., Anderson, J. M. and Babensee, J. E. Host response to tissue engineered devices. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1998, 33 (1-2) : 111-139.

104. De Vos, P., De Haan, B., Wolters, G. H., and Van Schilfgaarde, R. Factors influencing the adequacy of microencapsulation of rat pancreatic islets. *Transplantation* 1996, 62 (7) : 888-893.
105. De Vos, P., De Haan, B., Pater, J., and Van Schilfgaarde, R. Association between capsule diameter, adequacy of encapsulation, and survival of microencapsulated rat islet allografts. *Transplantation* 1996, 62 (7) : 893-899.
106. Shimi, S. M., Hopwood, D., Newman, E. L., and Cuschieri, A. Microencapsulation of human cells: its effects on growth of normal and tumour cells in vitro. *Br.J Cancer* 1991, 63 (5) : 675-680.
107. Chang, P. L., Hortelano, M., Tse, M. and Awrey, D. E. Growth of recombinant fibroblasts in alginate microcapsules. *Biotechnol.Bioeng.* 1994, (43) : 925-933.
108. Clement, B., Desille, M., Fremond, B., Champion, J. P., Guguen-Guillouzo, C., Bourel, M., and Guillouzo, A. [Hepatocytes in cell therapy]. *Transfus.Clin.Biol.* 1998, 5 (1) : 80-87.
109. ISO 10993-5 : Norme internationale. 1992.
110. Groth, T., Falck, P. and Miethke, R. R. Cytotoxicity of biomaterials-basic mechanism and in vitro test methods: a review. *ATLA* 2002, (23) : 790-799.
111. Rabinovitch, A. An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev.* 1998, 14 (2) : 129-151.
112. Kulseng, B., Skjak-Braek, G., Folling, I., and Espevik, T. TNF production from peripheral blood mononuclear cells in diabetic patients after stimulation with alginate and lipopolysaccharide. *Scand.J Immunol.* 1996, 43 (3) : 335-340.
113. Park, J. B. Biomaterials. In: *The biomedical engineering handbook*, ed. par Bronzino J.D, CRC Press, Boca Raton, 1995, p. 530-536.
114. De Vos, P., De Haan, B. J., Wolters, G. H., Strubbe, J. H., and Van Schilfgaarde, R. Improved biocompatibility but limited graft survival after purification of alginate for microencapsulation of pancreatic islets. *Diabetologia* 1997, 40 (3) : 262-270.
115. Klock, G., Frank, H., Houben, R., Zekorn, T., Horcher, A., Siebers, U., Wohrle, M., Federlin, K., and Zimmermann, U. Production of purified alginates suitable for use in immunisolated transplantation. *Appl.Microbiol.Biotechnol* 1994, 40 (5) : 638-643.
116. Prévost, H., Cachon, R., Cavin, J.F. and Divies, C. Les microorganismes immobilisés et l'industrie alimentaire. *Biofutur mars* 1994, 42-45.

117. Mikkelsen Arne and Elgsaeter Arnljot. Density distribution of calcium-induced alginate gels. A numerical study. *biopolymers* 1995, 36 : 17-41.
118. Lévy, M.C. and Poncelet, D. Bio-encapsulation, les technologies. *Biofutur mars* 1994, 16-21.
119. Magdalou, J. and Siest, G. Billes d'alginate et microsomes. *Biofutur mars* 1994, 33-34.
120. Martinsen, A., Skjak-Braek, G., and Smidsrod, O. : Alginate as immobilization material: I. Correlation between chemical and Physical properties of alginate gel beads. *Biotechnology and bioengineering* 1989, 33 : 79-89.
121. Yamagiwa, Kozawa, and Ohkawa. Effect of alginate composition and gelling conditions on diffusional and mechanical properties of calcium alginate gel beads. *Journal Of Chemical Engineering Of Japan* 1995, 28 (4) : 462-467.
122. Martinsen, A., Storro, I., and Skjak-Braek, G. Alginate as immobilization material: III. Diffusional properties. *Biotechnology and bioengineering* 1992, 39 : 186-194.
123. Thu, B., Bruheim, P., Espevik, T., Smidsrod, O., Soon-Shiong, P., and Skjak-Braek, G. Alginate polycation microcapsules. II. Some functional properties. *Biomaterials* 1996, 17 (11) : 1069-1079.
124. Ogbonna, J.C., Matsumura, M., and Kataoka, H. Effective oxygenation of immobilized cells through reduction in bead diameters : A review. *Proces Biochemistry* 1991, 26 : 109-121.
125. Barbotin, J. N. Comportement physiologique et stabilité des cellules immobilisées. *Biofutur mars* 1994, 22-27.
126. Bascoul, Couderc and Delmas. Mouvement des particules solides en fluidisation liquide solide. *The Chemical engineering journal* 1993, (51) : 135-150.
127. Bascoul, Riba, Alran and Couderc. Influence de la distribution du liquide sur le coefficient de dispersion axiale en fluidisation liquide solide. *The Chemical engineering journal* 1988, (38) : 69-79.
128. Bascoul, Delmas and Couderc. Caractéristique hydrodynamique de la fluidisation liquide solide: influence du distributeur. *The Chemical engineering journal* 1988, (37) : 11-24.
129. Stange, J. and Mitzner, S. Cell sources for bioartificial liver support. *Int.J.Artif.Organs* 1996, 19 (1) : 14-17.
130. Jauregui, H. O., Chowdhury, N. R., and Chowdhury, J. R. Use of mammalian liver cells for artificial liver support. *Cell Transplant.* 1996, 5 (3) : 353-367.

