



HAL
open science

Conception guidée par la physiologie de biopiles bioinspirées implantables

Jean-Pierre Alcaraz

► **To cite this version:**

Jean-Pierre Alcaraz. Conception guidée par la physiologie de biopiles bioinspirées implantables. Ingénierie biomédicale. Université Grenoble Alpes, 2016. Français. NNT : 2016GREAS011 . tel-01473414v2

HAL Id: tel-01473414

<https://theses.hal.science/tel-01473414v2>

Submitted on 9 Mar 2017

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Biotechnologie, Instrumentation, Signal**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Jean-Pierre Alcaraz

Thèse dirigée par **Donald Martin** et
codirigée par **Philippe Cinquin**

préparée au sein du **Laboratoire TIMC-IMAG UMR 5575_ SyNaBi**

dans l'**École Doctorale Ingénierie pour la Santé, la Cognition,
l'Environnement**

Conception guidée par la physiologie de biopiles bioinspirées implantables

Thèse soutenue publiquement le **19 octobre 2016**,
devant le jury composé de :

**Pr Benoit Polack, PU PH Université de Grenoble Alpes CHU
Grenoble (Président)**

**Dr Didier Letourneur, Directeur de recherche CNRS
(Rapporteur)**

**Dr Emmanuel Guedon, Directeur de recherche CNRS
(Rapporteur)**

**Dr Frédéric Barrière, Maître de conférence Université de Rennes
(Examineur)**

**Pr Donald Martin, Professeur Université de Grenoble Alpes CHU
Grenoble (directeur de thèse)**

**Pr Philippe Cinquin, PU PH Université de Grenoble Alpes CHU
Grenoble (Directeur de thèse)**



A ma famille,

A mes amis,

Remerciements

Enfin, j'arrive au bout... Les remerciements, ... derniers écrits qui apparaissent cependant en première page de ce travail de thèse.

Page que les personnes non spécialistes sont justes curieuses de lire, en se disant qu'au moins cette partie-là sera abordable et qui permet de « jauger » l'écriture du candidat...

Page qui n'est pas aussi simple à rédiger par la crainte d'oublier tous ceux qui m'ont accompagné tout au long de ce parcours.

Page plus personnelle encore que ce travail de thèse car elle parle de sentiments et non plus de faits scientifiques.

Page qui se doit de refléter l'impression générale que me laisse cette thèse. J'ai eu du mal clore ce document tant le travail qui reste encore à réaliser est immense. Nous n'en sommes qu'au début de l'aventure, je continue à apprendre et à partager, il n'y a que de cette façon que les choses avancent. Comme le disait un procureur du tribunal des flagrants délires, « On peut rire de tout, mais pas avec tout le monde ... ou alors c'est dur ». Et bien, il me semble que pour la recherche c'est un peu pareil : peu importe la recherche, l'important est avec qui on la fait. Et là, j'ai été servi ! Et ceci dès mon arrivée à TIMC-IMAG en septembre 2008. Alors, je voudrais d'abord remercier mes directeurs de thèse, Philippe Cinquin et Donald Martin, pour leur constant soutien.

Philippe, c'est notre première entrevue qui a décidé ma venue dans le labo que tu diriges. Merci pour ton accueil au sein du labo TIMC et de m'avoir poussé à réaliser cette thèse. Je reste impressionné par ton intelligence exceptionnelle et j'admire surtout ton humanité, ton goût des gens. J'ai toujours l'impression que tu me donnes les clés de la maison, j'espère continuer à être à la hauteur.

Don, quelle aventure depuis ton arrivée en France ! Ca me rappelle une citation de Mark Twain: « They didn't know it was impossible so they did it ». Merci pour ton enthousiasme, ton côté « je ne lâche rien ! », et ton aide précieuse dans les coups de mou. A tes côtés, j'apprends la précision dans les plus fins détails pour que tout devienne net et clair.

Je suis très reconnaissant aux membres éminents de mon jury de thèse d'avoir jugé mon travail, chacun spécialiste d'une partie de cette thèse qui fait le grand-écart entre les nano-objets biologiques et la physiologie intégrée en passant par des mesures d'électrochimie. Merci donc à mes rapporteurs, Didier Letourneur et Emmanuel Guedon, pour leur lecture attentive et critique du document. Merci également à Frédéric Barrière pour le versant électrochimique et à Benoît Polack pour ses connaissances en immunologie et en biologie. Merci du vif intérêt que ce jury tout entier a porté à mon travail.

L'histoire de cette thèse a démarré avec 2 sujets bien distincts qui commencent à s'entremêler à présent étroitement.

Je tiens donc à remercier la « magic team » de mes débuts à TIMC, Lavinia Liguori et Barry Stidder, et Don, avec qui j'ai partagé un bon moment de science en équipe pluridisciplinaire et une manipe mémorable : j'ai eu du mal à y croire ! Le démarrage du projet s'est fait dans l'équipe GMCAO qui a hébergé Bruce le robot pendant un temps certain (Merci à Lilianne Guérante). J'y ai apprécié le traditionnel café tôt le matin (Merci Joce !) tout en surveillant Bruce...

L'équipe SyNaBi a maintenant émergée et se construit à partir de jolies publications (Merci Sarra et Abdel), avec de nouvelles idées, et toujours de nouvelles rencontres : Merci à Landry et Thomas pour la surproduction, et à Jacques pour ton enthousiasme, tes connaissances et ton amitié (merci pour tes toiles qui me font Rêver tous les jours).

TIMC est un labo très particulier au vu de l'étendue des thèmes abordés par ses équipes et ça a été dès le départ extrêmement enrichissant de travailler avec Therex (surtout le mardi matin), DyCTiM, et le PRETA.

Je ne peux parler du PRETA sans une spéciale dédicace à François Boucher qui a participé de très près aux manipes et dont les conseils et discussions sont toujours enrichies de beaucoup d'humour et aussi de chants mémorables. Merci de m'avoir fait découvrir TIMC, merci de tes encouragements et ta disponibilité de chaque instant. Merci également à Stéphane Tanguy, toujours prêt à rattraper la faiblesse d'un moment d'égarement.

Un merci particulier à mes collègues IATOS et ITA du laboratoire, qui ont bien du courage pour faire tourner la boutique avec si peu de moyens humains. Tout fonctionne toujours mieux avec la bonne volonté des gens, et heureusement, on sent cette volonté bien présente dans TIMC.

J'aime le côté totalement contre-intuitif de la science qui nous surprend toujours au détour d'une manipe. Et une belle manipe n'en est que plus belle si elle est partagée. Merci aux laboratoires avec qui j'ai collaboré dans le projet IBFC. Merci à Naceur, Didier, Chu, Bertine et Cécile du LGP2, à Abdellatif et Marie-Line du CEA LETI, pour les discussions et manipes pour tenter de faire avancer les choses. Merci à Chantal Gondran du DCM, pour ses connaissances et son enseignement de la spectroscopie d'impédance électrochimique et Giovanna Fragnetto et Eric Watkins pour les manipes neutrons. Merci également aux sociétés privées UROMEMS, BIOPIC et SORIN Group, pour leur collaboration avec ou sans fils.

Je voudrais également adresser toute ma reconnaissance à l'équipe du LRB et de la PFIE de Tours, pour leur aide précieuse et leur accueil toujours convivial. Je tiens à remercier pêle-mêle les personnes des autres plate-formes utilisées pour cette thèse : Laurine Buon et Claire Boisset du CERMAV, Laurent Cortella d'Arc-Nucléart au CEA, Catherine Guimier et ses collègues de la stérilisation centrale du CHU de Grenoble, Frédéric Charlot pour la microscopie électronique du CMTC, et les collègues de l'IAB, en particulier Christian Villiers et Alexeï Grichine pour les manipes de fluorescence et les manipes complémentaires.

Enfin, merci aux personnes que je n'ai pas citées, elles sauront se reconnaître (c'est un peu facile mais indispensable).

Je ne saurai terminer cette page sans remercier ma famille, ma compagne et mes enfants pour les remercier de leur patience et de leur abnégation en me laissant terminer cette histoire. C'est avec ma femme que j'ai réalisé ma plus jolie manipe reproductible avec un triplicat de maintenant 19, 17 et 15 ans et les contrôles qui vont avec (la manipe est encore en cours).

J'espère que vous prendrez autant de plaisir à lire ce document que j'en ai eu à l'écrire. Ne reste plus qu'à tourner quelques pages blanches et plonger dans le cœur du sujet.

Table des matières

Chapitre 1^{er} : Introduction

<i>1.1 Historique des implantations chez l'homme</i>	p9
<i>1.2 Les implants électroniques actuels et leur alimentation</i>	p13
1.2.1 L'alimentation des dispositifs médicaux nécessitant peu d'énergie	
1.2.2 Les implants électroniques forts consommateurs d'énergie	
<i>1.3 Les batteries rechargeables et les récents développements</i>	p18
<i>1.4 Utiliser la biomimétique pour générer de l'énergie</i>	p20
1.4.1 L'énergie physique comme source de courant.....	p21
1.4.2 L'énergie chimique par la consommation de molécules à haut niveau d'énergie.....	p22
1.4.2.1 Les piles abiotiques	
1.4.2.2 Les biopiles microbiennes	
1.4.2.3 Les biopiles enzymatiques	
1.4.2.4 La biopile glucose/oxygène	
1.4.2.5 Aspects éthiques de l'expérimentation animale	
1.4.2.6 L'implantation d'une biopile glucose/oxygène chez le rat	
1.4.2.6.1 La Glucose Oxydase	
1.4.2.6.2 La Polyphénol Oxydase	
1.4.2.6.3 L'immobilisation des enzymes	
1.4.2.6.4 Les médiateurs électrochimiques	
1.4.2.6.5 Fabrication de la biopile et enrobage (boudin de dialyse)	
1.4.2.6.6 Biocompatibilité et réponse de l'organisme à un corps étranger	
1.4.2.6.7 Choix du lieu d'implantation	
1.4.3 Le transport membranaire cellulaire comme source d'énergie	p40
1.4.3.1 Description d'une membrane biologique ; rôle des lipides et des protéines	
1.4.3.2 Modélisation de la membrane biologique	
1.4.3.3 Création d'une pile à base de membrane biomimétique	
1.4.3.4 Fonctionnement de l'électrocyte, un modèle de super condensateur	
<i>1.5 Objectifs de la thèse</i>	p50

1.6 Références du chapitre 1 p51

Chapitre 2 : Performances *in vivo* d'une deuxième génération de biopile

2.1 Introduction p57

2.2 Performances obtenues *in vitro* par une biopile à transfert direct p58

2.3 Lieu d'implantation de la biopile p60

- 2.3.1 Aspects physiologiques et choix du lieu d'implantation
- 2.3.2 Concentration théorique de glucose et d'oxygène par la biopile implantée
- 2.3.3 Concentration en gluconate
 - 2.3.3.1 le gluconate dans le métabolisme des mammifères
 - 2.3.3.2 Dosage du gluconate chez une brebis implantée

2.4 Miniaturisation et forme générale de l'implant p65

- 2.4.1 Les bioélectrodes, la membrane filtrante et l'environnement aqueux
- 2.4.2 L'enrobage biocompatible

2.5 Mesures des paramètres électriques de la biopile implantée p71

2.6 Mise en place d'un protocole de suivi des animaux p75

2.7 Performances obtenues *in vivo* par une biopile à transfert direct p76

2.8 Conclusion du chapitre 2 p82

2.9 Références du chapitre 2

Chapitre 3 : Etudes *in vitro* et *in vivo* de la biocompatibilité de nouveaux matériaux de biopiles

3.1 Alternatives au boudin de dialyse

3.1.1 Capsule polyamide.....	p85
3.1.1.1 Fabrication et montage	
3.1.1.2 Qualité du collage et étude de diffusion de molécules <i>in vitro</i>	
3.1.1.3 Qualité du collage et étude de biocompatibilité <i>in vivo</i>	
3.1.2 Membrane de silicium poreux.....	p90
3.1.2.1 Introduction	
3.1.2.2 Surface chemical stabilisation of porous silicon membranes in physiological media: application for implantable reactors	
3.1.3 Membrane de chitosane.....	p107
3.1.3.1 Biocompatibilité <i>in vitro</i>	
3.1.3.2 Biocompatibilité <i>in vivo</i>	

3.2 Stérilisation des implants

3.2.1 Introduction.....	p112
3.2.2 Utilisation des rayonnements ionisants	
3.2.3 Effets des rayonnements ionisants sur la matière.....	p113
3.2.3.1 Effets des rayonnements ionisants sur les molécules du vivant et les micro-organismes	
3.2.3.1.1 Effets sur l'eau	
3.2.3.1.2 Effets sur les lipides	
3.2.3.1.3 Effets sur l'ADN	
3.2.3.1.4 Effets sur les protéines	
3.2.3.1.5 Effets sur les sucres complexes	
3.2.3.1.6 Effets sur les micro-organismes	
3.2.3.2 Effets des rayonnements ionisants sur les polymères et dispositifs électroniques	
3.2.4 Effets des rayonnements ionisants sur la biopile enzymatique.....	p118

3.3 Conclusion du chapitre 3

3.4 Références du chapitre 3.....	p121
-----------------------------------	------

Chapitre 4 : Conception et mise en œuvre *in vivo* d'une biopile enzymatique au chitosane

<i>4.1 Biocompatibilité in vivo de bioélectrodes de 3^{ème} génération</i>	p123
4.1.1 Etude de la biocompatibilité d'une anode GOX/1-4naphtoquinone/CNT	
4.1.2 Etude de la biocompatibilité et de la performance d'une cathode laccase/chitosan/CNT	
4.1.3 Etude de la biocompatibilité et de la performance d'une biopile en circuit ouvert	
<i>4.2 Nouvelles techniques de mesure par télémétrie</i>	p138
4.2.1 Dispositif télémétrique développé par Sorin Group	
4.2.2 Dispositif télémétrique développé par Biopic	
4.2.3 Raccordement électrique de la biopile aux dispositifs de télémétrie	
4.2.3.1 Connectique côté biopile	
4.2.3.2 Connectique côté capsule	
4.2.3.1 Assemblage	
<i>4.3 Implantation chez le lapin</i>	p142
4.3.1 Opération chirurgicale	
4.3.2 Suivi post-opératoire	
4.3.3 Résultats de performance, de stabilité et de biocompatibilité de l'implantation d'une biopile au chitosane	
4.3.4 Analyse anatomo-pathologique de l'implant télémétrique	
<i>4.4 Implantation chez la brebis</i>	p166
4.4.1 Mesures électriques de la biopile	
4.4.2 Analyse de l'implant après autopsie	
<i>4.5 Bilan des implantations de biopile de 3^{ème} génération</i>	p168
<i>4.6 Références du chapitre 4</i>	p171

Chapitre 5 : Création d'une membrane biomimétique

<i>5.1 Fabrication d'une bicouche lipidique stable sur un support poreux</i>	p173
5.1.1 Généralités sur les bicouches lipidiques planes et leur stabilité	
5.1.2 Fabrication d'une membrane biomimétique plane sur un support poreux	
5.1.2.1 Sur un support de silicium poreux	
5.1.2.2 Sur un hydrogel interpénétré	
<i>5.2 Production et test d'activité du canal ionique NhaA</i>	p181
5.2.1 Généralités sur la protéine NhaA	
5.2.2 Production de NhaA	
5.2.2.1 Production en système acellulaire	
5.2.2.2 Production en bactérie et purification	
5.2.3 Test d'activité de NhaA par une méthode optique	
<i>5.3 Conception d'une membrane biomimétique contenant un canal ionique</i>	p191
<i>5.4 Conclusion et perspectives du chapitre 5</i>	p193
<i>5.5 Références du chapitre 5</i>	p197
Conclusion et perspectives générales	p200

Liste des figures :

Chapitre 1^{er} : Introduction

- Figure 1.1 : deux exemples de prothèses et leur évolution au cours du temps
- Figure 1.2 : biomatériaux métalliques et synthétiques utilisés dans les dispositifs médicaux
- Figure 1.3 : 4 grandes familles actuelles d'implants
- Figure 1.4 : exemples d'un pacemaker à thermopile et d'un pacemaker biogalvanique
- Figure 1.5 : piles actuellement utilisées pour les dispositifs médicaux
- Figure 1.6 : Pompe à insuline implantable
- Figure 1.7 : les 3 types de coeur artificiel et leur alimentation
- Figure 1.8 : fonctionnement d'une batterie lithium-ion.
- Figure 1.9 : schéma de fonctionnement d'une biopile à combustible
- Figure 1.10 : sources d'énergie récupérables du corps humain
- Figure 1.11 : architecture de base d'une pile biogalvanique Al/O₂.
- Figure 1.12 : principe de fonctionnement de la biopile enzymatique glucose/O₂
- Figure 1.13 : schéma d'une biopile lactate/air
- Figure 1.14 : mécanisme d'oxydation du glucose par la Glucose oxydase
- Figure 1.15 : réaction catalysée par la tyrosinase (PPO)
- Figure 1.16 : les 4 systèmes d'immobilisation des enzymes sur une électrode
- Figure 1.17 : greffage covalent d'un FAD à une électrode
- Figure 1.18 : fabrication des électrodes sous forme de disques compressés
- Figure 1.19 : $\frac{1}{2}$ réaction à la bioanode
- Figure 1.20 : $\frac{1}{2}$ réaction à la biocathode
- Figure 1.21 : potentiels obtenus dans différentes configurations de connexion d'enzymes aux électrodes
- Figure 1.22 : fabrication et enrobage de la biopile de 1^{ère} génération
- Figure 1.23 : variation au cours du temps de la réponse inflammatoire aiguë et tardive
- Figure 1.24 : les différentes étapes de la réponse à l'implantation d'un dispositif médical
- Figure 1.26 : la membrane cellulaire
- Figure 1.27 : organisation des lipides en solution aqueuse
- Figure 1.28 : vitesse de diffusion de solutés à travers une membrane biologique
- Figure 1.29 : rayon des ions dans leur état hydraté ou déshydraté et énergie libre d'hydratation
- Figure 1.30 : les catégories de transporteurs dans les membranes biologiques
- Figure 1.31 : modèle électrique d'une bicouche lipidique et constante diélectrique ϵ d'un lipide
- Figure 1.32 : modélisation des constituants d'une membrane sous la forme d'effecteurs électriques
- Figure 1.33 : schéma de principe de fonctionnement d'une pile à membrane biomimétique
- Figure 1.34 : la stimulation d'un électrocyte
- Figure 1.35 : modélisation électrique simplifiée d'un électrocyte par 2 condensateurs et une résistance en série.
- Figure 1.36 : Arrangement en série ou en parallèle des électrocytes

Chapitre 2 : Performances *in vivo* d'une deuxième génération de biopile

- Figure 2.1 : état de l'art de l'implantation d'une première génération de biopile implantable
- Figure 2.2 : réduction de l'oxygène par les laccases et la bilirubine oxydase en 3 étapes
- Figure 2.3 : cinétique de diffusion de glucose dans la cavité abdominale d'un rat
- Figure 2.4 : réponses ampérométriques à 0 V des bioélectrodes en fonction de la concentration en substrats.
- Figure 2.5 : dosage du gluconate chez 2 brebis implantées avec des biopiles en circuit ouvert.
- Figure 2.6 : constituants de la biopile de 2ème génération.
- Figure 2.7 : étapes de réalisation de la biopile de 2ème génération.
- Figure 2.8 : prothèses vasculaires synthétiques.
- Figure 2.9 : prothèses en polyester.
- Figure 2.10 : structure à différentes échelles du e-PTFE.
- Figure 2.11 : expérience de diffusion au travers une membrane de e-PTFE.
- Figure 2.12 : dernière étape de préparation de la biopile de 2ème génération.
- Figure 2.13 : implant au voisinage du Dacron® après 2 mois d'implantation intra-abdominale.
- Figure 2.14 : un premier dispositif de mesure.
- Figure 2.16 : un dispositif utilisant un connecteur fixé.
- Figure 2.17 : étapes de la fixation d'un connecteur fixé sur le crâne du rat.
- Figure 2.18 : optimisations réalisées pour l'implantation d'une 2ème génération de biopile.