131. te Velde, A. A., Flendrig, L. M., Ladiges, N. C., and Chamuleau, R. A. Possible immunological problems of bioartificial liver support [editorial]. *Int.J.Artif.Organs* 1997, 20 (8) : 418-421.
132. Bornemann, R., Smith, M. D., and Gerlach, J. C. Consideration of potential immunological problems in the application of xenogenic hybrid liver support. *Int.J.Artif.Organs* 1996, 19 (11) : 655-663.
133. Gislason, G. T., Lobdell, D. D., Kelly, J. H., and Sussman, N. L. A treatment system for implementing an extracorporeal liver assist device. *Artif.Organs* 1994, 18 (5) : 385-389.
134. Jauregui, H. O. The technology of biological extracorporeal liver assist devices: from infancy to adolescence. *Artif.Organs* 1997, 21 (11) : 1163-1168.
135. Mickelson, J. K., Kukielka, G., Bravenec, J. S., Mainolfi, E., Rothlein, R., Hawkins, H. K., Kelly, J. H., and Smith, C. W. Differential expression and release of CD54 induced by cytokines. *Hepatology* 1995, 22 (3) : 866-875.
136. Kelly, J. H., Koussayer, T., He, D., Chong, M. G., Shang, T. A., Whisennand, H. H., and Sussman, N. L. Assessment of an extracorporeal liver assist device in anhepatic dogs. *Artif.Organs* 1992, 16 (4) : 418-422.
137. Fry, J. R. and Hammond, A. H. Assesment of the functional integrity of hepatocytes:a brief review. *ATLA* 1993, (21) : 324-329.
138. Flendrig, L. M., Sommeijer, D., Ladiges, N. C., te Velde, A. A., Maas, M. A., Jorning, G. G., Daalhuisen, J., and Chamuleau, R. A. Commercially available media for flushing extracorporeal bioartificial liver systems prior to connection to the patient's circulation: an in vitro comparative study in two and three dimensional porcine hepatocyte cultures. *Int.J.Artif.Organs* 1998, 21 (8) : 467-472.
139. Iwata, H., Sajiki, T., Maeda, H., Park, Y. G., Zhu, B., Satoh, S., Uesugi, T., Ikai, I., Yamaoka, Y., and Ikada, Y. In vitro evaluation of metabolic functions of a bioartificial liver. *ASAIO J.* 1999, 45 (4) : 299-306.
140. Eguchi, S., Kawazoe, Y., Sugiyama, N., Kawashita, Y., Fujioka, H., Furui, J., and Kanematsu, T. Effects of anticoagulants on porcine hepatocytes in vitro: implications in the porcine hepatocyte-based bioartificial liver. *Int.J.Artif.Organs* 1999, 22 (5) : 329-333.
141. Elcin, Y. M., Dixit, V., and Gitnick, G. Hepatocyte attachment on biodegradable modified chitosan membranes: in vitro evaluation for the development of liver organoids. *Artif.Organs* 1998, 22 (10) : 837-846.
142. Lorenti, A., Barbich, M., Hidalgo, A., Hyon, S. H., Sorroche, P., Guinle, A., Schenone, A., Chamoles, N., and Argibay, P. Culture of porcine hepatocytes: the dogma of exogenous matrix revisited. *Artif.Organs* 2001, 25 (7) : 546-550.

143. Wu, F. J., Friend, P. J., Lazar, A., Mann, H. J., Rimmel, R. P., Cerra, F. B., and Wei-Shou Hu. Hollow fiber bioartificial liver utilizing collagen-entrapped porcine hepatocyte spheroids. *Biotechnology and bioengineering* 1996, 52 : 34-44.
144. Catapano, G., De Bartolo, L., Lombardi, C. P., and Drioli, E. The effect of oxygen transport resistances on the viability and functions of isolated rat hepatocytes. *Int.J.Artif.Organs* 1996, 19 (1) : 61-71.
145. Weil, J. H. : Métabolisme des composés azotés. In : *Biochimie générale* 6<sup>e</sup> édition, ed. par Masson, Paris, 1990, p 413-463.
146. Hubel, A., Conroy, M., and Darr, T. B. Influence of preculture on the prefreeze and postthaw characteristics of hepatocytes. *Biotechnol.Bioeng.* 2000, 71 (3) : 173-183.
147. Schapira, G : *Biochimie du plasma et du sérum*. In : *Eléments de biochimie clinique et physiologie*, ed. par Flammarion, Paris, 1981, p 9-115.
148. Joly, A., Desjardins, J. F., Fremond, B., Desille, M., Campion, J. P., Malledant, Y., Lebreton, Y., Semana, G., Edwards-Levy, F., Levy, M. C., and Clement, B. Survival, proliferation, and functions of porcine hepatocytes encapsulated in coated alginate beads: a step toward a reliable bioartificial liver. *Transplantation* 27-3-1997, 63 (6) : 795-803.
149. Tanaka, H., Matsumura, M., and Veliky, I.A. Diffusion characteristics of substrates in Ca-Alginate gel beads. *Biotechnology and bioengineering* 1984, 26 : 53-58.
150. Yagi, K., Tsuda, K., Serada, M., Yamada, C., Kondoh, A., and Miura, Y. Rapid formation of multicellular spheroids of adult rat hepatocytes by rotation culture and their immobilization within calcium alginate. *Artif Organs* 1993, 17 (11) : 929-934.
151. Langsch, A. and Bader, A. Longterm stability of phase I and phase II enzymes of porcine liver cells in flat membrane bioreactors. *Biotechnol.Bioeng.* 2001, 76 (2) : 115-125.
152. Bissell, D. M., Caron, J. M., Babiss, L. E., and Friedman, J. M. Transcriptional regulation of the albumin gene in cultured rat hepatocytes. Role of basement-membrane matrix. *Mol.Biol.Med.* 1990, 7 (2) : 187-197.
153. Tagaki, M., Fukuda, N., and Yoshida, T. Comparison of different hepatocyte cell lines for use in a hybrid artificial liver module. *Cytotechnology* 1997, (24) : 39-45.
154. Tavill, A. S. and McCullough, A. J. Protein metabolism and the liver. In : *Wright's liver and biliary disease* 3<sup>em</sup> édition. ed. par Millward-Sadler, London, 1992, p 92.
155. Depner, T. A. Urea metabolism : clinical chemistry of urea. In: *Prescribing hemodialysis, a guide to Urea modelling*, ed. par Kluwer Academic, Boston, 1991, p 30-31.

156. Vilei, M. T., Granato, A., Ferrareso, C., Neri, D., Carraro, P., Gerunda, G., and Muraca, M. Comparison of pig, human and rat hepatocytes as a source of liver specific metabolic functions in culture systems--implications for use in bioartificial liver devices. *Int.J.Artif.Organs* 2001, 24 (6) : 392-396.
157. Yoon, J. H., Lee, H. V., Lee, J. S., Park, J. B., and Kim, C. Y. Development of a non-transformed human liver cell line with differentiated-hepatocyte and urea-synthetic functions: applicable for bioartificial liver. *Int.J.Artif.Organs* 1999, 22 (11) : 769-777.
158. Khalil, M., Shariat-Panahi, A., Tootle, R., Ryder, T., McCloskey, P., Roberts, E., Hodgson, H., and Selden, C. Human hepatocyte cell lines proliferating as cohesive spheroid colonies in alginate markedly upregulate both synthetic and detoxificatory liver function. *J.Hepatol.* 2001, 34 (1) : 68-77.
159. Morsiani, E., Brogli, M., Galavotti, D., Bellini, T., Ricci, D., Pazzi, P., and Puviani, A. C. Long-term expression of highly differentiated functions by isolated porcine hepatocytes perfused in a radial-flow bioreactor. *Artif Organs* 2001, 25 (9) : 740-748.
160. Fukuda, J., Sakiyama, R., Nakazawa, K., Ijima, H., Yamashita, Y., Shimada, M., Shirabe, K., Tsujita, E., Sugimachi, K., and Funatsu, K. Mass preparation of primary porcine hepatocytes and the design of a hybrid artificial liver module using spheroid culture for a clinical trial. *Int.J Artif Organs* 2001, 24 (11) : 799-806.
161. Bader, A., De Bartolo, L., and Haverich, A. High level benzodiazepine and ammonia clearance by flat membrane bioreactors with porcine liver cells. *J.Biotechnol.* 25-8-2000, 81 (2-3) : 95-105.
162. Hwang, Y. J., Kim, Y. I., Lee, J. G., Lee, J. W., Kim, J. W., and Chung, J. M. Development of bioartificial liver system using a fluidized-bed bioreactor. *Transplant.Proc.* 2000, 32 (7) : 2349-2351.
163. Funatsu, K., Ijima, H., Nakazawa, K., Yamashita, Y., Shimada, M., and Sugimachi, K. Hybrid artificial liver using hepatocyte organoid culture. *Artif.Organs* 2001, 25 (3) : 194-200.
164. Glicklis, R., Shapiro, L., Agbaria, R., Merchuk, J. C., and Cohen, S. Hepatocyte behavior within three-dimensional porous alginate scaffolds. *Biotechnol.Bioeng.* 5-2-2000, 67 (3) : 344-353.
165. Canaple, L., Nurdin, N., Angelova, N., Saugy, D., Hunkeler, D., and Desvergne, B. Maintenance of primary murine hepatocyte functions in multicomponent polymer capsules in vitro cryopreservation studies. *J.Hepatol.* 2001, 34 (1) : 11-18.
166. Krasteva, N., Harms, U., Albrecht, W., Seifert, B., Hopp, M., Altankov, G., and Groth, T. Membranes for biohybrid liver support systems investigations on hepatocyte attachment, morphology and growth. *Biomaterials* 2002, 23 (12) : 2467-2478.