Chapitre 3 : Etudes *in vitro* et *in vivo* de la biocompatibilité de nouveaux matériaux de biopiles

- Figure 3.1 : capsule polyamide avec membranes d'acétate de cellulose.
- Figure 3.2 : étapes de montage de la capsule polyamide contenant la biopile.
- Figure 3.3 : utilisation de la capsule dans une expérience de diffusion de molécules fluorescentes.
- Figure 3.4 : discrimination de 2 molécules fluorescentes de taille différente par spectroscopie de corrélation de fluorescence
- Figure 3.5 : test *in vivo* de la capsule polyamide implantable.
- Figure 3.6 : analyse anatomopathologique de la zone de jonction cathéter silicone-capsule polyamide après 6 jours d'implantation de la capsule polyamide.
- Figure 3.7 : tissus recouvrant le parylène
- Figure 3.8 : structure de la chitine, du chitosane désacétylé et de la cellulose.
- Figure 3.9 : les 2 types de mécanismes de réticulation de la génipine avec les amines primaires du chitosane
- Figure 3.10 : principe du test d'activité du complément.
- Figure 3.11 : test d'activité du complément avec des membranes de chitosane modifié.
- Figure 3.12 : explantation des membranes de chitosane implantées en intra-abdominal chez le rat pendant 100 jours
- Figure 3.13 : Analyse microscopique des régions adhérentes au Dacron® après 100 jours d'implantation.
- Figure 3.14 : effets des rayonnements ionisants sur l'ADN.
- Figure 3.15 : influence de la concentration en catalase sur son activité résiduelle suite à son irradiation γ
- Figure 3.16 : effets de la dose de rayons γ sur l'activité résiduelle des 3 enzymes de notre biopile.
- Figure 3.17 : spectre d'émission du tryptophane et de la flavine de la glucose oxydase ionisée à différentes doses de rayons γ
- Figure 3.18 : émission de fluorescence des résidus tryptophane de l'enzyme laccase en fonction de la dose d'ionisation de la protéine en solution.

Figure 3.19 : test de stérilisation de pastilles inoculées avec *Geobacillus stearothermophilus*

Figure 3.20 : activité résiduelle de la laccase en solution ou immobilisée dans la biocathode en fonction de la dose de rayonnements ionisants.

Chapitre 4 : Conception et mise en œuvre *in vivo* d'une biopile enzymatique au chitosane

Figure 4.1 : explantation de bioanodes médiatées implantées chez le rat.

Figure 4.2 : coupe transversale d'une biocathode après implantation.

Figure 4.4 : analyse de la performance d'une biopile de 3^{ème} génération.

Figure 4.5 : analyse anatomopathologique de la biopile de 3^{ème} génération après 15 jours d'implantation.

Figure 4.6 : Electrodes sans enzyme implantées 2 mois dans la cavité abdominale de rats.

Figure 4.7 : Capsule implantable développée par Sorin Group.

Figure 4.8 : Dispositif télémétrique développé par Sorin Group.

Figure 4.9 : dispositif télémétrique développé par Biopic.

Figure 4.10 : connectique côté bioélectrode.

Figure 4.11 : connectique côté dispositif télémétrique.

Figure 4.12 : mise en place de la connexion dispositif télémétrique-biopile.

Figure 4.13 : préparation de la connectique de la biopile avant stérilisation.

Figure 4.14 : procédure de préparation de l'implant.

Figure 4.17 : courbes de poids des lapins implantés.

Figure 4.18 : capsule Sorin implantée en intra-abdominal chez le lapin pendant 68 jours.

Figure 4.19 : Analyse microscopique des tissus enrobant la capsule implantable.

Figure 4.20 : évolution du potentiel de la biopile lors de l'implantation d'une biopile en intra-abdominal chez la brebis.

Figure 4.21 : biopile implantée chez la brebis pendant 49 jours. 1) En intra-abdominal. 2) en sous-cutané.

Figure 4.22 : Optimisations réalisées pour l'implantation d'une 3^{ème} génération de biopile.

Chapitre 5 : Création d'une membrane biomimétique

Figure 5.1 : dépôt d'une bicouche lipidique par la technique de Langmuir-Blodgett.

Figure 5.2 : formation d'une bicouche lipidique plane.

Figure 5.3 : les différents types de bicouches lipidiques planes.

Figure 5.4 : création d'une tBLM sur silicium poreux.

Figure 5.5 : Analyse de la membrane biomimétique par spectroscopie d'impédance électrochimique à 4 électrodes.

Figure 5.6 : évolution de l'impédance à 1 Hz d'une t-BLM sur silicium poreux avec du POPC.

Figure 5.7 : schéma de dépôt de polyélectrolytes couche à couche

Figure 5.8 : membrane de polyélectrolyte et agarose interpénétrés.

Figure 5.9 : Dispositif d'étude de la membrane biomimétique

Figure 5.10 : Impédance électrique de la membrane biomimétique

Figure 5.11 : la superfamille des antiports à cations monovalent/proton

Figure 5.12 : Structure tridimensionnelle de NhaA et son environnement

Figure 5.13 : mécanisme de transport de NhaA

Figure 5.14 : Production de NhaA en système acellulaire.

Figure 5.15 : adaptation du protocole pour le dépôt de polyélectrolytes sur des microcapsules de mélamine formol.

Figure 5.16 : photos des capsules biomimétiques observées en microscopie confocale.

Figure 5.17 : test d'activité de la protéine NhaA par une méthode optique

Figure 5.18 : modèle de fonctionnement de NhaA intégré dans des capsules biomimétiques.

Figure 5.19 : mesure de l'impédance d'une membrane biomimétique incorporant NhaA et réponse à l'ajout de NaCl

Figure 5.20 : fabrication d'un gradient de pH à partir d'un gradient de sel sur une membrane biomimétique plane

Figure 5.21 : membrane biomimétique de séquençage nanopore

Figure 5.22 : membrane biomimétique de filtration d'eau

Figure 5.23 : Surproduction de NhaA en bactérie E.coli C43

Conclusion et perspectives générales

Figure 6.1 : schéma des causes de non fonctionnement de la biopile

Chapitre 1^{er} : Introduction

1.1 Historique des implantations chez l'homme

L'histoire de la chirurgie montre que c'est depuis l'antiquité qu'ont été implantés chez l'homme de nombreux systèmes pouvant pallier des défaillances avec des dents en ivoire ou même dans l'Égypte ancienne [1] avec des bridges dentaires en or retrouvés sur des momies. Une prothèse dentaire a été récemment mise en évidence sur un crâne d'une gauloise datant de 2 siècles avant JC [2]. Les chercheurs pensent qu'il s'agit d'une tentative malheureuse de prothèse qui aurait tué cette gauloise : il s'agit d'une incisive en fer posée sans anesthésie dans des conditions d'hygiène probablement rudimentaires ayant très certainement entraîné à plus ou moins long terme la mort de la patiente qui a développé un abcès. Il n'est cependant pas impossible que cette fausse dent ait été posée post-mortem pour embellir le visage de cette jeune femme...

Ces opérations de pose de prothèses restent cependant d'usage externe et il faut attendre la fin du 19^{ème} siècle pour voir apparaître les premières opérations décrivant l'implantation d'un matériau à l'intérieur du corps [3] avec des prothèses articulaires [4] en ivoire ou en platine/iridium ou des prothèses pariétales [5] composées d'un filet métallique en argent pour le traitement des hernies inguinales. Ces progrès sont évidemment liés à l'arrivée de l'anesthésie en 1848 et de l'antisepsie avec Pasteur.

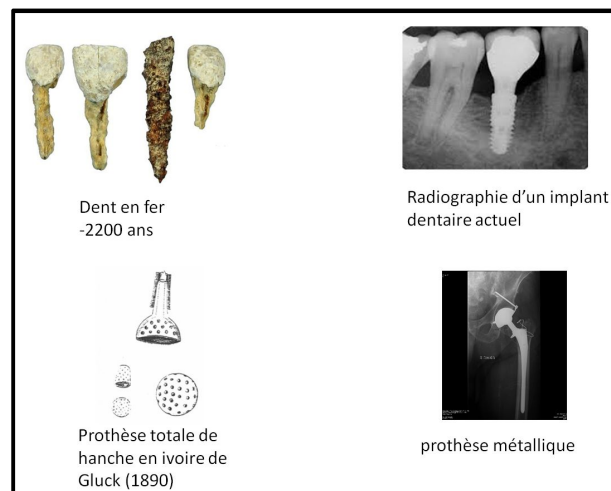


Figure 1.1 : deux exemples de prothèses et leur évolution au cours du temps.

De nos jours, la pose de prothèses de hanche est une opération assez courante qui a très fortement augmenté ces 20 dernières années pour deux raisons principales : la demande croissante pour des sujets de plus en plus jeunes et une offre étendue avec l'arrivée sur le marché de nouveaux matériaux comme la céramique ou le polyéthylène ultra-réticulé (HXLPE), ou encore l'hydroxyapatite [6], [7] favorisant l'ostéo-intégration. De même, les biomatériaux synthétiques comme le polypropylène, le polyester ou PTFE expansé ont remplacé les toiles d'acier inoxydable et autres treillis métalliques utilisés jusque dans les

années 1950 pour les prothèses pariétales qui, outre l'inconfort du fait de leur rigidité, ont la capacité de migrer à travers les tissus et de provoquer des lésions aux organes. Lors de l'implantation de ce type de matériau, le cahier des charges, décrit par Cumberland [8] et Scales [9] dans les années 1950, est conséquent et s'applique à l'implantation de nombreux dispositifs synthétiques.

Un implant idéal doit avoir les caractéristiques suivantes :

- Il ne doit pas être altéré dans sa constitution physique par les liquides
- Il doit être chimiquement inerte
- Il ne doit pas provoquer d'inflammation importante ou de réaction granulomateuse à un corps étranger
- Il ne doit pas être carcinogène
- Il ne doit pas entraîner de réaction de rejet, ni d'hypersensibilité ou d'allergie
- Il doit être capable de résister aux contraintes mécaniques du corps
- Il doit être facile à fabriquer et bon marché
- Il doit pouvoir être stérilisé

Les biomatériaux respectent ces grands principes.

Un biomatériau est défini depuis 1991 comme un « matériau non vivant, utilisé dans un dispositif médical et conçu pour interagir avec des systèmes biologiques, qu'il participe à la constitution d'un appareillage à visée diagnostique ou à celle d'un substitut de tissu ou d'organe, ou encore à celle d'un dispositif de suppléance (ou assistance) fonctionnelle » [10], [11].

La dernière définition de D.Williams en 2009 [12] s'est élargie en prenant en compte les nouveaux types de biomatériaux incluant les nanoparticules, les hydrogels, les systèmes biologiques auto-assemblés et leur structuration. Voici sa définition :

« Un biomatériau est une substance conçue pour prendre une forme, seule ou faisant partie d'un système complexe, et utilisée pour orienter les procédures diagnostiques ou thérapeutiques par le contrôle des interactions des composants avec les systèmes vivants, en médecine humaine ou vétérinaire. »

Les biomatériaux sont classés en 3 catégories : les métaux (purs ou alliages de métaux), les céramiques et les polymères (naturels, synthétiques ou bioinspirés) [13], [14]. Les polymères naturels souffrent de nombreux désavantages, notamment l'antigénicité, les possibles contaminations et la variabilité de composition des matières premières. Le tableau ci-dessous résume les différents biomatériaux synthétiques non biodégradables utilisés pour les dispositifs médicaux implantables :

Biomatériaux métalliques et céramiques		Exemples
Acier inoxydable		prothèses de hanche, plaques, vis fines temporaires
Titane et alliages		tête fémorale, stimulateur cardiaque
Cobalt et alliages		moulages dentaires, tiges
Céramiques		chambres implantables, prothèses (hanche, dent, ...)
Polymères synthétiques implantables	abréviations	exemples
Poly(tétrafluoroéthylène)	PTFE	prothèse vasculaire
poly(diméthylsiloxane)	PDMS	catheter uretral, implants cosmétiques
Polypropylène	PP	sutures, valves cardiaques
Poly(éthylène téréphtalate)	PET	Prothèse pariétale ou vasculaire
Polyoxy méthylène	POM	chambres implantables
Polyamide	nylon	Membrane d'hémodialyse
Polyétheréthercétone	PEEK	Emballage dispositifs implantables
Poly(éther urethane)	TPU	enveloppe d'implant mammaire, catheters
Poly(éthylène) basse et haute densité	PELD, PEHD	Articulations, tubulures
Polysulfone	PSU	Chambre implantable
Polyvinylchloride	PVC	Poches (prélevements, perfusion)
Poly(2-hydroxyéthylméthacrylate)	PHEMA	Lentille intra-oculaire
Polyméthylméthacrylate	PMMA	Ciment osseux
Parylène		revêtement des dispositifs médicaux

Figure 1.2 : biomatériaux métalliques et synthétiques utilisés dans les dispositifs médicaux.

Ces biomatériaux ont donné naissance à différents implants que nous avons classés dans le schéma ci-dessous en 4 grandes familles : les implants de structure, les implants à visée plus fonctionnelle, les dispositifs électroniques enregistreurs ou stimulateurs d'activité électrique et les implants à libération de médicaments.

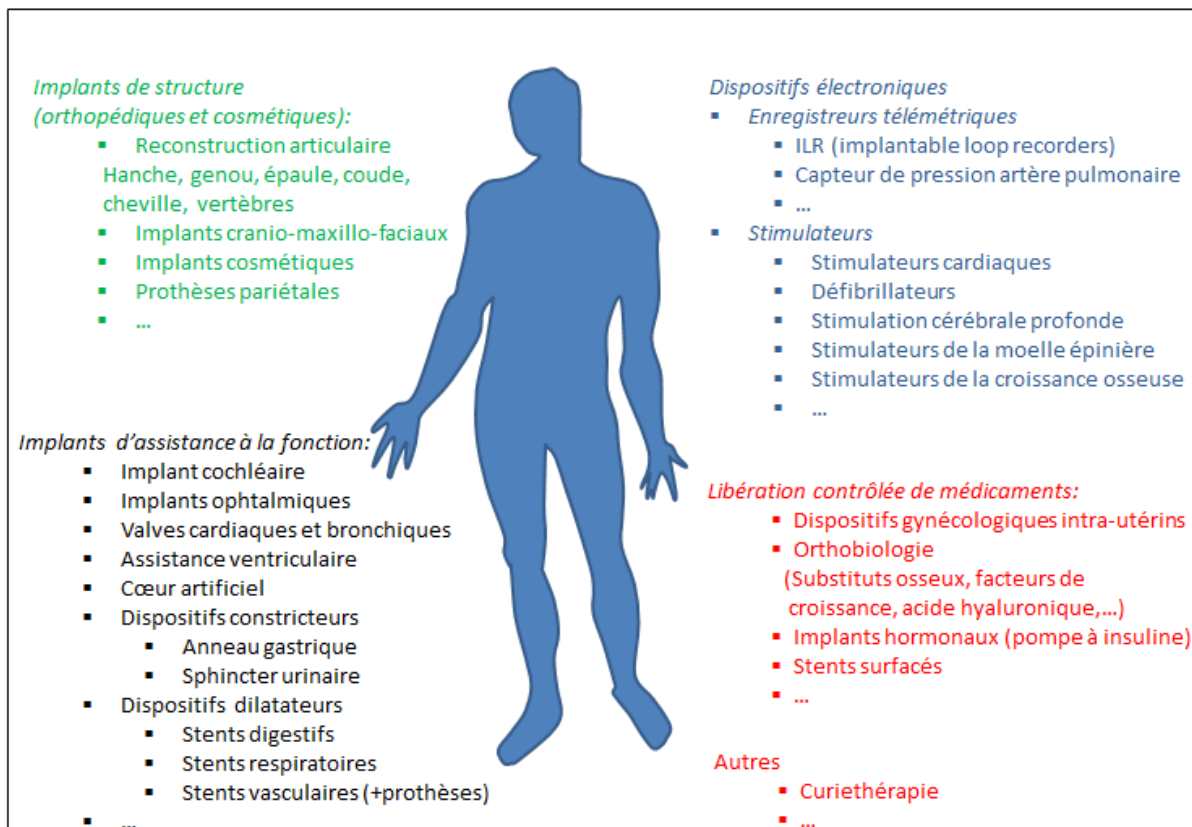


Figure 1.3 : 4 grandes familles actuelles d'implants : les implants dits de « structure », les implants à visée plus fonctionnelle, les dispositifs électroniques d'enregistrement ou de stimulation et les implants à libération de médicaments ou de curiethérapie.

Les principes évoqués plus haut, conçus pour les implants mécaniques, peuvent servir de base pour étudier la biocompatibilité des dispositifs médicaux électroniques qu'il faut pouvoir alimenter par de l'énergie électrique. C'est en particulier vrai pour l'alimentation des stimulateurs cardiaques [15], implantés depuis les années 1970.

A l'époque, l'alimentation des pacemakers était réalisée avec des piles zinc/mercure dont les performances à long terme étaient faibles (environ 18 mois selon [16]) . Plusieurs solutions ont été développées, notamment des piles atomiques [17], [18] (thermopile au plutonium ou cellule β -voltaïque) ou encore des piles biogalvaniques. Les thermopiles au plutonium, malgré leur robustesse et leur longévité, ont été abandonnées surtout en raison de l'accélération croissante des optimisations apportées dans le domaine des pacemakers sur une durée de 10 ans. On peut toutefois noter qu'1 μ g de plutonium dans la circulation sanguine peut être fatal.