167. Hertz, H. *Über die berührung fester elastischer Körper (On the contact of rigid elastic solids)*, 1896, p 156-171.
168. Knaebel, A. and Rebre, S. R. Determination of the elastic modulus of superabsorbent gel beads. *Polymer Gels and Networks* 1997, (5) : 107-121.
169. Knaebel, A. and Lequeux, F. Force relaxation of single spherical gel beads under compression. *Polymer Gels and Networks* 1997, (5) : 577-587.
170. Tatara, Y. Large deformations of a rubber sphere under diametral compression (Part 1: Theoretical analysis of press approach, contact radius and lateral extension). *JSME Int.J* 1993, 36 (334) : 190-196.
171. Tatara, Y., Shima, S., Iio, M., Shu, C., and Lucero, J. C. Large deformations of a rubber sphere under diametral compression (Part 2: Experiments on many rubber materials and comparison of theories with experiments). *JSME Int.J* 1993, 36 (334) : 197-205.
172. Rosinski, S., Grigorescu, G., Lewinska, D. Characterization of microcapsules :recommended methods based on round-robin testing. *J.microencapsulation*, 2002, 19 (5): 641-659.
173. Zhang, Z., Saunders, R., Thomas,C.R. Mechanical strength of single microcapsules determined by a novel micromanipulation technique. *J.microencapsulation*, 1999, 16 (1): 117-124.
174. Sun, G., Zhang, Z. Mechanical strength of microcapsules made of different wall materials. *International Journal of Pharmaceutics*, 2002, 242: 307-311.
175. Legallais, C., Doré, E., Paullier, P. Design of a Fluidized Bed Bioartificial Liver. *Artificial Organs*, 2000, 24 (7): 519-525.
176. Desille, M., Frémond, B., Desbois, J., Clément, B. Bioartificial liver containing hepatocytes embedded within beads for the treatment of acute liver failure. The Eighthth International Workshop on Bioencapsulation, Abstract, Trondheim, Norway, 13-15 September.
177. Poncelet, D., Bertrand, Y., Dhellem, C., Jacquot, M., Dulieu, C. Polyelectrolyte complex microcapsules and their mechanical resistance evaluation. The Eighthth International Workshop on Bioencapsulation, Abstract, Trondheim, Norway, 13-15 September.
178. Melvik, J.E., Skjak-Braek, G., Gaserod, O. Different parameters influencing the alginate bead size by use of an electrostatic bead generator. The Eighthth International Workshop on Bioencapsulation, Abstract, Trondheim, Norway, 13-15 September.
179. Poncelet, D., Chen, Y. Overview: “Methods for the encapsulation of neutraceuticals”. BRG Forum, BRG.enitiaa-nantes.fr.
180. Société Inotech. Principe de l'« Encapsulator ». <http://www.inotech.ch/products.htm>

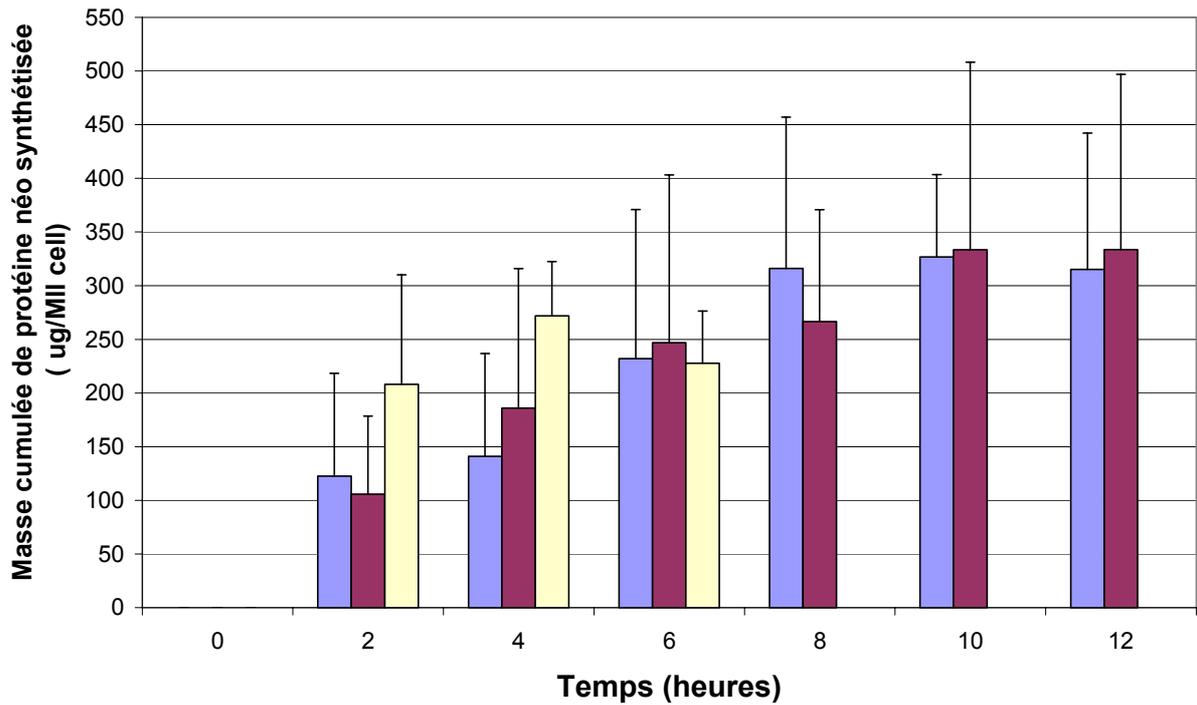
181. PruBe, U., Dalluhn, J., Sonnenburg, R., Breford, J., Vorlop, K-D. Scale-up strategies for bead production by jet cutting. The Eighth International Workshop on Bioencapsulation, Abstract, Trondheim, Norway, 13-15 September.
182. Société GenialLab. Principe du "JetCutter". <http://www.genialab.de/1.htm>
183. Melcion, J-P. <http://www.inra.fr/productions-animales/an2000/num202/melcion/jm202.htm>. La granulométrie de l'aliment : principe, mesure et obtention. INRA Prod. Anim, 2000, 12 : 81-97.
184. Briscoe, B.J., Liu, K.K, Williams, D.R. Adhesive contact deformation of a single microelastomeric sphere. Journal of colloid and interface science. 1998, 200: 256-264.
185. David, B. Foie bioartificiel : Effets du plasma sur le comportement des billes d'alginate en lit fluidisé. DEA Génie Biomédical Université de Technologie de Compiègne, 1999.
186. Midoux N. Les écoulements diphasiques. Chapitre IV : les écoulements dans les lits fluidisés. *Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques*.
187. Shakourzadeh K. Calcul des réacteurs à lits fluidisés. *Techniques de l'Ingénieur, traité de Génie des procédés J4100* : 1-15.
188. Brandani S et Foscolo PU. Analysis of discontinuities arising from the one-dimensional equations of change for fluidization. *Chem Eng Sci* 49 : 611-619, 1994.
189. Hartman M, Beran Z, Svoboda K et Vesely V. Operation regimes of fluidized beds. *Collect Czech Chem Commun* 60 : 1-33, 1995.
190. Kunii D et Levenspiel O. Fluidization Engineering, 2<sup>nd</sup> edition. *Edition Butterworth-Heinemann*, 1991.
191. Broadhurst TE et Becker HA. Onset of fluidization and slugging in beds of uniform particles. *AIChE Journal* 21 : 238-245, 1975.
192. Geldart D. Gas Fluidization Technology. *Edition Wiley, N Y*, 1986.
193. Hartman M, Trnka O et Svoboda K. Free settling of nonspherical particles. *Ind Eng Chem Research* 33 : 1979-1983, 1994.
194. Garside J et Al-Dibouni MR. Velocity-voidage relationships for fluidization and sedimentation in solid-liquid systems. *Ind Eng Chem Process Des Dev* 16 (2) : 206-214, 1977.
195. Haider A et Levenspiel O. Drag coefficient and terminal velocity of spherical and non spherical particles. *Powder Technol* 58 : 63-70, 1989.
196. Richardson JF et Zaki WN. Sedimentation and fluidization. *Trans Inst Chem Eng* 32 : 35, 1954.

197. Ganguly UP. Direct method for the prediction of expanded bed height in liquid-solid fluidization. *Can J Chem Eng* 58 : 559-563, 1980.
198. Hirata A et Bulos FB. Predicting bed voidage in solid-liquid fluidization. *J Chem Eng Japan* 23 (5) : 599-604, 1990.
199. Foscolo PU, Gibilaro LG et Waldram SP. A unified model for particulate expansion of fluidized beds and flow in fixed porous media. *Chem Eng Sci* 38 (8), 1251-1260, 1983.
200. Seibert KD et Burns MA. Simulation of fluidized beds and other fluid-particle systems using statistical mechanics. *AIChE J* 42 (3) : 660-670, 1996.
201. Hennen, G. Biochimie humaine : Introduction biochimique à la médecine interne, DeBoeck Université, Bruxelles, 1996, p500