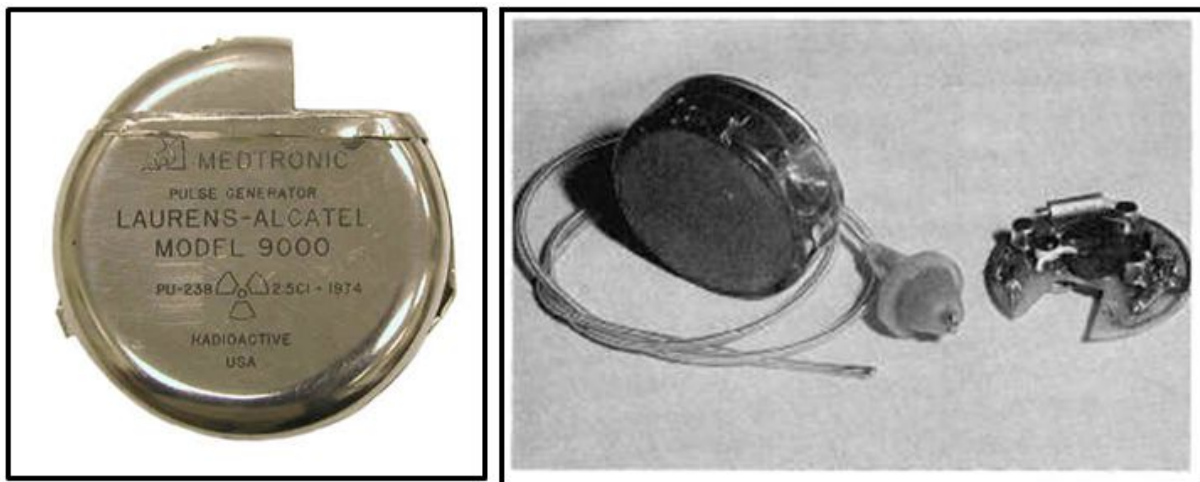
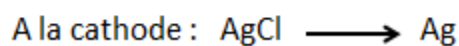
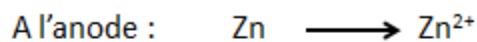


Figure 1.4 : exemples d'un pacemaker à thermopile à gauche (premier prototype implanté en France en 1970) et d'un pacemaker biogalvanique à droite.

Des implantations de piles galvaniques ont été réalisées sur des modèles animaux mais aussi chez l'homme en 1970 par Schaldach et Kirsch [19]. Elles étaient basées sur l'utilisation de métaux tels que le zinc ou l'aluminium à l'anode et une cathode en argent recouverte de chlorure d'argent, les tissus constituant l'électrolyte. C'est le corps du pacemaker lui-même qui constituait les électrodes sous la forme de disques, ce qui permettait d'avoir des électrodes de grande surface (13cm³). Les réactions suivantes se produisent aux électrodes :



32 pacemakers, implantés chez l'homme pendant des durées allant de 6 mois à 18 mois, ont produit 150 μ W en continu pendant 6 mois mais ont révélé la toxicité induite par les ions Zn²⁺ avec une nécrose tissulaire et la formation d'un abcès. La cathode présentait au contraire une capsule avec un épithélium fin mais une réduction importante du courant due à des réactions d'oxydo-réduction parasites et un dépôt d'argent.

Les mêmes auteurs ont implanté un autre système catalytique à base d'aluminium à l'anode (Al \rightarrow Al³⁺) et d'une cathode en platine ou en fer-phtalocyanine (mimant l'hème de

l'hémoglobine). L'utilisation de l'aluminium a permis de diminuer la réaction inflammatoire aiguë sur les tissus environnants malgré l'accumulation d'oxydes d'aluminium dans la capsule fibreuse. Il est encore actuellement difficile de connaître la dose toxique de l'aluminium chez l'homme, mais on sait qu'il est entre autres tératogène, allergène et impliqué dans les maladies neurodégénératives [20]. De plus, la chute de puissance ne peut être compensée que par l'augmentation de la quantité déjà importante de matériau d'électrode.

Ces expérimentations sont tombées dans l'oubli pendant de nombreuses années avec le développement de piles scellées performantes et l'évolution des matériaux et de la microélectronique permettant de grandes améliorations.

1.2 Les implants électroniques actuels et leur alimentation

On peut distinguer 2 types d'alimentation de dispositifs médicaux à l'heure actuelle suivant la quantité d'énergie consommée. Ceux utilisant peu d'énergie, de l'ordre de la dizaine de μW et possédant une longue durée de vie peuvent être implantés. Ceux qui sont plus gourmands en énergie sont externalisés.

1.2.1 L'alimentation des dispositifs médicaux nécessitant peu d'énergie

Les exemples choisis concernent les stimulateurs cardiaques, les neuro-stimulateurs et les pompes à insuline implantables.

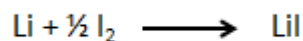
La stimulation cardiaque et la stimulation cérébrale profonde pour le traitement de pathologies telles que la maladie de Parkinson ou de la dystonie font également appel à un boîtier placé en sous-cutané sous la clavicule. Le boîtier contient une pile qui doit être changée tous les 3 à 5 ans (neurostimulateur) ou tous les 8 ans en moyenne (cardiostimulateur) ou une batterie rechargeable par induction pouvant tenir 10 ans ce qui constitue un délai raisonnable entre 2 opérations.

Outre l'alimentation électrique, des améliorations mécaniques et électroniques ont été réalisées : le boîtier a été miniaturisé, il pèse moins de 30g pour un volume de 11 mL contre presque 200g et 100mL pour le premier pacemaker. D'autre part, on a amélioré l'électronique, qui est devenue moins consommatrice d'énergie, et surtout la durée de vie des piles scellées a été considérablement augmentée. La consommation d'un stimulateur cardiaque varie de 15 à 40 μW . L'alimentation est effectuée avec des piles au lithium. Le principe de fonctionnement réside dans une anode en lithium métallique et une cathode basée sur différentes espèces chimiques.

Le lithium est utilisé pour plusieurs raisons : son potentiel redox est bas ($E_{0(\text{Li}^+/\text{Li})} = -3,04\text{V}$), sa masse molaire est faible, c'est le plus léger des métaux, ce qui conduit donc à une grande énergie massique, et c'est un métal malléable qui permet toutes formes de design (cylindre, spirale, ...).

Avec les piles lithium iode, la cathode est en iode et poly(2-vinylpyridine), ce qui favorise le transfert d'électrons.

La réaction mise en jeu est :

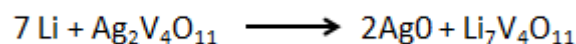


L'avantage principal de ce type de pile est l'utilisation d'un électrolyte solide en LiI remplaçant l'électrolyte liquide sensible à la corrosion. Le désavantage est l'augmentation de la résistance interne de la pile qui ne délivre alors qu'un courant faible. La mesure de l'impédance permet cependant de connaître le moment où la pile doit être changée. Le remplacement n'intervient que tous les 7 à 10 ans, ce qui paraît un délai raisonnable à l'échelle d'une vie humaine et permet également de profiter des optimisations réalisées pendant ce temps.

Un plus fort courant, pouvant aller jusqu'à 300mA, peut être généré en changeant le système cathodique. C'est le cas des piles Li/CFx. Dans ces piles, la cathode est constituée de carbone intercalé par du fluor gazeux. L'utilisation d'électrolytes solides bifonctionnels tels que le thiophosphate de lithium nanoporeux (Li₃PS₄) nanoporeux servant à la fois d'électrolyte inerte mais également d'élément actif à la cathode permet même de dépasser les limites théoriques des piles Li/CFx de plus de 10% [21]. Cette pile n'existe que sous forme prototype de recherche et n'est pas encore commercialisée.

Enfin, pour les défibrillateurs, la pile lithium-iode ne suffit pas et des cathodes argent-oxyde de vanadium (SVO) sont alors utilisées et permettent de délivrer des chocs de haute énergie.

La réaction mise en jeu est :



On peut voir que cette réaction permet d'accepter 7 moles de Li, ce qui permet d'obtenir une forte capacité volumique (jusqu'à 1510mAh/mL). La densité d'énergie de la cathode est alors doublée par rapport à une cathode à Iode.

Le tableau présenté figure 1.5 décrit différents types d'alimentation électrique sous forme de piles utilisées dans le domaine médical implantable en comparaison de la pile zinc/air ou des accumulateurs lithium-ion présenté par la suite :

pile	potentiel (V)	capacité massique (mAh/g)	capacité volumique (mAh/mL)	densité énergétique (mWh/g)
Zinc/air	1,3	820		300-700
Li/I ₂	2,8	211	1041	210-270
Li/MnO ₂	3	308	1540	230-270
Li/CFx	3	865	2335	440
Li/SVO	3,2	315	1510	270
C/LiCoO ₂	3,9	155	783	155

Figure 1.5 : piles actuellement utilisées pour les dispositifs médicaux (d'après [22]–[28])

Un autre exemple de l'utilisation de ces batteries au lithium est l'alimentation des pompes à insuline [29], [30] totalement implantables, qui constituent un véritable progrès pour la qualité de vie des diabétiques. Les problèmes principaux de l'implantation de ce système sont son coût, la stabilité dans le temps de l'insuline, et son inesthétisme. La pompe est asservie électroniquement, le débit est réglé par télémetrie et l'autonomie de la pile est de 7 à 10 ans.

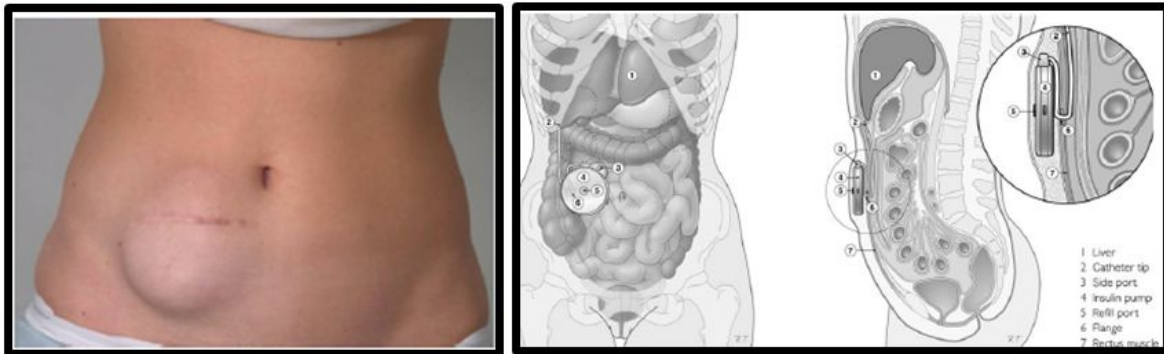


Figure 1.6 : Pompe à insuline implantable (D'après [30])

Un dernier système peu consommateur d'énergie est actuellement implanté : les holters implantables en sous-cutané, permettant la surveillance du rythme cardiaque pour des indications inexpliquées de syncopes ou d'accident vasculaire cérébral cryptogénique avec recherche de fibrillation auriculaire. La dernière génération commercialisée par Medtronic a une durée de vie de 3 ans. L'appareil est miniaturisé et injectable en sous-cutané [31].

Dans le meilleur des cas, les piles au lithium actuelles, commercialisées par les sociétés Greatbatch ou Eaglepicher, ont une capacité volumique de 30 à 60 μW dans les 12 mL constituant la pile [32].

1.2.2 Les implants électroniques fort consommateurs d'énergie

La quantité d'énergie nécessaire pour pallier les dysfonctionnements du corps varie de quelques microWatts pour des neurostimulateurs à des Watts pour des organes entiers comme le cœur. Les progrès croissants de l'électronique en termes de miniaturisation et le développement des biomatériaux permettent d'imaginer un futur où des robots implantés pourront suppléer des fonctions défaillantes. Pour alimenter des dispositifs médicaux plus gourmands en énergie, il n'est pas envisageable d'utiliser les piles au lithium décrites plus haut et on doit alors externaliser la source d'énergie.

A l'heure actuelle, il n'existe que quelques exemples de dispositifs implantables illustrant ce principe. Un premier exemple est l'alimentation des implants cochléaires qui ont fait leur apparition dans les années 70 pour traiter la surdité [33]. La pile est placée dans un boîtier derrière l'oreille et l'information sonore est transmise à l'implant sous-cutané contenant l'électronique à travers la peau par l'intermédiaire d'une antenne maintenue par un aimant. La bobine externe doit être correctement positionnée pour éviter l'échauffement des tissus et éviter les interférences radiofréquence. La consommation des processeurs actuels est variable en fonction des réglages du patient et de l'épaisseur des tissus entre émetteur et récepteur. La moyenne de fréquence de changement des piles zinc/air utilisées est de l'ordre d'une journée car la puissance demandée peut être forte, jusqu'à une dizaine de mW [34], [35]. Même si la plupart des processeurs actuels sont équipés de batteries rechargeables, cela représente une contrainte forte à long terme pour le patient.

Le deuxième exemple concerne l'alimentation de dispositifs d'assistance circulatoire ou de cœurs artificiels [36], qui nécessitent l'externalisation de la source d'alimentation. Des

technologies ont été développées, mais restent réservées aux patients souffrant d'insuffisance cardiaque en phase terminale ou en attente de transplantation.

Un premier cœur artificiel (Jarvik 7 commercialisé actuellement sous le nom Syncardia) a surtout été développé pour des patients en attente de transplantation. Son alimentation est pneumatique et le patient est constamment relié au compresseur (figure 1.7 A). Les inconvénients majeurs sont le bruit incessant du compresseur, et surtout le fait que le compresseur n'est pas implanté : l'air comprimé permettant d'alimenter le mouvement du cœur artificiel est amené par des tubes tunnelisés en sous-cutané. Les points de sortie des tubes nécessitent des soins très rigoureux et le risque infectieux reste très élevé. 2 études récentes de 2012 rapportent une infection de la ligne chez 14 % des patients [37]. Ce taux passe à 27% pour une étude sur 47 patients opérés depuis plus d'un an [38]. Au total, plus de la moitié des patients implantés a souffert d'infections systémiques durant la première année après l'opération [39], [40].

En parallèle des systèmes pneumatiques ou contenant des batteries externes, un cœur totalement implantable AbioCor IRH a été inventé au début des années 1990 (figure 1.7 B). Il comprend une pompe électrohydraulique qui fait passer alternativement un liquide d'un compartiment à un autre. Cette pompe est alimentée par une batterie rechargeable lithium-ion dont l'autonomie est de 15 à 45 minutes.

La recharge est effectuée par transfert transcutané d'énergie (TET en anglais) par couplage inductif entre une bobine implantée en sous-cutané et une bobine externe. Outre l'alignement des bobines qui doit être parfait pour éviter les échauffements, ce système n'est pas très efficace avec un rendement de 60% seulement et requiert donc l'utilisation de lourdes batteries portables. De plus, les batteries implantées doivent être changées tous les 1 à 2 ans. Ce dispositif reste néanmoins le seul à être totalement implanté, mais les investigations cliniques avec ce dispositif sont assez limitées et restent en phase de recherche.

De récents développements commencent à voir le jour en ce qui concerne une alimentation par induction (comme le transfert d'énergie coplanaire [41] permettant d'augmenter le rendement) ou par transfert d'énergie par résonance électrique [42] (FREED pour free-range resonant electrical energy delivery). Dans ce cas, le transfert peut se faire à des distances de quelques mètres et s'adapte rapidement à une mauvaise orientation de la bobine.

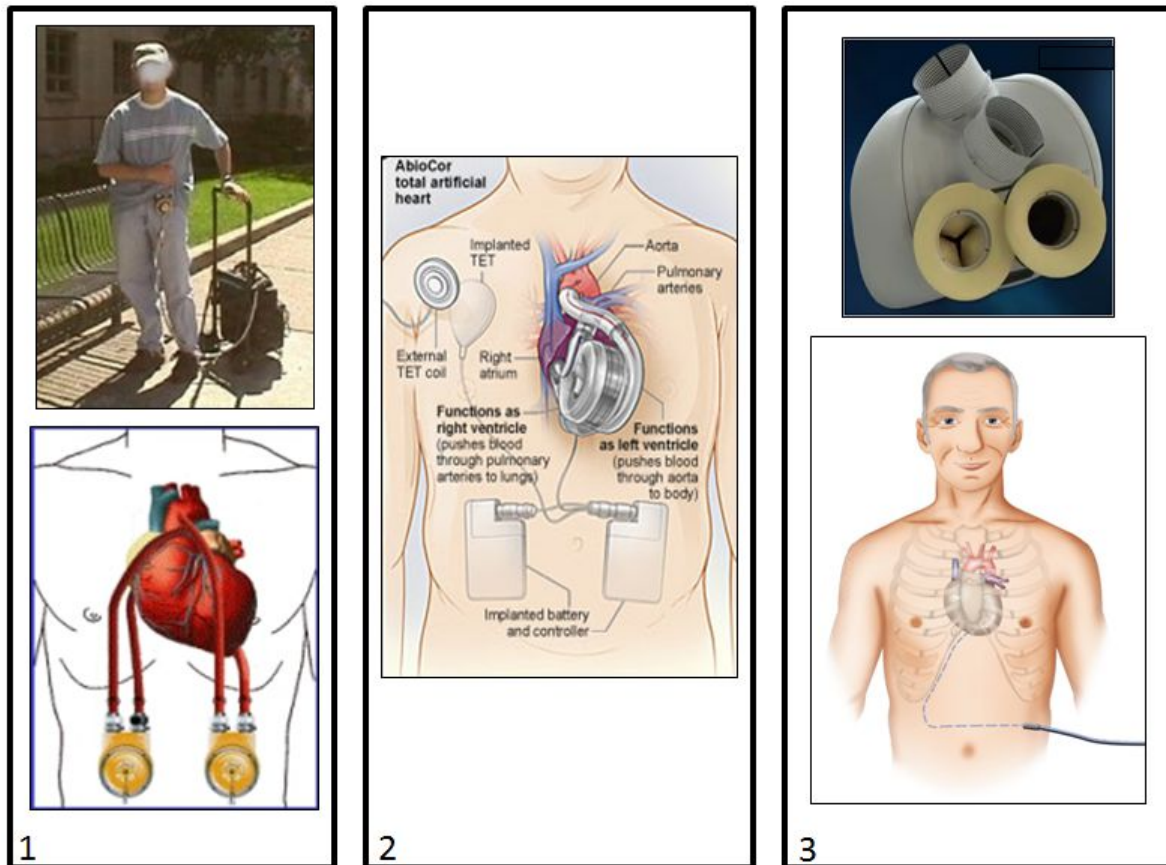


Figure 1.7 : les 3 types de coeur artificiel et leur alimentation. 1) Système pneumatique Thoratec. 2) Système inductif Abiocor. 3) Alimentation par câble du coeur CARMAT

Un système filaire reste à l'heure actuelle le système le moins dangereux d'utilisation et le plus efficace. Un implant percutané fixé à l'os plutôt qu'un câble trans-abdominal dans les tissus mous est également une piste intéressante comme c'est le cas pour l'implantation du dispositif d'assistance circulatoire mécanique à débit continu Jarvik2000. Ce dernier consiste en une mini-turbine placée dans le ventricule gauche électriquement reliée à un connecteur percutané rétro-auriculaire, inspiré des implants cochléaires. Ce connecteur diminue les risques infectieux en augmentant la qualité de vie des patients, qui peuvent par exemple prendre un bain ou une douche, et également faire du sport en régulant eux-mêmes le débit sanguin grâce à un boîtier extérieur.