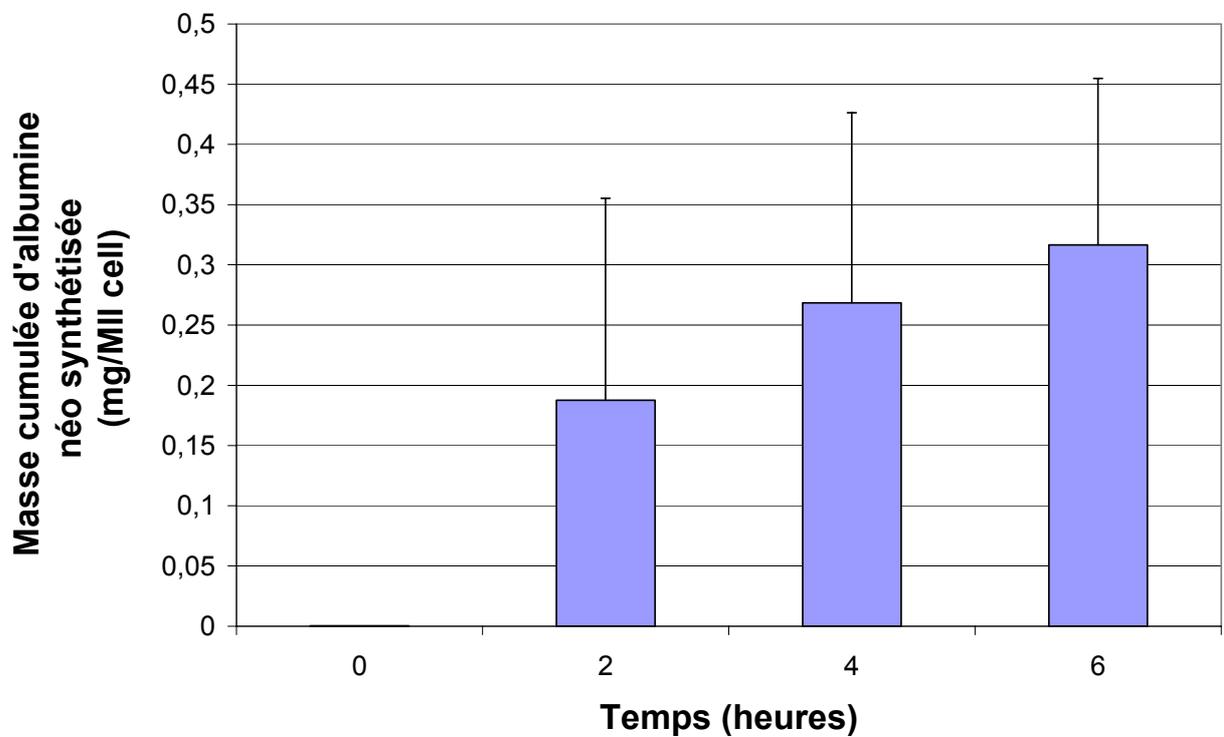
# Annexes

---

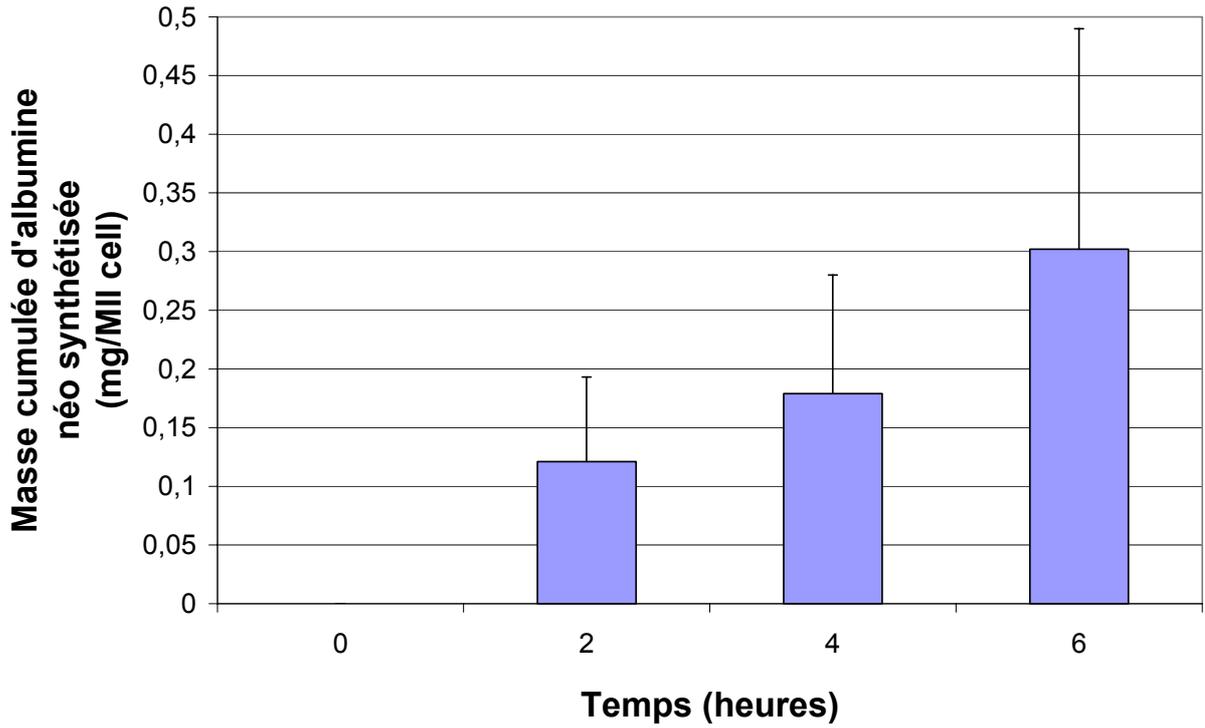




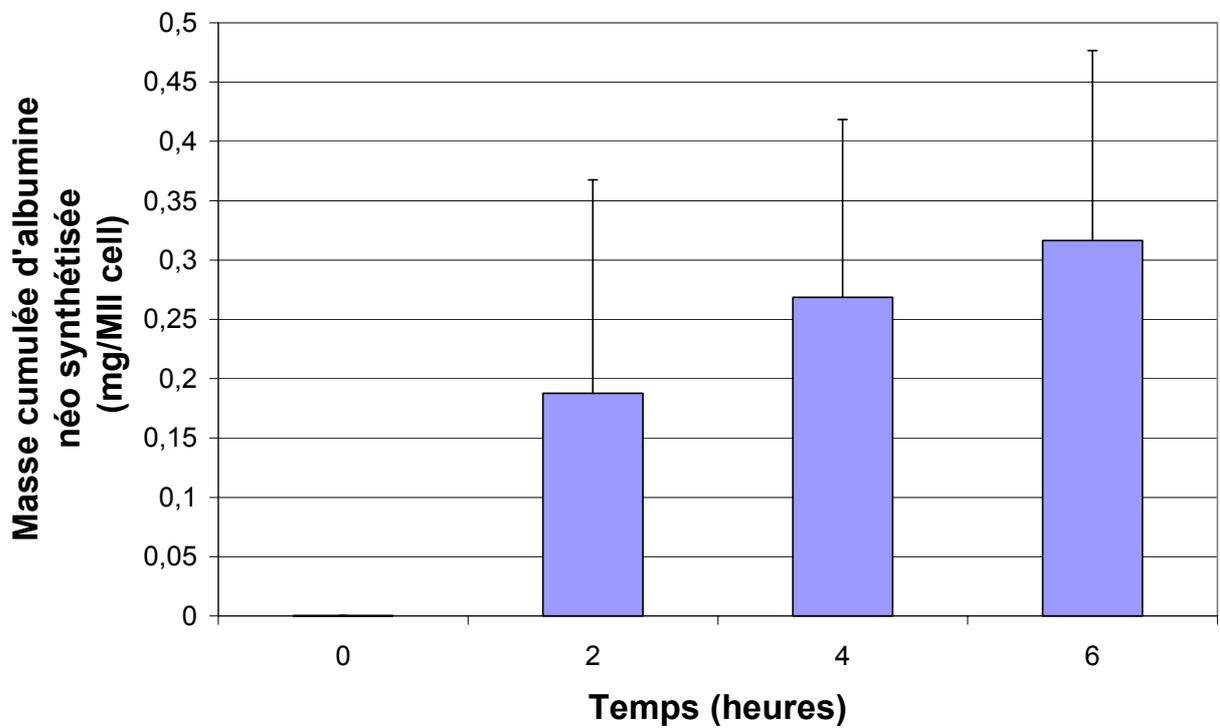
**Annexe 1 : Synthèse de protéines par les C3a**  
 (■ Boite (n=6); ■ Bille (n=5); ■ Bioréacteur(n=2))



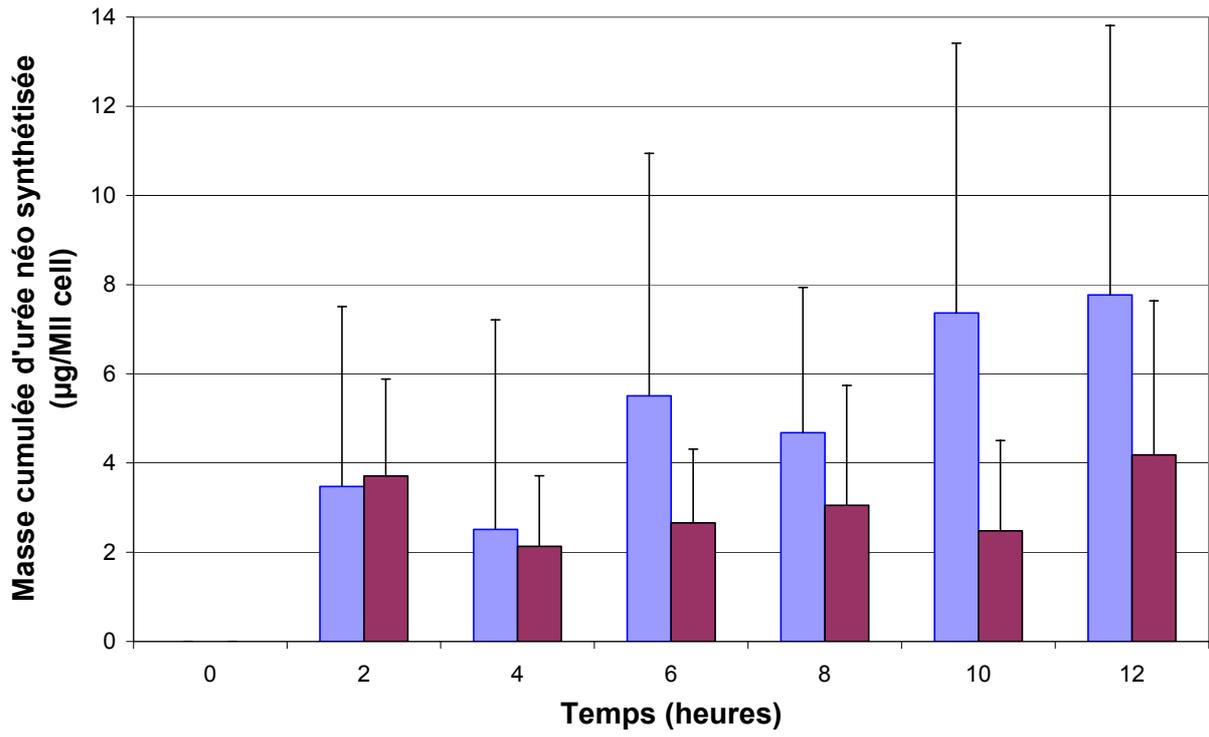
**Anexe 2 : Synthèse d'albumine par les C3a sur fond de boîte de culture (n=1)**  
 (± écart type de mesure)