Les premiers essais cliniques d'un cœur artificiel implanté chez l'homme par la société française Carmat ont eu lieu en 2015 avec un développement de l'électronique embarquée important qui permet une certaine adaptation à la physiologie. Le 2ème patient a vécu près de 9 mois avec cette prothèse alimentée par une batterie lithium ion rechargeable de 3kg en dispositif externe et relié au cœur par un câble percutané abdominal. Chez les 2 premiers patients, le défaut de fonctionnement a été provoqué par une microfuite du compartiment sanguin vers le compartiment électronique générant une perturbation du pilotage des moteurs. Les 3^{ème} et 4^{ème} patients sont décédés en décembre 2015 et en janvier 2016 avec une prothèse toujours fonctionnelle. La puissance demandée par ce cœur artificiel est à l'heure actuelle de 25 à 30 Watts.

1.3 Les batteries rechargeables et les récents développements:

Ce sont des accumulateurs développés depuis seulement une vingtaine d'années qui continuent à faire l'objet de recherches pour augmenter leur performance. Dans ce type de batterie, le lithium n'est pas sous forme métallique, les ions lithium s'insèrent de façon réversible dans les matériaux d'électrode à base de graphite à la cathode et d'oxydes de métaux de transition (Ni, Co ou Mn) à l'anode. Lors de la charge, le courant appliqué force le déplacement des ions de l'électrode positive vers l'électrode négative en traversant l'électrolyte. Lors de la décharge, les ions Li^+ rejoignent l'électrode en oxyde de manganèse ou de cobalt pour lequel ils ont une forte affinité. Ce déplacement est compensé par le passage d'électrons dans le circuit externe, ce qui génère un courant. Ce type de batterie finit par s'user par dégradation des matériaux d'électrodes et de l'électrolyte mais également par la formation d'un film bloquant l'intercalation des ions dans les électrodes [43]. De plus, la capacité volumique de ces batteries lithium décroît fortement pour des volumes très faibles [44].

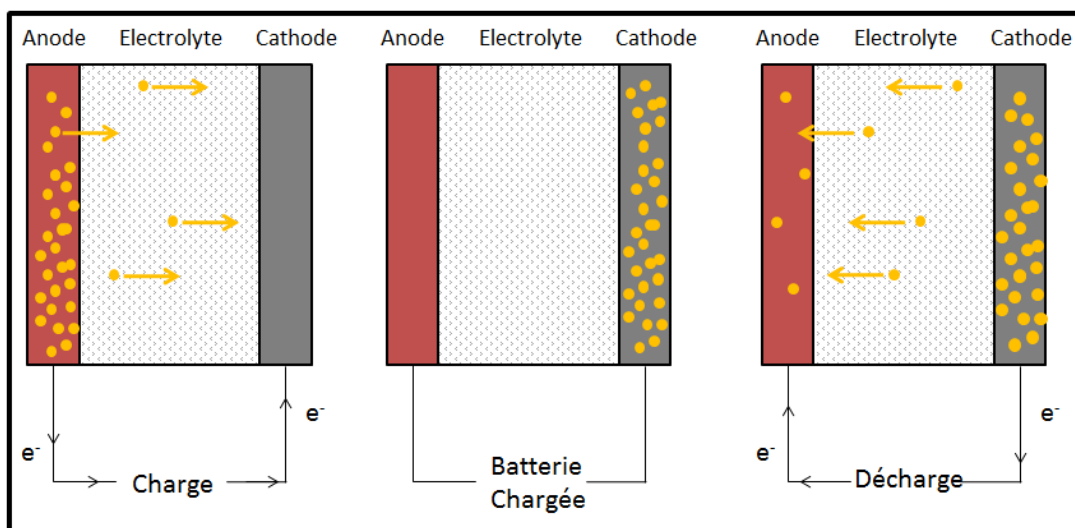


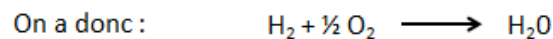
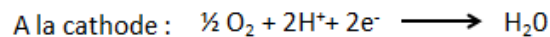
Figure 1.8 : fonctionnement d'une batterie lithium-ion. Les ions lithium schématisés par des ronds orange, se déplace de façon réversible d'une électrode à l'autre en traversant l'électrolyte.

Dans le domaine des accumulateurs, la littérature récente est très riche et concerne des composés électrochimiques actifs, stables et performants ainsi que le développement de nano-architectures sous forme de films tridimensionnels, d'électrodes interdigitées ou concentriques. Nous avons relevé quelques exemples intéressants comme une batterie aluminium-ion [45] (flexible, non inflammable, rapidement rechargeable, durable et d'un faible coût) ou même une batterie sodium-ion [46], [47] développée intensément depuis 2010 avec les électrodes à base de vanadium ou de molybdène qui acceptent l'intercalation d'ions sodium en leur sein. Le LITEN (CEA) et le CNRS ont fondé le réseau RS2E dédié aux batteries de nouvelle génération où le sodium, très abondant sur terre, remplace le lithium avec des performances de densité d'énergie de 90 Wh/kg [48].

Un autre concept de pile est revenu au goût du jour. La société CARMAT a passé un accord de partenariat avec le CEA au travers de la société Paxitech pour alimenter leur cœur artificiel grâce à une pile à combustible. Dans une pile à combustible, les électrodes poreuses ne sont composées que d'un catalyseur de réaction. A la différence d'une pile scellée classique où les espèces redox sont consommées jusqu'à leur disparition, cette biopile fonctionne tant que l'on fournit des combustibles, à savoir ici l'hydrogène (réducteur) et

l'oxygène (oxydant). Les ions qui traversent l'électrolyte dépendent du type de pile à combustible (H^+ , OH^- , O^{2-} , ...). Le concept de cette pile est loin d'être nouveau : elle a été publiée par un chercheur suisse, Christian-Friedrich Schönbein, dans le Philosophical Magazine en janvier 1839 et mise en évidence de façon fortuite la même année par Grove lors d'une expérience d'électrolyse de l'eau où, en débranchant l'électrolyseur et en connectant les 2 bornes, il a observé un courant dans le sens inverse avec une consommation d'hydrogène et d'oxygène et une différence de potentiel de 1 Volt.

Voici les réactions impliquées :



On comprend aisément l'intérêt d'un tel dispositif d'un simple point de vue « écologique » car les deux $\frac{1}{2}$ réactions sont élémentaires et on ne produit que de l'eau ! Les électrodes sont recouvertes de catalyseur (en général du platine) et doivent être séparées par une membrane (poreuse aux protons) pour établir une différence de potentiel. Les électrons empruntent le circuit électrique reliant les 2 électrodes. L'hydrogène est converti en protons au niveau de l'anode, les protons traversent la membrane électrolytique et l'oxydation des protons en eau se fait sur la cathode grâce à l'oxygène de l'air et aux électrons provenant du circuit :

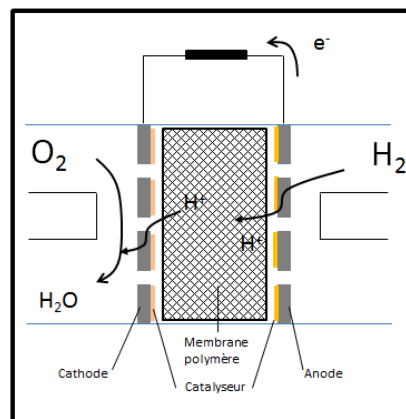


Figure 1.9 : schéma de fonctionnement d'une biopile à combustible

Le platine catalysant les réactions étant rare et cher, de nombreuses études sont menées à l'heure actuelle pour s'en affranchir ou en diminuer la quantité. Les piles à combustible offrent une réelle alternative pour alimenter des dispositifs gourmands en énergie. L'hydrogène est stocké sous forme d'hydruide solide, ce qui augmente sa densité énergétique [49] et diminue sa dangerosité. Cependant, les hydrures interstitiels sont seulement capables d'emmagasiner une très faible proportion de leur poids en hydrogène, ce qui limite leur capacité. Une autre solution consiste à utiliser la dégradation du silicium poreux en milieu aqueux pour générer de l'hydrogène [50]. Ce type d'alimentation n'est pas encore envisagé en version implantable avec des réservoirs d'oxygène et d'hydrogène.

Nous voyons donc qu'il existe un verrou important à l'implantation de dispositifs médicaux implantables. Ceux pour lesquels la gamme de puissance dépasse la centaine de μW ne peuvent utiliser de batterie scellée sans être alimentés par une alimentation externe (ce qui

pose des problèmes d'infections à répétition, de vie quotidienne complexe) ou nécessitent une opération chirurgicale pour son changement (qui ne peut être envisagée tous les 6 mois...) sans compter l'éventualité de fuites des composants hautement toxiques de la pile.

Un autre verrou concerne la miniaturisation du compartiment d'alimentation, qui freine le développement de dispositifs miniaturisés comme les « leadless pacemakers » de future génération. En effet, les piles occupent à l'heure actuelle plus de la moitié du volume du dispositif qui sera ancré directement dans le muscle cardiaque. Ce compartiment a une taille importante et la réduction de sa taille conduit automatiquement à une longévité moindre, malgré les progrès de miniaturisation et de consommation de l'électronique embarquée : le micro-contrôleur et la puce de communication font moins de $0,2\text{cm}^3$. Un des moyens recherché est d'augmenter le rapport de puissance volumique.

1.4 Utiliser la biomimétique pour générer de l'énergie

L'un des moyens pour aller plus loin dans la génération d'un nouveau type de batteries ou de piles ouvrant la voie vers les « énergies vertes » du futur, est d'utiliser la notion de biomimétisme. C'est le fait de s'inspirer de la nature pour appliquer ces concepts et stratégies à la création de nouveaux dispositifs qui nous permettent de vivre dans de meilleures conditions.

L'observation de la nature et la compréhension fine du fonctionnement de la machinerie du vivant, au niveau de l'organisme entier, au niveau cellulaire, ou au niveau moléculaire, permet d'envisager la récupération d'énergie par la construction de dispositifs biomimétiques.

Il n'est en effet pas inconcevable d'utiliser l'énergie du corps humain pour alimenter des dispositifs médicaux, le corps jouant alors le rôle de « réservoir » d'énergie. La figure 1.9 illustre les consommations d'énergie de quelques organes, une estimation de l'énergie récupérable ainsi que la consommation de quelques dispositifs implantés [51], [52].

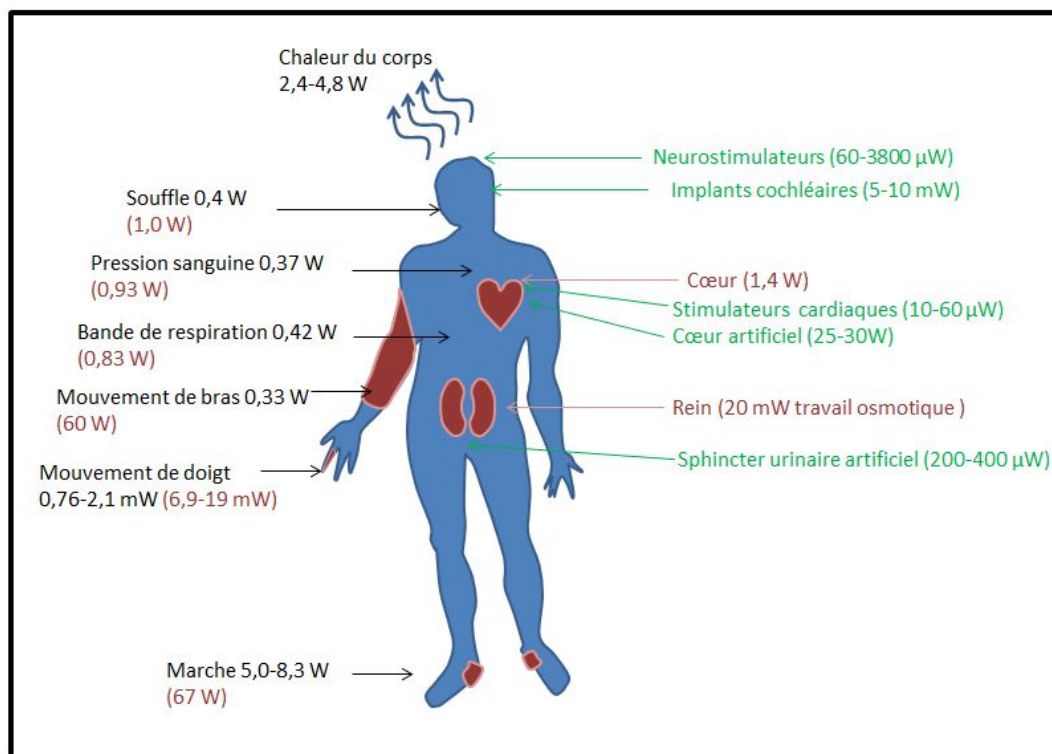


Figure 1.10 : sources d'énergie récupérables du corps humain, consommation énergétique totale et exemples de consommation de dispositifs implantés.

Quand on compare l'énergie consommée par le corps humain pour différentes activités de la vie quotidienne et la puissance demandée par des dispositifs implantables, il semble tout à fait réalisable d'imaginer une récupération d'énergie, même si les dispositifs ont un très faible rendement [51]. Par exemple, le cœur consomme à lui seul 1,4W en moyenne et même 1,75W en tenant compte de l'effet des pulsations [53]. Il est facile d'imaginer qu'un milliwatt de puissance continue, c'est à dire seulement 1‰, pourrait être détourné sans gêner le fonctionnement du cœur. La plupart des recherches impliquent les battements du cœur et les gradients de pression, et certains dispositifs sont presque capables de fournir assez d'énergie pour alimenter un stimulateur cardiaque (10-50 μ W) ou un défibrillateur (25-60 μ W) [53]. Par exemple, Goto *et al* [54] rapportent une puissance de 44 μ W à l'aide d'un transducteur électromécanique implanté dans la paroi du ventricule gauche fournissant respectivement 11 μ J par battement. Starner [51] a calculé qu'à l'aide d'une ceinture placée autour de la poitrine, les mouvements respiratoires pouvaient fournir théoriquement 0,83W.

Cette énergie physique est engendrée au niveau moléculaire par des transformations chimiques ou au niveau cellulaire par des transports ioniques.

La compréhension du fonctionnement du métabolisme oxydatif cellulaire permet l'utilisation du glucose comme source d'énergie dans un système biomimétique. Nous verrons comment détourner la fonction première des enzymes du type oxydo-réductases pour échanger des électrons et produire du courant à partir de molécules à haut pouvoir énergétique comme le glucose.

De même, la compréhension du fonctionnement de l'électrocyte permet d'envisager la fabrication d'un super condensateur permettant d'accumuler de l'énergie sous forme d'un gradient ionique de part et l'autre d'une membrane et de le restituer.

1.4.1 L'énergie physique comme source de courant

Certains groupes de recherche se sont intéressés à la production d'énergie électrique par des dispositifs exploitant l'énergie physique, comme la production de chaleur ou les mouvements du corps. Ces systèmes doivent être adaptés à des fréquences faibles, de l'ordre du Hertz ou de la dizaine d'Hertz pour correspondre aux faibles fréquences des mouvements du corps. Une publication de 2011 [55] décrit la réalisation et la simulation d'un générateur magnétique de 16 mL (1 in³) capable de fournir 1,1mW à une fréquence de résonance de 0,3Hz qui est la fréquence de mouvement des muscles abdominaux lors de la respiration. Lorsque les muscles bougent, le mouvement est transféré à une bobine qui oscille entre 2 aimants, ce qui induit une différence de potentiel au niveau de la bobine. A notre connaissance, ce système, même s'il décrit comment réaliser l'implantation, n'est pas encore implanté *in vivo*.

Les matériels piezo-électriques stimulés par les mouvements des organes ou du corps sont également très prometteurs. Selon Kang [56], si les matériaux, la fabrication, et le design sont optimisés, de tels dispositifs pourront produire quelques centaines de μ W dans un volume de 1cm³.

Sachant que la puissance moyenne développée par la mastication lors d'un seul repas serait de 7 mW, les auteurs d'une étude [57] publiée en septembre 2014 ont créé une mentonnière pouvant générer 10 μ W par couche de PFC, un matériau polymère élastique contenant des éléments piezo électriques. L'ajout d'une 20^{aine} de couches de ce matériau pourrait générer suffisamment d'énergie pour alimenter par exemple une protection auditive intelligente (200 μ W).

Très récemment, Badr *et al* [58] ont réalisé et simulé un générateur d'énergie à partir de matériau piezo-électriques à basse fréquence. Ils ont obtenu des valeurs de puissance de $37,5\mu\text{W}$ avec une fréquence d'excitation du cantilever de $11,7\text{Hz}$ correspondant à la course d'une souris. Ce dispositif, qui dépend de l'activité physique de la souris, nécessite donc la présence d'un compartiment de stockage de l'énergie électrique sous forme d'une batterie rechargeable ou d'une capacité.

C'est le cas pour la plupart des dispositifs décrits dans la littérature [59] utilisant des systèmes physiques de récupération d'énergie, qui ne font qu'évoquer les autres problèmes de l'implantation de tels dispositifs. La faisabilité technique n'implique pas forcément l'application clinique, et aucun de ces systèmes n'est pour le moment implanté *in vivo* sur une longue période de temps.

Ces systèmes ont été testés *in vitro* avec des démonstrations de faisabilité au niveau de la puissance que l'on peut obtenir, mais des facteurs essentiels pour l'implantation comme la biocompatibilité, le stockage de l'énergie produite et le vieillissement sont peu pris en compte dans ces expériences menées *in vitro*.

Il existe aussi des systèmes de générateurs thermo-électriques implantables (TEG) utilisant la différence de température. Une équipe chinoise [60] a modélisé l'utilisation de TEG implantés en sous-cutané chez le lapin pour alimenter une montre digitale, un bon modèle par rapport à la fréquence de stimulation, et arrivent à générer une puissance de $27\mu\text{W}$ avec 2 TEG en série et une différence de température de 1°C de part et d'autre des TEG (entre l'intérieur du corps et la peau). On est là encore assez loin des puissances demandées par des dispositifs nécessitant beaucoup d'énergie.

1.4.2 L'énergie chimique comme source de courant

1.4.2.1 Les piles abiotiques

Le concept de récupération d'énergie chimique à partir du corps humain n'est pas récent. Historiquement, ce sont les piles abiotiques consommant du glucose et de l'oxygène qui ont été les premières testées.

L'oxydation du glucose et la réduction de l'oxygène s'effectue directement sur des électrodes métalliques. Ce type de biopile a été implanté dans les années 1970 chez le chien [61] en sous-cutané au niveau du flanc, avec des électrodes à base de platine dont l'avantage majeur est la stabilité dans le temps. Mais ces systèmes se sont heurtés à des problèmes de biocompatibilité et surtout de puissance.

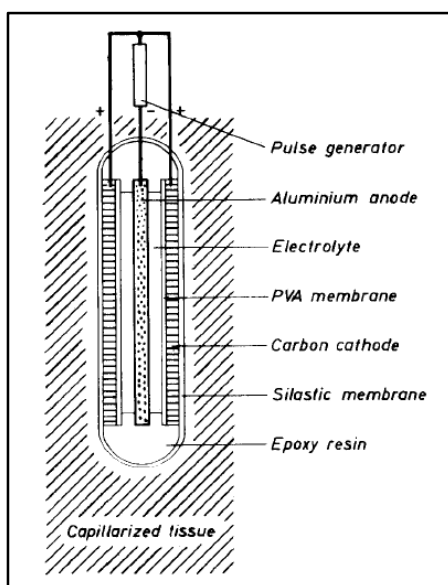


Figure 1.11 : architecture de base d'une pile biogalvanique Al/O₂. La membrane de silastic est poreuse à l'oxygène qui est réduit sur les cathodes en carbone activé. Une membrane polymérique en PVA sépare les 2 électrodes et l'anode en aluminium n'est pas en contact avec les tissus.

Cependant, Weidlich [62] décrit dans une publication de 1976 une biopile abiotique chez le chien avec un résultat tout de même intéressant : la production de 40 μW pendant 5 mois avec une anode en Pt/Ni oxydant le glucose et d'une cathode en carbone activé réduisant l'oxygène. Les 2 électrodes sont séparées par une membrane de cuprophane. Cela correspond toutefois à une puissance surfacique relativement faible de $4\mu\text{W}/\text{cm}^2$.

Dans le domaine des biopiles abiotiques, les recherches actuelles visent à améliorer l'activité catalytique des électrodes. Par exemple, Holade *et al* ont modifié les électrodes de carbone avec des nanoparticules de platine à l'anode et d'or/platine à la cathode. L'implantation de cette biopile dans une orange a pu fournir une puissance de $1,3\text{mW}/\text{cm}^2$ [63].

1.4.2.2 Les biopiles microbiennes

Si l'on regarde le métabolisme cellulaire, les réactions biochimiques génèrent des électrons qui sont transférés sur des molécules organiques lors de réactions d'oxydo-réduction.

L'énergie chimique utilisable sous la forme d'ATP provient principalement de l'oxydation du glucose via la respiration cellulaire.

Dans les organismes, l'oxydation du glucose ne se fait pas en une seule étape et de très nombreuses enzymes interviennent dans le processus. Par exemple, le passage du glucose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) au pyruvate ($\text{C}_3\text{H}_3\text{O}_3$) fait intervenir pas moins de 10 enzymes, chacune générant des molécules avec un niveau d'oxydation différent : ce sont des réactions de décarboxylation et d'oxydo-réduction avec des échanges d'électrons et de protons. L'oxydation complète d'une molécule de glucose génère 12 paires d'électrons, ce qui équivaut à une énergie de 4 kcal soit 17 kJ par gramme de glucose.

Le métabolisme énergétique de la cellule peut être mis à profit pour générer de l'électricité. C'est le cas des biopiles microbiennes. Le concept de ces biopiles n'est pas

récent, il remonte au début du 20^{ème} siècle [64]. Ces biopiles connaissent un intérêt grandissant depuis une dizaine d'année motivé par les problèmes de pollution de l'environnement.

On trouve dans la littérature le développement de biopiles microbiennes [65], [66] où les bactéries sont reliées directement à l'anode et génèrent du courant par leur propre métabolisme en respirant non pas de l'oxygène mais des oxydes de fer. Les puissances obtenues sont très fortes, de l'ordre de 1 mW/cm² [67]. Les électrons sont transférés directement de la membrane externe à l'électrode métallique via des cytochromes, des pili ou des médiateurs synthétisés par les bactéries. Les biofilms formés à l'anode sont très stables dans le temps. A la cathode, on a réduction d'oxygène en eau.

Xie *et al* [68] ont publié en 2013 des résultats intéressants sur une véritable batterie rechargeable en utilisant une anode microbienne et une cathode en oxyde d'argent réoxydable. L'équipe de Minteer a créé en 2008 la première biopile à base d'organelle avec la connexion sur une électrode de carbone recouverte de Nafion[®] de mitochondries. Ces mitochondries transfèrent leurs électrons à l'électrode par l'intermédiaire de la cytochrome C oxydase et réalisent l'oxydation complète du pyruvate. Ce système a fonctionné plus de 2 mois *in vitro* [69]. En 2013, cette même équipe a mis au point une biopile dont l'anode est composée de thylacoïdes transformant l'eau en O₂ et d'une cathode à laccase réalisant la réaction opposée, permettant de créer un courant à partir de lumière [70].

1.4.2.3 Les biopiles enzymatiques

Il est également possible d'utiliser ces réactions d'oxydo-réduction pour fabriquer une biopile enzymatique. La littérature [71] est de plus en plus riche sur ces systèmes de production énergétique et la quantité de publications a été multipliée par 15 en 10 ans avec une croissance exponentielle. De nombreux biocapteurs constitués de métaux catalytiques (piles abiotiques) ou d'enzymes immobilisées (biopiles) ont été développés pour leur spécificité et leur durée de vie compatibles avec leur utilisation [72], [73] mais la plupart des publications actuelles focalisent sur les biocapteurs non enzymatiques.

Une biopile enzymatique est un dispositif capable de générer de l'énergie électrique à partir de la transformation chimique de substrats grâce à des oxydo-réductases. Ces enzymes catalysent les réactions d'oxydo-réduction des substrats biologiques au niveau des bioélectrodes de façon substrat-spécifique.

Nous nous focaliserons dans ce travail de thèse sur le fonctionnement la biopile glucose/dioxygène et de son implantation chez l'animal. La biopile est composée d'une anode oxydant spécifiquement le glucose grâce à une enzyme qui catalyse son oxydation en produisant des électrons et des protons. Les électrons récupérés dans le circuit électrique permettent de réduire l'oxygène au niveau de la cathode, également par l'intermédiaire d'une enzyme. La réaction d'oxydation du glucose, qui a normalement lieu *in vivo*, est découplée en deux ½ réactions formant ainsi une biopile.

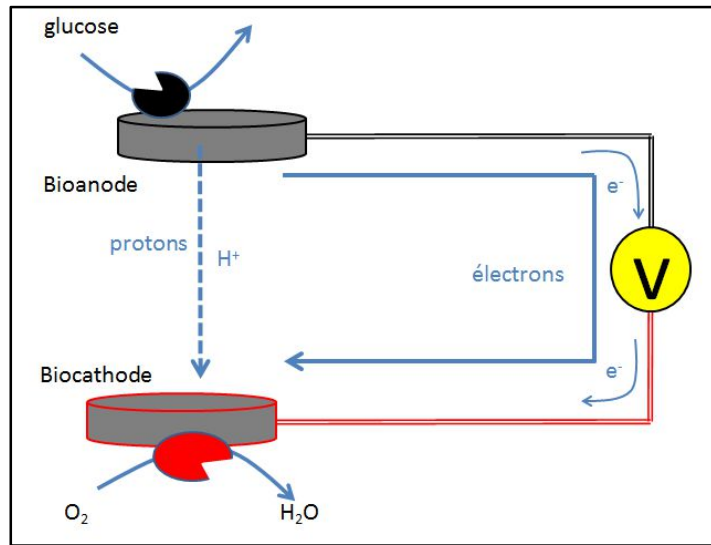


Figure 1.12 : principe de fonctionnement de la biopile enzymatique glucose/O₂

Une grande variété de systèmes enzymatiques peut être utilisée en fonction du substrat, des produits, et des potentiels électrochimiques des enzymes [74]. Le couplage de différentes enzymes sur une même électrode permet d'augmenter la quantité d'électrons transférés et donc la puissance de la biopile, comme c'est le cas pour cette biopile utilisant 6 déshydrogénases pour l'oxydation complète du lactate [75]:

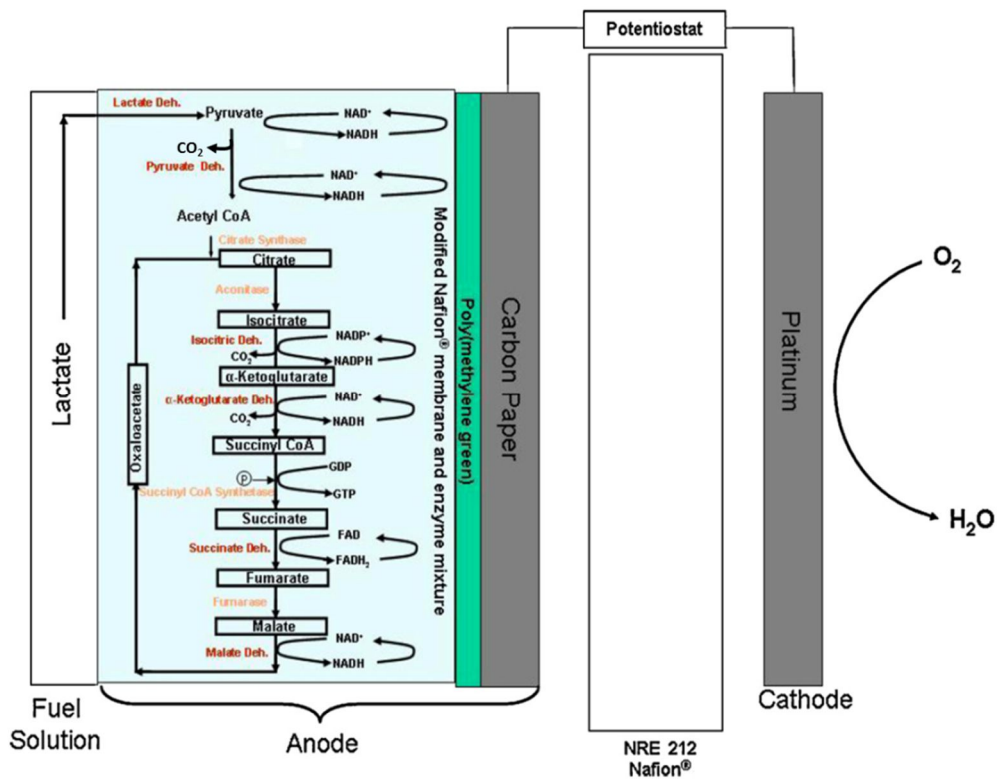


Figure 1.13 : schéma d'une biopile lactate/air (d'après [75])

Cependant, l'activité de la LDH est dépendante des conditions dans lesquelles elle agit, notamment une augmentation de la force ionique diminue fortement son activité. De fortes concentrations en lactate, pyruvate et coenzymes affectent également les performances de la biopile.

Un dispositif externe sous la forme de textiles alimentés par le lactate contenu dans la sueur a été récemment [76], [77] mis au point et a permis d'alimenter une LED fixé sur un bandeau frontal en produisant $100\mu\text{W}/\text{cm}^2$ mais ce système non invasif reste dépendant des variations importantes de lactate dans la sueur et également de la quantité de sueur. A ce jour, il n'y a pas de biopile implantée fonctionnant avec le lactate.

1.4.2.4 La biopile glucose/oxygène

Comme nous l'avons vu plus haut, le concept de récupération d'énergie électrique via des biopiles implantées n'est pas récent, mais un regain d'intérêt a commencé dans les années 2000 avec l'arrivée de nanomatériaux comme les nanotubes de carbone ou les nanoparticules d'or. 2 verrous ont été levés : la spécificité des enzymes connectées a permis de s'affranchir de la membrane séparant les 2 électrodes [78] et la surface spécifique des électrodes a considérablement augmenté [79].

Les exemples restent cependant peu nombreux et ont commencé en 2003 avec une biopile fonctionnelle dans un grain de raisin par Mano *et al* [80] avec une pile fournissant $240\mu\text{W}/\text{cm}^2$ avec un potentiel de 0,55V. Les enzymes utilisées étaient la glucose oxydase et la bilirubine oxydase immobilisées sur des microélectrodes de carbone. En 2010, la même équipe a montré le fonctionnement d'une biopile avec le même système enzymatique optimisé en utilisant des électrodes contenant des nanotubes de carbone [81] et plantées dans un cactus [82]. Le fonctionnement de la biopile a été montré de manière élégante grâce au phénomène de photosynthèse : la production d'oxygène et de glucose par la plante a en effet augmenté le courant de la biopile lorsque le cactus est éclairé. On ne peut pas dans ce cas véritablement parler d'implantation, car les électrodes sont littéralement plantées (et non pas implantées) dans le végétal. Il en est de même pour des implantations de biopiles dans le règne animal chez des mollusques et les arthropodes [83]–[85]. Les avantages majeurs de ces travaux sur l'escargot ou le cafard sont l'existence d'une hémolymphe donc une concentration plus forte en O_2 directement mobilisable, non fixé à l'hémoglobine : la diffusion est directe de l' O_2 vers l'électrode, ce qui augmente le rendement de la biopile. Dans tous ces cas, la chirurgie pratiquée est extrêmement rudimentaire, au sens où les biopiles sont littéralement plantées dans l'organisme sans souci de biocompatibilité ni de stérilité.

1.4.2.5 Aspects éthiques de l'expérimentation animale

L'aspect éthique doit aussi être pris en compte : des expériences sur la blatte suscitent moins de questions que sur un animal proche de l'homme, mais on risque par là de s'éloigner du but ultime de ce type d'implantation, notamment concernant les problèmes d'immunité et de biocompatibilité. L'expérimentation animale suit des protocoles stricts dans le respect de la législation concernant le bien-être animal, notamment en appliquant la règle des 3R [86] :

-Lorsqu'il n'est pas possible d'utiliser une méthode alternative (« Remplacer »), on choisit alors les animaux les moins sensibles du point de vue de la neurophysiologie : les animaux étant pourvu d'un système nerveux, ils sont donc doués de sensibilité et les contraintes imposées à l'animal doivent être parfaitement justifiées.

-Il faut « réduire » le nombre d'animaux utilisés lors de l'étude tout en veillant à pouvoir accéder à des données valides et reproductibles.

-L'usage d'anesthésiques et d'antalgiques est obligatoire (« raffiner ») de façon à réduire la souffrance animale. Depuis quelques années (2012), s'ajoute à cet usage l'enrichissement du milieu qui prend une part de plus en plus importante dans la bonne tenue des expérimentations. En effet, le transport, la manipulation, les soins, et les conditions d'hébergement sont autant de sources de stress qui peuvent perturber les animaux de laboratoire, ce qui modifie profondément non seulement leur comportement mais également les processus physiologiques et biochimiques. Une des premières expériences démontrant l'intérêt de l'enrichissement du milieu concerne l'épaississement du cortex cérébral [86] chez le rat (1990). Ce fait est maintenant bien établi et il existe une littérature très bien documentée sur l'influence de l'environnement physique et social sur les résultats de la recherche [87], [88].

La démarche éthique ne concerne pas seulement le respect de la réglementation. Une part importante implique la volonté personnelle de l'expérimentateur. Dans ce cadre, la règle des « 3R » devient « 4R » avec la Responsabilité de l'expérimentateur, qui doit mener une étude éthique préalable au protocole mis en place. Pour aider l'expérimentateur, il existe des échelles quantitatives mesurant le degré de pertinence de l'utilisation de l'expérimentation animale [90], [91], le but étant d'atteindre le meilleur score possible dans toutes les catégories.

Il faut également être conscient que la transposition de l'animal à l'homme conduit parfois à des résultats inattendus. On peut citer l'exemple de TGN1412, un anticorps développé pour vaincre les maladies auto-immunes chez l'homme. Cette molécule anti-CD28 des lymphocytes T régulateurs induit une diminution de la réponse auto-immune chez le rat, la souris et le singe, ... mais a l'effet inverse chez l'homme [92]. Les résultats obtenus ne sont pas toujours transposables à l'homme. Le but ultime est l'implantation chez l'homme, on essaie donc de se rapprocher au mieux de ce modèle tout en tenant compte des spécificités d'espèce.

La notion de biocompatibilité est l'un des challenges posés à l'heure actuelle pour le fonctionnement d'une biopile à glucose chez l'homme. En effet, ce type d'implant est extrêmement novateur au sens où il nécessite des échanges de matière avec son environnement. Cela nécessite une parfaite biocompatibilité pour ne pas engendrer de réaction inflammatoire pouvant provoquer le rejet de l'implant qui doit s'intégrer à l'organisme tout en continuant à fonctionner.

1.4.2.6 L'implantation d'une biopile glucose/oxygène chez le rat

Nous avons réalisé en 2010 la première implantation d'un biopile chez un mammifère [93], le rat. Le système enzymatique comprend la glucose oxydase et la catalase à l'anode et la polyphénol oxydase à la cathode.

1.4.2.6.1 La Glucose Oxydase

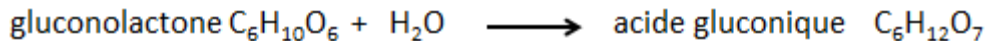
La glucose oxydase utilisée est produite par un champignon filamenteux, *Aspergillus niger* [93], [94] très utilisé dans l'industrie pour ses fermentations multiples (acide gluconique, acide citrique) et sa capacité de sécrétion de protéines (pectinases, protéases et amyloglucosidases, hémicellulases, ...). La littérature est controversée sur la localisation de l'enzyme (peroxysomale ou extracellulaire) [96]–[98].

C'est une glycoprotéine de 160 KDa contenant deux sous-unités identiques avec chacune un centre rédox flavinique. Elle catalyse la réaction d'oxydation du glucose en

gluconolactone par l'intervention de son cofacteur FAD (flavine adénine dinucléotide), enfoui dans le site actif de l'enzyme. Son k_M est de 120mM, ce qui en fait une enzyme peu affine pour le glucose mais une glycémie de 5 mM est loin d'être une concentration saturante. La V_{max} est de $0,143 \text{ min}^{-1}$ [98].



La gluconolactone est convertie en acide gluconique de façon spontanée par addition d'une molécule d'eau. L'acide gluconique est ensuite dégradé en ribulose (voie des pentoses) ou en pyruvate + glyceraldéhyde (C3).