**Anexe 3 : Synthèse d'albumine par les C3a encapsulées en statique (n=1)**  
 (± écart type de mesure)



**Anexe 4 : Synthèse d'albumine par les C3a encapsulées en dynamique (n=1)**  
 (± écart type de mesure)



**Annexe 5 : Formation d'urée par les C3a**

(■ Boite (n=8); ■ Bille (n=9))



## Annexe 6

### Minimum Essential Medium (MEM) (1X), liquid (11095) Invitrogen Contains Earle's Salts and L-glutamine

Catalogue Number: 11095

| COMPONENTS   | Mole.<br>Weight | Conc.<br>(mg/L) | Molarity<br>(mM) |
|--|-----------------|-----------------|------------------|
| INORGANIC SALTS:   |                 |                 |                  |
| <b>Calcium Chloride (CaCl<sub>2</sub>) (Anhyd.)</b>                                      | <b>111</b>      | <b>200.0</b>    | <b>1.80</b>      |
| Potassium Chloride (KCl)   | 75              | 400.0           | 5.30             |
| Magnesium Sulfate (MgSO <sub>4</sub> )   | 120             | 97.67           | 0.814            |
| Sodium Chloride (NaCl)   | 58              | 6800.0          | 117.24           |
|  |                 | 0               |                  |
| Sodium Bicarbonate (NaHCO <sub>3</sub> )   | 84              | 2200.0          | 26.20            |
|  |                 | 0               |                  |
| Sodium Phosphate-H <sub>2</sub> O (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> O) * | 138             | 140.00          | 1.01             |
| OTHER COMPONENTS:  |                 |                 |                  |
| D-Glucose  | 180             | 1000.0          | 5.55             |
|  |                 | 0               |                  |
| Phenol Red   | 398             | 10.00           | 0.0251           |
| AMINO ACIDS:   |                 |                 |                  |
| L-Arginine-HCl   | 211             | 126.00          | 0.600            |
| L-Cystine-2HCl   | 313             | 31.00           | 0.100            |
| L-Glutamine  | 146             | 292.00          | 2.000            |
| L-Histidine-HCl-H <sub>2</sub> O   | 210             | 42.00           | 0.200            |
| L-Isoleucine   | 131             | 52.00           | 0.400            |
| L-Leucine  | 131             | 52.00           | 0.400            |
| L-Lysine-HCl   | 183             | 73.00           | 0.397            |
| L-Methionine   | 149             | 15.00           | 0.101            |
| L-Phenylalanine  | 165             | 32.00           | 0.194            |
| L-Threonine  | 119             | 48.00           | 0.403            |
| L-Tryptophan   | 204             | 10.00           | 0.049            |
| L-Tyrosine-2Na-2H <sub>2</sub> O   | 261             | 52.00           | 0.199            |
| L-Valine   | 117             | 46.00           | 0.393            |
| VITAMINS:  |                 |                 |                  |
| D-Ca Pantothenate  | 477             | 1.00            | 0.002            |
| Choline Chloride   | 140             | 1.00            | 0.0071           |
| Folic Acid   | 441             | 1.00            | 0.0022           |
| i-Inositol   | 180             | 2.00            | 0.0111           |
| Niacinamide  | 122             | 1.00            | 0.0081           |
| Pyridoxal HCl  | 204             | 1.00            | 0.0049           |
| Riboflavin   | 376             | 0.10            | 0.0002           |
| Thiamine HCl   | 337             | 1.00            | 0.0029           |

#### REFERENCE:

1. Eagle, H. (1959) Science, 130, 442.