La régénération sous forme oxydée du cofacteur flavinique s'opère par l'intermédiaire de l'oxygène qui peut diffuser facilement jusqu'au site actif et servir d'accepteur final:

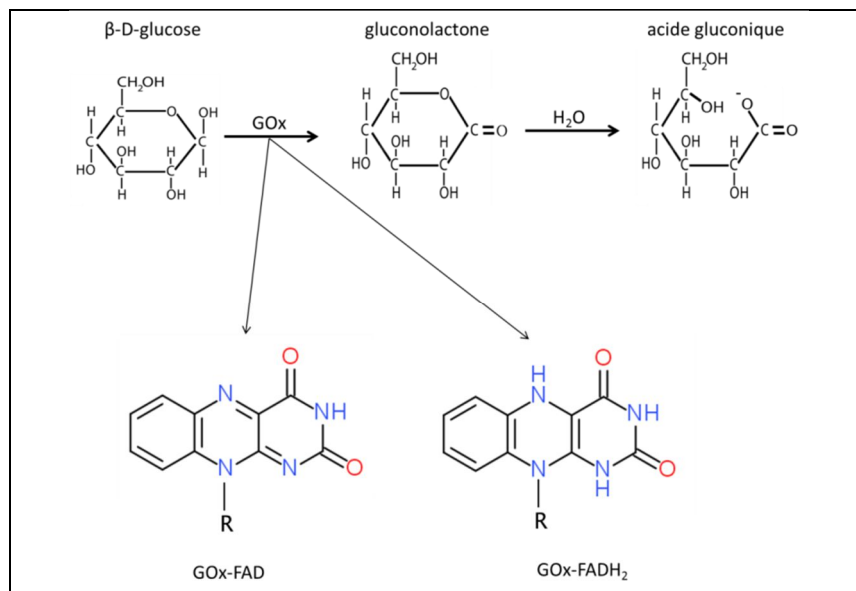
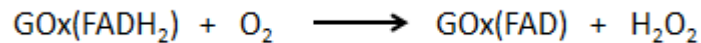
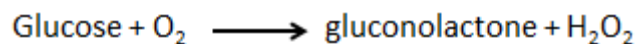
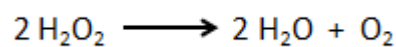


Figure 1.14 : mécanisme d'oxydation du glucose par la Glucose oxydase (D'après [100])

Le bilan de la réaction d'oxydation du glucose est donc :



Le peroxyde d'hydrogène produit lors de la régénération du cofacteur flavinique n'est pas un sous-produit de la réaction. Il est converti en oxygène et en eau par la catalase, ou sert de substrat aux peroxydases pour la dégradation des substrats sur lequel le champignon pousse:



Le bilan général de l'action de la glucose oxydase et de la catalase peut alors s'écrire :



Cette enzyme existe également chez les orthoptères, notamment le criquet [101]. Sa production a lieu dans la cuticule et sa fonction serait de générer du peroxyde d'hydrogène agissant comme agent antibactérien. Il n'existe pas de glucose oxydase chez les mammifères. Cependant, la gluconolactone et l'acide gluconique entrent dans le métabolisme chez l'homme sous forme de phosphogluconolactone et d'acide phosphogluconique. Nous y reviendrons dans le prochain chapitre.

1.4.2.6.2 La Polyphénol Oxydase

L'enzyme Polyphénol Oxydase (PPO) (E.C.1.14.18.1, from Mushroom) est présente dans presque tout le règne vivant (bactéries, champignons, plantes, mammifères). Elle intervient dans la synthèse des catécholamines (adrénaline, dopamine) et des pigments (bétalaïnes des plantes et des champignons ou de la mélanine chez l'homme) à partir de tyrosine. On la trouve sous plusieurs noms : polyphénol oxydase, tyrosinase, catécholoxydase ou monophenol monooxygénase.

La PPO de champignon utilisée est une métalloprotéine tétramérique de poids moléculaire 128 kDa. L'enzyme est composée de 2 sites actifs accueillant les composés aromatiques et d'un site actif de type III contenant 2 atomes de cuivre, chacun coordonnant 3 histidines et l'oxygène moléculaire [102].

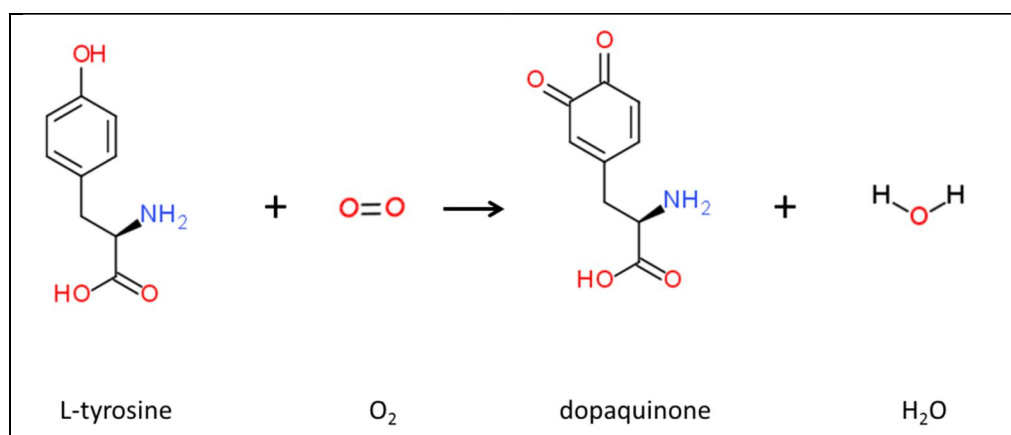


Figure 1.15 : réaction catalysée par la tyrosinase (PPO)

La réaction de réduction de l'oxygène en eau est une réaction à 4 électrons. Elle a été choisie pour sa capacité à fonctionner à pH 7 sans être inhibée par les chlorures ce qui est le cas pour la laccase [103] dont le pH optimum est de 5, ni inhibée par des ions urates, comme c'est le cas de la bilirubine oxydase [104].

1.4.2.6.3 L'immobilisation des enzymes

L'immobilisation des enzymes sur l'électrode peut être réalisée de 4 façons différentes : par adsorption, par greffage covalent, par piégeage dans une matrice ou encore par confinement grâce à une membrane semi-perméable [105].

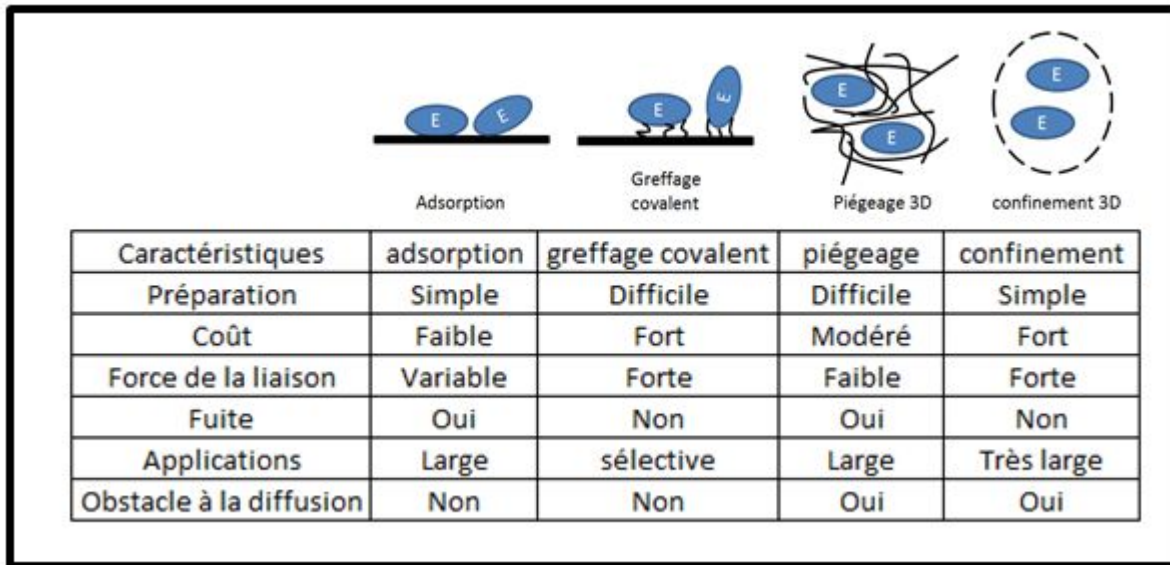


Figure 1.16 : les 4 systèmes d'immobilisation des enzymes sur une électrode (D'après [105])

L'adsorption est la technique la plus simple et historiquement la première utilisée dans la fabrication de biopiles. L'incubation d'une électrode dans une solution enzymatique a permis la mise en évidence d'un transfert direct d'électrons montrant la biocatalyse enzymatique par voltamétrie cyclique [106]. Les interactions (électrostatique, Van der Waals ou hydrophobe) varient en fonction de l'enzyme et du support d'électrode utilisé. Cependant, la stabilité de ce système est peu garantie car les enzymes peuvent se désorber de la surface et l'enzyme est alors relarguée dans le milieu sans plus interagir avec l'électrode.

Le greffage covalent des groupements amines des protéines sur des supports fonctionnalisés avec des résidus acétyle, carboxyle ou époxy permet l'immobilisation des enzymes de manière pérenne, mais la rigidité de la liaison nuit alors à l'activité de l'enzyme. Une autre stratégie de greffage, menée par Katz *et al* [107], a consisté à relier chimiquement le FAD à une électrode d'or par l'intermédiaire d'un rotaxane puis à ajouter l'apoenzyme :

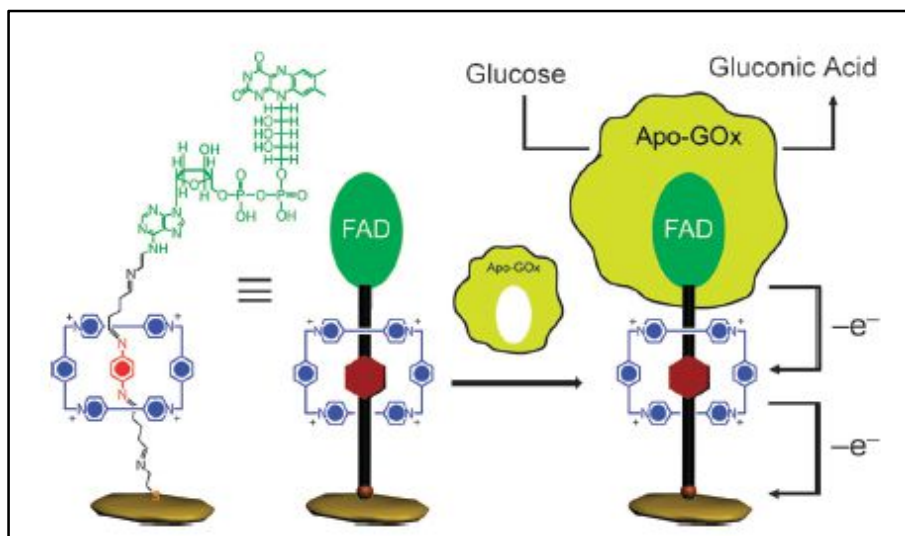


Figure 1.17 : greffage covalent d'un FAD à une électrode. Un bras de rotaxane relie de façon covalente le groupement flavinique à l'électrode. L'ajout de l'apoenzyme permet la récupération des électrons lors de l'oxydation du glucose (reproduit de [107])

Le piégeage dans une matrice a pour effet d'augmenter la stabilité du système mais diminue également l'activité si le liant est non conducteur. Les recherches actuelles concernent l'utilisation de matériaux nanostructurés pour à la fois stabiliser les enzymes tout en augmentant la surface spécifique des électrodes.

Pour notre biopile, les enzymes ont été compressées à l'aide d'une presse hydraulique après homogénéisation avec une poudre de graphite, des médiateurs redox, de l'eau et du glycérol, ce qui permet d'obtenir une pastille plus solide. Le phénomène majoritaire qui intervient alors est une adsorption des enzymes sur le graphite, facilité par l'ajout de solvant.

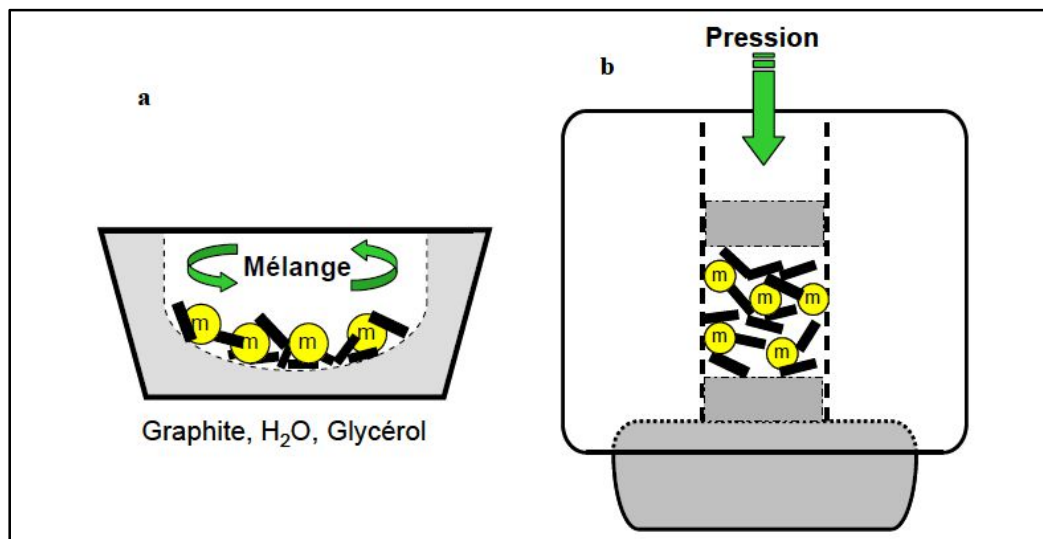


Figure 1.18 : fabrication des électrodes sous forme de disques compressés : a- mélange intime des constituants dans un mortier ; b- compression dans un moule cylindrique par une presse hydraulique (Reproduit de [108]).

1.4.2.6.4 Les médiateurs électrochimiques

Le principal verrou réside la connexion électrique de l'enzyme sur l'électrode, car le site actif est enfoui au cœur de l'enzyme et l'orientation de l'enzyme lors de son greffage est d'une importance capitale. Ce transfert d'électrons entre l'enzyme et l'électrode ne peut s'effectuer que dans certaines conditions.

Dans certains cas, le transfert électronique peut être direct (Direct Electronic Transfert DET). Ceci ne peut s'effectuer de manière efficace que si l'électrode est dans une bonne configuration et au voisinage proche des centres redox de l'enzyme. Ce type de transfert est difficile à mettre en œuvre et une simple adsorption de GOx sur une électrode d'or par exemple n'est pas suffisante pour générer un flux d'électrons, car le transfert électronique décroît de manière exponentielle avec la distance séparant les centres impliqués. Il a été calculé que dans les protéines, un taux de transfert électronique chute d'un facteur 10 000 quand la distance entre un site accepteur et un site donneur augmente de 8 à 17 Å [109]. La GOX a un rayon de 43 Å [110] et les centres redox sont profondément enfouis dans le cœur de l'enzyme. On comprend aisément que dans ces conditions, le transfert n'est pas des plus simples.

Degani and Heller [111], [112] ont réalisé un DET en greffant sur la GOX des molécules d'acide ferrocène carboxylique servant de relais du centre FAD à la surface de l'enzyme. Le mécanisme de DET a fait l'objet de vives controverses [113], [114] mais il est démontré à l'heure actuelle, par exemple par l'utilisation d'une biopile glucose/oxygène comme super condensateur [115]: la tension reste stable pendant plusieurs jours de fonctionnement avec des décharges de 10ms espacées de 10s.

La solution que nous avons envisagée dans cette première version de biopile implantée est l'utilisation de médiateurs redox qui permettent le transfert des électrons de l'enzyme à l'électrode (Mediated Electronic Transfert). L'avantage est une excellente connexion électrique donc un courant élevé. L'inconvénient majeur du MET consiste dans le choix judicieux de la molécule en fonction de sa taille, son potentiel rédox, sa toxicité et son maintien au sein de la bioélectrode.

L'anode est constituée d'un disque compressé de poudre de graphite (matériau conducteur) contenant du coenzyme Q10 (ubiquinone), de la GOX et de la catalase.

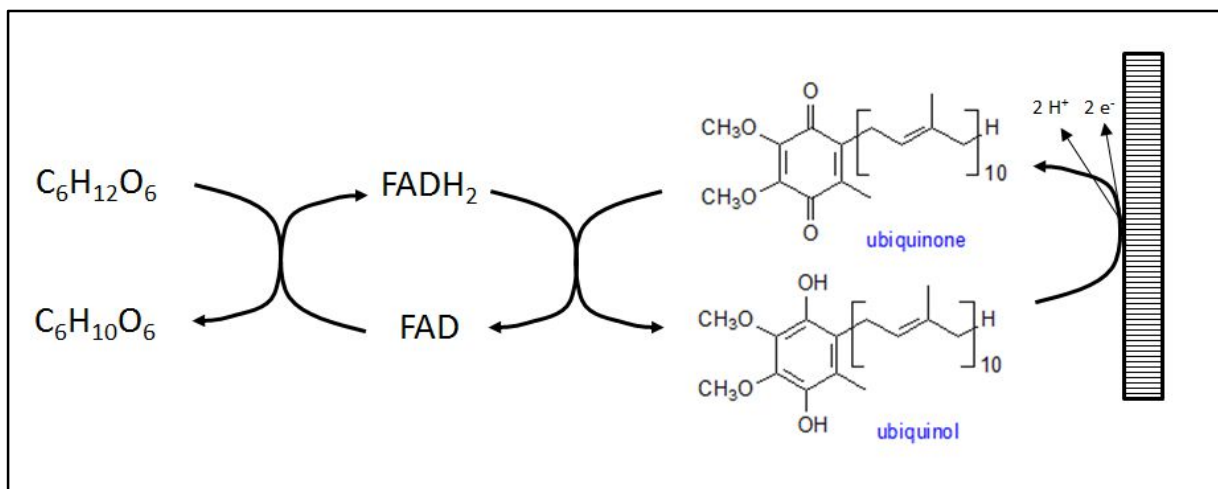


Figure 1.19 : ½ réaction à la bioanode

Le transfert électronique est rendu possible vers le coenzymeQ10, car le potentiel du médiateur est plus faible que celui de l'enzyme. D'un point de vue électrochimique, on abaisse donc le potentiel de la réaction mais on augmente le flux d'électrons : le bilan reste positif. Le CoQ est un lipide rédox de la chaîne respiratoire mitochondriale, il n'est pas toxique [115] aux concentrations utilisées (0.2g/Kg).

Comme l'enzyme n'est pas directement connectée à l'électrode, une partie non négligeable de la GOx est réoxydée avec l'oxygène et donne comme produit secondaire de l'eau oxygénée. Or, il est nécessaire de limiter la production d'H₂O₂ pour plusieurs raisons :

- Cette réaction entre en compétition avec le transfert d'électrons à l'électrode
- Elle est consommatrice d'oxygène et va diminuer la biodisponibilité de ce substrat, utilisé par la cathode
- L' H₂O₂ produit, en sa qualité d'espèce réactive de l'oxygène (ROS), peut inactiver les enzymes de façon irréversible et donc nuire au bon fonctionnement de la pile
- L' H₂O₂ produit peut provoquer des dommages cellulaires importants dans l'organisme

Les ROS produits peuvent être pris en charge par le Coenzyme Q10, mais l'ajout de catalase lors de la fabrication de l'électrode s'avère plus efficace en réduisant localement la

concentration de peroxyde d'hydrogène. On pourrait penser que la catalase restaure partiellement la concentration d'oxygène locale mais son ajout ne permet cependant pas d'augmenter l'activité de la GOX *in vitro* [117].

D'autres solutions existent pour s'affranchir de ce problème comme l'utilisation d'autres enzymes [118], par exemple la glucose deshydrogénase à NAD [119] dont le cofacteur n'est pas enfoui dans l'enzyme (mais il faut alors régénérer le NAD⁺) ou d'une GDH possédant un autre cofacteur, par exemple la pyrrolo-quinoline quinone PQQ [120]–[122]. L'accepteur final peut alors être différent de l'oxygène, des quinones par exemple.

De même, à la cathode, la quinhydrone a servi de médiateur pour le transfert électronique:

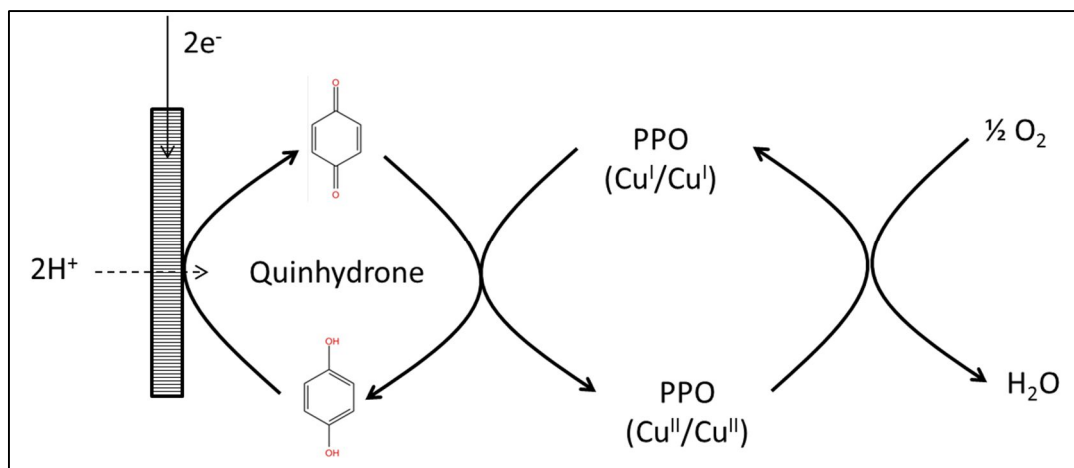
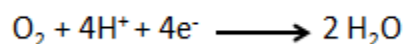


Figure 1.20 : ½ réaction à la biocathode

Lorsque l'on constitue une biopile avec une enzyme et une électrode, on cherche à capter ou libérer au niveau des électrodes les électrons intervenant dans les réactions d'oxydo-réduction qui ont lieu au niveau du site actif de l'enzyme. Dans le cas de l'anode [111], [112], les électrons du FADH₂ porté par la glucose oxydase doivent être transférés à l'électrode pour permettre la réoxydation de l'enzyme :



L'accepteur d'électrons n'est plus l'oxygène mais l'électrode elle-même, et les électrons sont alors libres de circuler dans le circuit électrique jusqu'à la cathode, où ils sont récupérés pour réduire l'oxygène en eau par l'intermédiaire de la polyphénol oxydase:



Les protons quant à eux sont libérés dans le milieu.

Si l'on classe les réactions enzymatiques sur une échelle de potentiel rapportée au potentiel du couple AgCl/Ag à pH=7, les potentiels standards des couples redox gluconolactone/glucose et O₂/H₂O sont respectivement de -0,57 V et +0,61 V. La différence de potentiel théorique est donc proche d'1V. Le potentiel global de la réaction prend également en compte les enzymes utilisées et la présence de médiateurs [123].

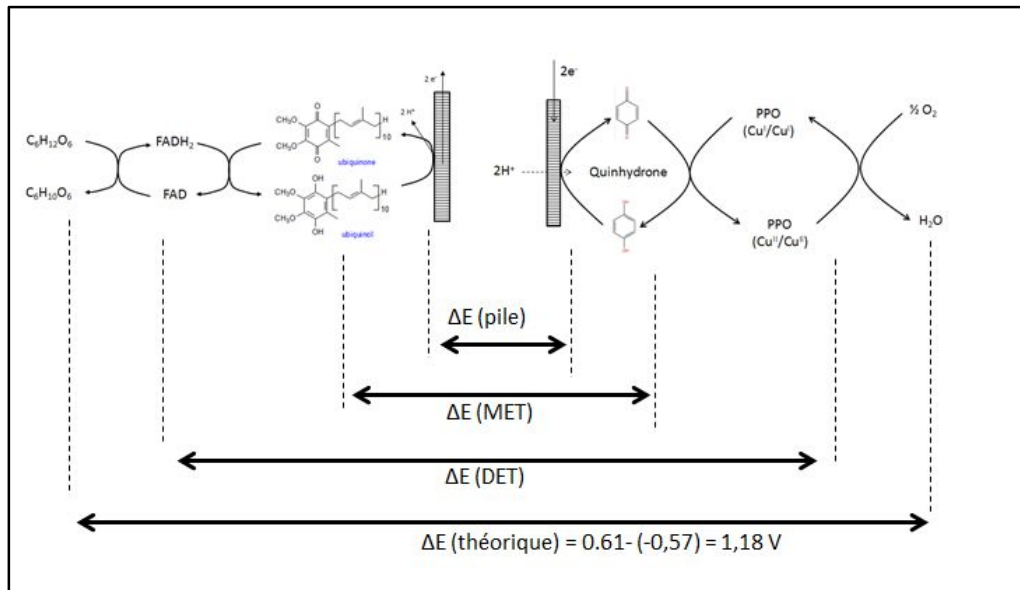


Figure 1.21 : potentiels obtenus dans différentes configurations de connexion d'enzymes aux électrodes.

Différents paramètres influencent la performance des bioélectrodes au niveau de leur structure fine : le potentiel de la biopile est dépendant des potentiels des enzymes et des médiateurs, de la cinétique des enzymes, mais également de la distance entre l'électrode et le site actif. La densité de courant est dépendante de la diffusion dans le réseau d'électrode formé par le polymère conducteur et le liant. Enfin la structure 3D et l'activité de l'enzyme affectent à la fois le potentiel et le courant lors de son immobilisation.

La valeur du potentiel et le courant obtenu sont cruciaux pour l'alimentation de dispositifs quels qu'ils soient, car l'électronique actuelle n'est pas adaptée pour un fonctionnement à si bas potentiel. Nous reviendrons sur cet aspect plus loin dans le texte.

1.4.2.6.5 Fabrication de la biopile et enrobage

Une fois les pastilles obtenues par compression, elles sont ensuite connectées à un fil de platine grâce à une encre conductrice à base de carbone.

Le fil de platine est soudé à un fil de cuivre et son isolation électrique est réalisée par un cathéter en polyéthylène. Les jonctions sont recouvertes d'un film de silicone pour parfaire l'isolation et conférer à la pastille une tenue mécanique, rendant l'ensemble biocompatible :

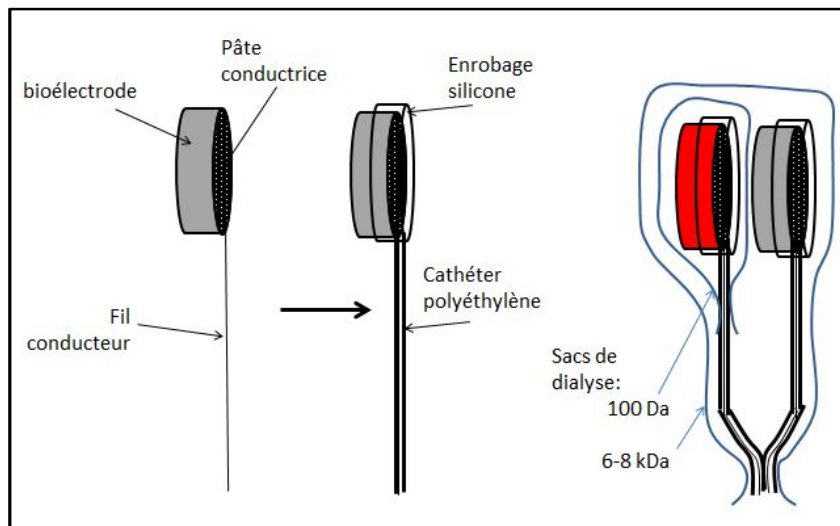


Figure 1.22 : fabrication et enrobage de la biopile de 1ère génération

Même si les enzymes et les médiateurs sont fortement compressés et plus ou moins immobilisés au sein de la pastille, on ne peut exclure un certain relargage lors de l'implantation. Pour cette raison, on confine l'enzyme à l'aide de membranes semi-perméables d'acétate de cellulose de porosité choisie en fonction des médiateurs : la cathode est enrobée d'un boudin de dialyse avec un seuil de coupure de 100 Da pour éviter le passage de la quinhydrone fortement hydrosoluble. Pour l'anode, il a été considéré que l'hydrophobicité de l'ubiquinone était un facteur suffisant pour son maintien au sein de l'électrode.

La biopile entière est ensuite ensachée dans un boudin de dialyse ayant un seuil de coupure de 6-8000 Da, évitant la fuite des enzymes vers l'organisme mais également le passage des anticorps de l'organisme vers la biopile. Cette membrane de dialyse constitue donc une barrière filtrante permettant le passage des substrats et des produits de réaction, tout en limitant le passage des grosses molécules et des médiateurs. C'est l'une des originalités majeures de ce dispositif, le premier conçu spécifiquement pour permettre des échanges de matière entre un dispositif médical et les liquides physiologiques humains.

Pour fermer de façon efficace le boudin de dialyse en laissant passer le cathéter contenant les fils, nous avons réalisé une épissure avec du fil de nylon autour du boudin de dialyse replié sur lui-même.

1.4.2.6.6 Biocompatibilité et réponse de l'organisme à un corps étranger

La littérature sur l'implantation de dispositifs médicaux et la réponse de l'organisme est très largement documentée [124]–[127] mais concerne uniquement les implants biodégradables ou les implants scellés. Tout est mis en œuvre par l'organisme pour éliminer le corps étranger. Pour fonctionner *in vivo*, les bioélectrodes nécessitent un enrobage permettant la diffusion des substrats et des produits mais évitant au corps de réagir trop violemment en rejetant l'implant.

Lors de l'implantation d'un objet chez les mammifères, il se produit un ensemble de mécanismes réactionnels de défense connus sous le nom d'inflammation. C'est un phénomène complexe qui fait intervenir tout un ensemble de cellules phagocytaires (polynucléaires neutrophiles, macrophages, ...) et de médiateurs permettant de moduler la réponse immunitaire (radicaux libres, cytokines, histamine, ...).

S'ajoute à cette réponse cellulaire une réponse innée humorale qui consiste en tout premier lieu en l'activation du complément. C'est la cascade biochimique non spécifique la plus importante pour la reconnaissance, l'opsonisation et l'élimination de corps étrangers.

La réponse inflammatoire aiguë est nécessaire et permet à l'organisme de maintenir son intégrité. La réaction inflammatoire aiguë varie en intensité et en temps (de quelques minutes à quelques jours) suivant les paramètres physico-chimiques de l'implant (forme, topologie, et taille) et en fonction de la blessure engendrée par l'opération et le lieu d'implantation. La réponse cellulaire est initiée par les cellules dendritiques et les macrophages. Ces derniers initient le démarrage de la réaction inflammatoire en produisant des cytokines et des chimiokines. Les cytokines permettent la dilatation et l'augmentation de perméabilité des vaisseaux. Les chimiokines, comme l'interleukine 8 par exemple, sont des cytokines chimiotactiques permettant le recrutement par diapédèse sur le site de l'inflammation des polynucléaires neutrophiles et des monocytes qui se différencient en macrophages, dont le rôle est de phagocyter le corps étranger. Parallèlement, il y a production de matrice extracellulaire et notamment de fibrine à un stade précoce, ce qui initie l'angiogenèse ainsi que la réorganisation et la réparation tissulaire.

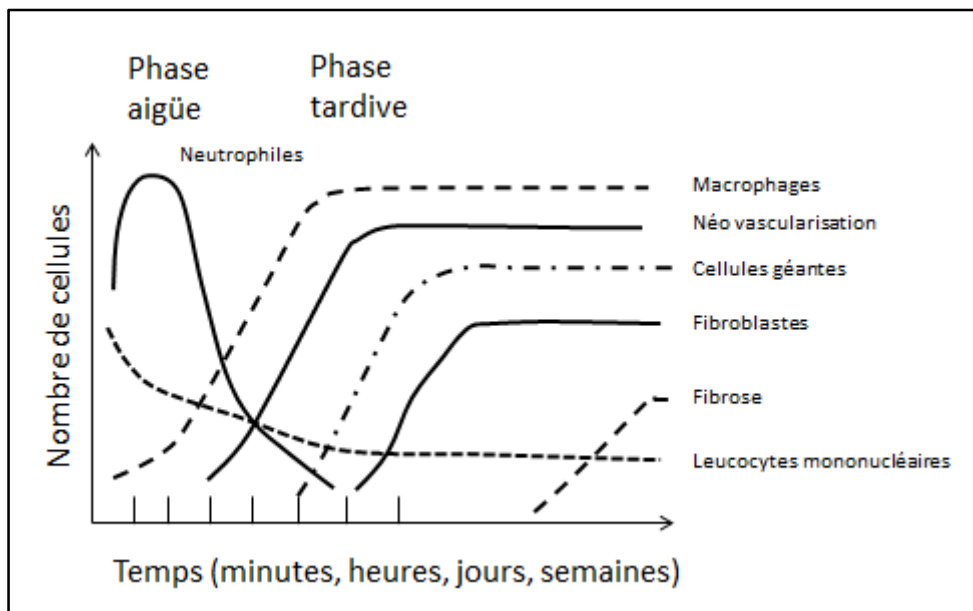


Figure 1.23 : variation au cours du temps de la réponse inflammatoire aiguë et tardive. L'intensité de la réponse et la variabilité dans le temps dépendent du site d'implantation et de la taille, de la structure, et des propriétés physico-chimiques de l'implant (reproduit d'après [127])

Cependant, la réponse inflammatoire peut devenir chronique et générer des complications qui mènent parfois au rejet de l'implant.

Lorsque le corps ne rejette pas l'implant, il finit par le dégrader ou l'encapsuler. Ce phénomène commence à une phase plus tardive de l'inflammation, et s'appelle réaction aux corps étrangers (FBR, pour foreign body reaction). Celle-ci implique l'adsorption à la surface de l'implant de biomolécules et de protéines, suivie d'une adhésion cellulaire. Elle fait intervenir des macrophages qui tentent de phagocyter l'implant et que l'on peut classer en 2 catégories [128], [129] : les macrophages de type M1 favorisent l'inflammation en produisant eux-mêmes des cytokines (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12 et IL-23) actives sur les lymphocytes T helper 1[130] et des chimiokines (IL-8, MCP-1, and MIP-1 β) qui attirent les cellules de l'inflammation. Les macrophages de type M2 ont une action anti-inflammatoire en produisant

des facteurs favorisant l'angiogénèse (TGF- β , VEGF) pour le type M2a et essentiellement l'IL-10 pour type M2b. Les macrophages de type M2 favorisent donc le remodelage tissulaire et la cicatrisation (M2a) ainsi que l'atténuation de la réponse inflammatoire (M2b).

Lorsque les macrophages ne peuvent pas dégrader l'implant, ils fusionnent en formant des cellules géantes [131]. Ces cellules géantes polynuclées dégradent progressivement le biomatériau ou forment le plus souvent un kyste dépourvu de vaisseaux (FBC, pour foreign body capsule). La formation de cette capsule dépend de la structure physico-chimique du matériau implanté et de sa topographie. Par exemple, un implant poreux générera une réponse contenant de nombreux macrophages et des cellules géantes alors qu'un implant à surface lisse sera essentiellement constitué de fibrose.

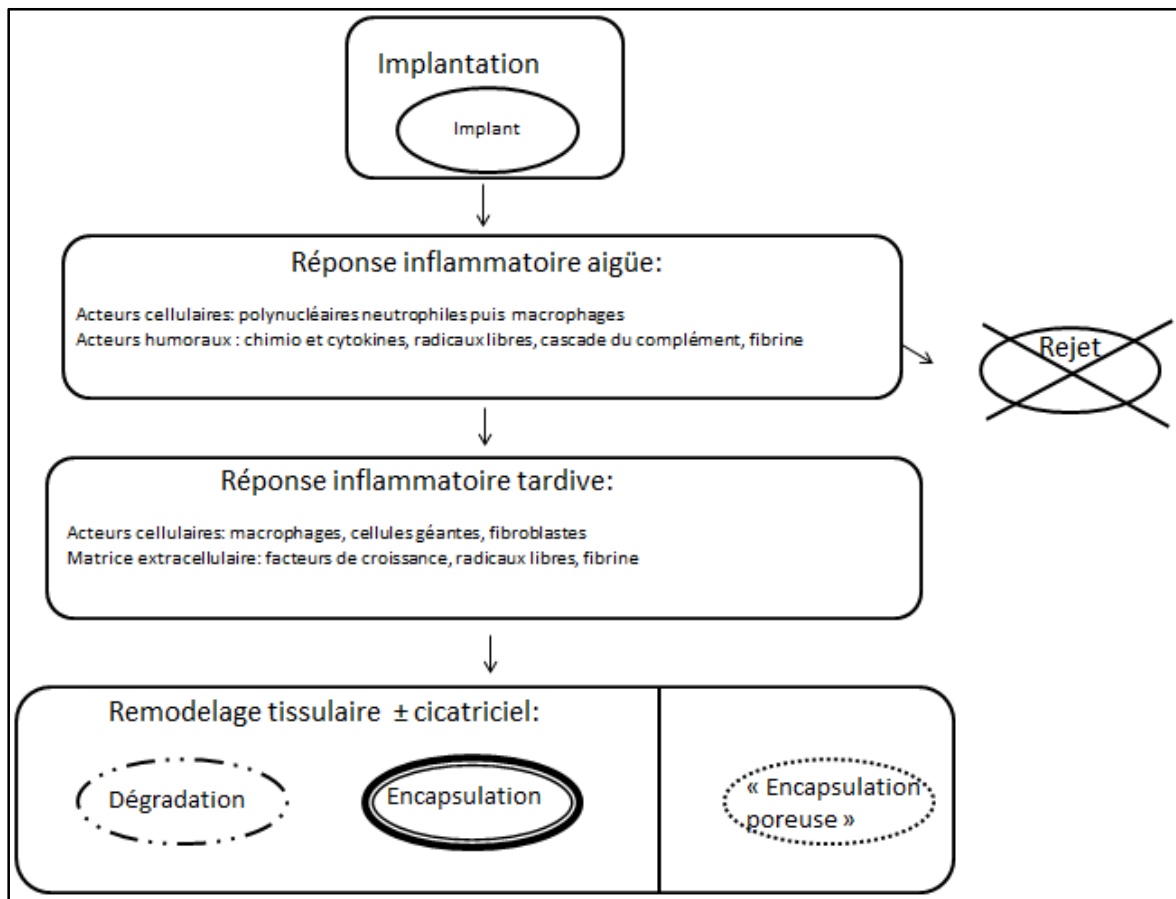


Figure 1.24 : les différentes étapes constituant la réponse à l'implantation d'un dispositif médical. L'étape finale aboutit soit à une dégradation, soit un rejet, soit encore à une encapsulation du dispositif. Pour notre application de biopile, on recherche une « encapsulation poreuse ».

La nature et le niveau de la réaction inflammatoire dépendent également de la durée et du lieu d'implantation. Par exemple, la durée de vie des implants mammaires est limitée à 10 ans [132]. Si le dispositif est implanté dans les vaisseaux sanguins, la formation d'un thrombus n'est pas à écarter [133].

L'encapsulation ne pose pas de problème particulier pour les dispositifs implantables biologiquement inertes qui n'interagissent pas directement avec le corps humain, comme c'est le cas pour une pile de pacemaker implantée en sous-cutané par exemple. Il n'en est pas de même avec une biopile implantable, qui échange de la matière avec son environnement.

Les premières implantations d'un sac de dialyse en acétate de cellulose directement dans l'espace rétro-péritonéal ont provoqué une réponse inflammatoire importante, peut-être

due au matériau lui-même, pourtant décrit comme capable d'éviter une réaction inflammatoire importante, mais plus certainement due à la forme de l'objet (extrémités pointues du fil de nylon par exemple).

Pour réduire l'inflammation liée au contact direct de l'organisme avec l'acétate de cellulose, nous avons enrobé la biopile d'une prothèse vasculaire mais sans approfondir l'étude de son vieillissement lors de l'implantation. Les prothèses étaient constituées de Dacron[®] (tissu tricoté en polyester) pour les implantations de biopiles et d'ex-PTFE (téflon expansé plus connu sous le nom de Gore Tex[®]) pour des implantations de principes actifs sur une période de temps plus importante (3 mois). Nous discuterons l'emploi de ces membranes dans le chapitre 2.

1.4.2.6.7 Choix du lieu d'implantation

Le lieu d'implantation que nous avons choisi a été conditionné par la taille de l'implant, la biodisponibilité des substrats, la durée d'implantation, la réponse immunologique.

Le compartiment sanguin peut paraître idéal pour une implantation. En effet, la glycémie et la concentration d'oxygène sont relativement hautes et constantes et la circulation sanguine peut permettre une diffusion facilitée des substrats. La première implantation d'une biopile dans le système circulatoire a été décrite en 1973 par Giner *et al* avec la réalisation sur un temps court (1 heure 30) d'un shunt artério-veineux extra-corporel chez la brebis [134] mais peu de détails sur la chirurgie sont disponibles dans la publication, qui axe surtout la réflexion sur la possibilité d'alimenter un cœur artificiel grâce à ce type de biopile abiotique [62].

Quelques publications également récentes font état de l'implantation de biopiles, enzymatiques cette fois, directement dans le système sanguin mais ces implantations sont de courte durée : 1h dans la veine marginale de l'oreille d'un lapin [135] ou 1 journée dans la jugulaire d'un rat [136]. Dans la première expérience, seule l'anode était implantée sous la forme d'une aiguille, la cathode étant elle en contact direct avec l'air ambiant, permettant ainsi de bénéficier d'une grande quantité d'oxygène. L'anode était recouverte d'un dépôt de 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) qui inhibe l'adhésion des protéines sériques et des plaquettes. Ce polymère fait encore récemment l'objet de recherches pour augmenter la biocompatibilité et la cytocompatibilité des fibres de polysulfone utilisées en dialyse [135] ou de dispositifs implantables de type stent [138] car sa structure chimique est un peu comparable à un lipide. L'idée de créer un réseau de micro-aiguilles implantables n'est cependant pas encore arrivée à terme avec ce système qui aborde tout de même des aspects de biofouling à court terme.

Nous avons choisi de ne pas implanter notre biopile dans le système vasculaire sanguin car cela permet de s'affranchir des problèmes d'hémo-compatibilité, notamment les phénomènes de thrombose.

Une publication de 2012 a étudié la possibilité d'implanter une biopile abiotique dans le liquide céphalo-rachidien [67]. Des simulations du dispositif donneraient des puissances de 1 à 10 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$. Les principaux avantages décrits en termes de biocompatibilité sont l'absence de cellules circulantes et le taux de protéines effectivement très bas, de l'ordre de 0,02 à 0,04% contre 8% pour le plasma. Ces éléments vont dans le sens d'une bonne intégration d'un dispositif implantable en évitant le biofouling des électrodes.

Cependant, cette étude reste théorique et fait abstraction des phénomènes d'inflammation possible, de la présence d'anticorps, de la plus faible concentration en glucose (50 à 75% de la glycémie), et de la difficulté de miniaturiser un objet implantable dans un tel compartiment.

De plus, le LCR est peu tamponné à cause de l'absence de protéines et la production d'acide gluconique à l'anode peut engendrer une acidose métabolique localisée susceptible de modifier la régulation de la respiration. Cet effet se cumule avec la consommation d'oxygène à la cathode.

L'implantation d'un tel dispositif a été réalisée par l'équipe de Shleev en 2013 [139]. Ils ont implanté une biopile cellobiose déshydrogénase/bilirubine oxydase dans le cerveau d'un rat à l'aide de microélectrodes structurées avec des nanoparticules d'or. Cette biopile a produit une puissance de $2\mu\text{W}/\text{cm}^2$. Une décharge continue pendant 2 heures a montré une baisse importante de potentiel réduisant l'activité de plus de 50%, ce phénomène étant lié à la diffusion des substrats au niveau des électrodes.

Avec des électrodes sous forme de buckypaper (assemblage de nanotubes de carbone sous forme d'une feuille) appliqués au contact du muscle cremaster d'un rat [140], une biopile a donné un rendement assez faible ($0,175\mu\text{W}/\text{cm}^2$). Les auteurs justifient le lieu d'implantation par la large surface de contact entre l'électrode et ce tissu richement vascularisé, comme pourrait le faire un réseau de microaiguilles intra-cutanées par rapport à des électrodes implantées dans le réseau sanguin. Ils ne tiennent cependant aucun compte des phénomènes immunologiques pouvant survenir à moyen et long terme.

Au vu de la littérature, le choix du lieu d'implantation s'est naturellement porté sur le compartiment intra-péritonéal en raison de la taille importante des premiers implants. Les fils ont été alors tunnelisés en sous-cutané et ressortis au niveau de la nuque de l'animal pour permettre la caractérisation électrique d'une biopile développée en collaboration avec le Département de Chimie Moléculaire.

Cette première implantation chez un rat a permis d'évaluer la puissance de cette biopile à environ $25\mu\text{W}/\text{mL}$ pour des électrodes d'une centaine de microlitres avec des décharges quotidiennes de $5\mu\text{A}$ pendant 10 minutes pendant 11 jours [93]. Cette preuve de concept a ouvert la voie à l'optimisation de ce système pour produire plus de courant et rendre le dispositif plus adapté à une implantation de longue durée.

1.4.3 Le transport membranaire cellulaire comme source d'énergie

Le concept de biomimétique appliqué à la génération d'un gradient électrochimique à travers la membrane cellulaire nous permet d'imaginer une biopile biomimétique dans un contexte d'« énergie verte ».

Ce concept est basé sur le fait que nos cellules génèrent un potentiel membranaire pour fournir de l'énergie à la cellule en maintenant des concentrations ioniques interne et externe différentes. Historiquement, la découverte de l'existence d'une « électricité animale » a été faite par Galvani en 1797 et a été sujette à de vives controverses avec Volta pour qui l'électricité ne pouvait être que métallique. Intéressons-nous tout d'abord à la membrane biologique.

1.4.3.1 Description d'une membrane biologique ; rôle des lipides et des protéines

De manière très générale, une membrane permet de séparer 2 compartiments. La membrane cellulaire, par exemple, permet de maintenir l'intégrité de la cellule. Les membranes biologiques ne sont pas seulement des membranes séparant 2 compartiments. Elles sont aussi le siège de réactions et par conséquent elles assurent une fonction dans l'activité cellulaire en permettant par exemple le transfert sélectif de molécules entre les milieux intérieur et extérieur. C'est le modèle de la mosaïque fluide décrit par Singer et Nicholson (1972) [141] qui est toujours d'actualité pour décrire à la fois la composition très hétérogène de la membrane et sa fluidité. Les molécules sont ordonnées mais se déplacent les unes par rapport aux autres. Par exemple, un phospholipide donné se déplace à environ $2\mu\text{m/s}$, autrement dit cela correspond à des changements de position avec un autre lipide d'un million de fois par seconde. Ce modèle s'est enrichi par quelques contributions d'intérêt, comme l'existence démontrée des rafts lipidiques en 1988 par Simons et Van Meer [142], un modèle « de barrières et de piquets » sur la face interne des cellules par Fujiwara *et al* [143] en 2002 et la modélisation d'agrégats dynamiques qui explique l'attractivité des protéines interagissant entre elles pour favoriser leur regroupement [144].

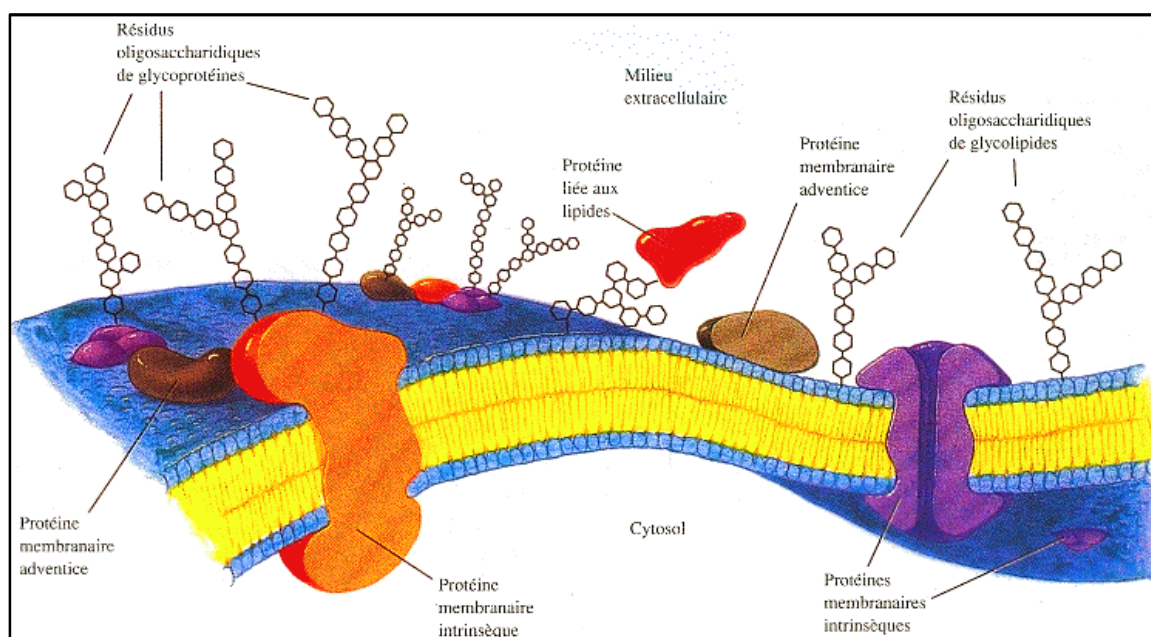


Figure 1.26 : la membrane cellulaire (reproduit de « Principes de Biochimie" Horton *et al.* (1994) [145]

Les membranes biologiques sont constituées de lipides, de protéines et de sucres. Nous ne parlerons pas ici des sucres, associés aux protéines (glycoprotéines) et aux lipides (glycolipides) sur la face externe et dont la fonction essentielle est la reconnaissance du soi. Les membranes biologiques contiennent en général une quantité équivalente de lipides et de protéines, mais ce rapport peut varier suivant le type de membrane. Par exemple la myéline, intervenant dans la conduction de l'influx nerveux, contient de 70% et jusqu'à 85% de lipides [146]. Au contraire, la membrane interne de mitochondrie contient 75% de protéines pour 25% de lipides [147]. Les différents lipides s'associent en formant des domaines au sein desquels les interactions hydrophobes sont maximales. En phase aqueuse, les lipides s'auto-organisent vers leur état d'équilibre le plus stable.

En solution aqueuse, les lipides seuls s'auto-organisent sous forme de structures lamellaire ou sphérique en formant une bicouche orientée : têtes polaires dirigées vers l'extérieur et queues apolaires se faisant face vers l'intérieur [148].

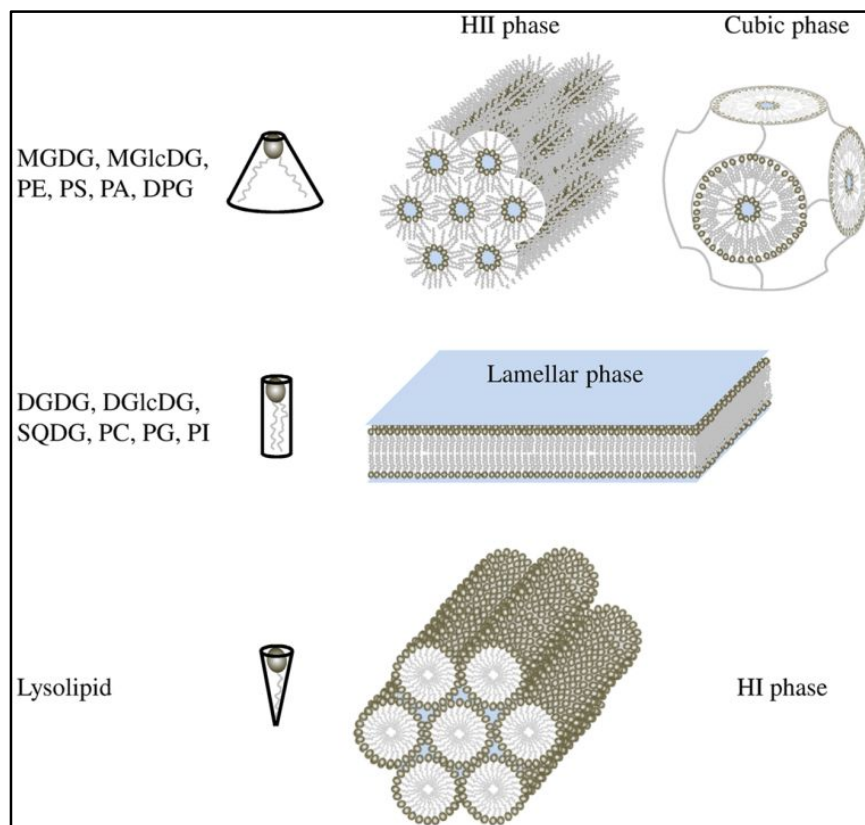


Figure 1.27 : organisation des lipides en solution aqueuse (reproduit de [148])

La structure micellaire, dite de phase hexagonale H_I , est obtenue avec des lipides ne contenant qu'une chaîne d'acide gras estérifiée. La composition lipidique des liposomes va déterminer leur arrangement et leur stabilité en fonction de l'énergie libre du système. La phosphatidylcholine (PC) est un lipide plutôt cylindrique avec une tête polaire en alignement avec ses queues hydrophobes. On peut donc facilement réaliser des bicouches planes ou des liposomes avec ce lipide. En revanche, la phosphatidyléthanolamine (PE) ou le phosphatidylglycérol (PG), qui sont des lipides ayant une forme conique, avec une tête plus petite, ne forment pas de structure lamellaire. Ceci induit une forte courbure de la membrane : les zones hydrophobes des queues se trouvent exposées au solvant, provoquant une inversion

de phase et une précipitation des lipides en phase hexagonale H_{II} . Il faut rajouter environ 50% de PC à la PE pour pouvoir réaliser une structure en bicouche stable. Or, les membranes d'E.coli contiennent 70 à 80% de PE, 20 à 25% de PG et 5 à 10% de cardiolipine (CL) [149], [150], un lipide à 4 chaînes d'acyls provenant de l'assemblage de PE avec PG. Grâce à leur structure particulière, la PE et le CL ont un rôle dans la déformation et le remodelage des membranes.

C'est la présence de protéines au sein de la membrane lipidique qui va permettre à la membrane biologique d'acquérir sa stabilité sous forme d'une bicouche. Une membrane uniquement constituée de lipides est imperméable aux molécules hydrophiles. En effet, alors que les petites molécules apolaires comme les gaz (dioxygène ou diazote) ou les petites molécules polaires non chargées (eau, urée, CO_2) diffusent librement, les grosses molécules polaires et /ou chargées ainsi que les ions sont bloqués.

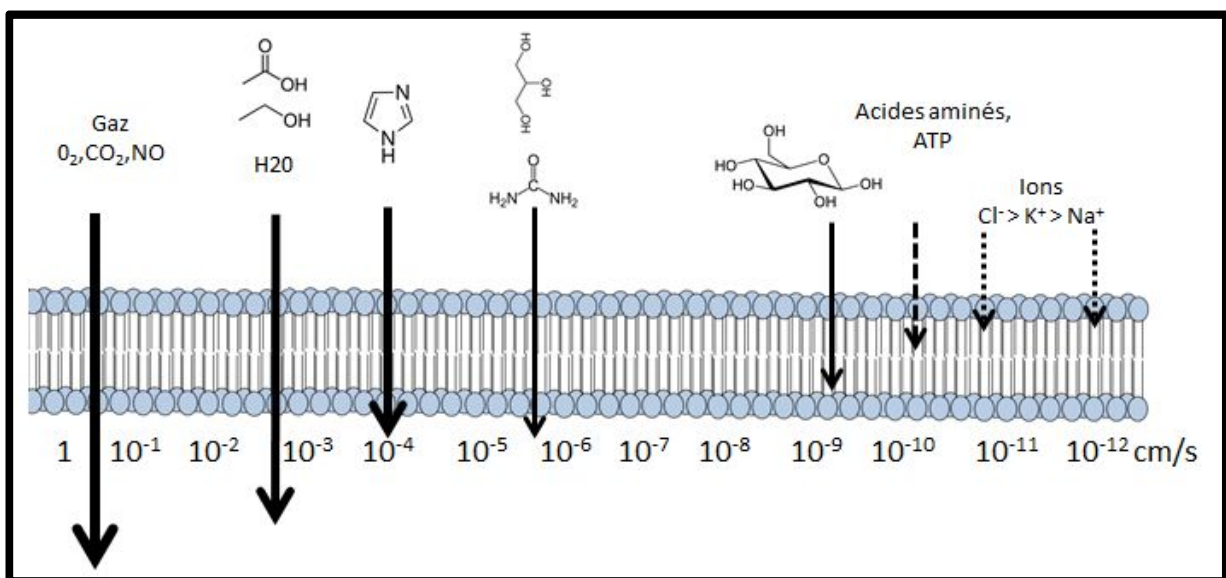


Figure 1.28 : vitesse de diffusion de solutés à travers une membrane biologique (d'après [151]–[157])

Notons au passage que bien que plus petit, le sodium a une diffusion 10 fois plus faible que celle du potassium. Ceci s'explique par la taille et la charge de l'ion hydraté, qui est alors presque deux fois plus gros, comme le montre le schéma ci-dessous :

	Li+	Na+	K+	Cl-
Numéro atomique	3	11	19	17
Rayon nu (Å)	0,8	1	1,6	1,9
Rayon hydraté (Å)	6	5,4	3	3
ΔG_{hyd} (kJ/mol)	-515	-410	-335	-320

Figure 1.29 : rayon des ions dans leur état hydraté ou déshydraté et énergie libre d'hydratation (d'après [158], [159])

La diffusion des anions, et notamment de l'ion Cl^- de l'ordre de 10^{-10} cm/s, s'explique par son interaction avec la surface de la membrane et le fait que la translocation varie de façon exponentielle par rapport à l'énergie libre d'activation. Or, cette énergie est plus basse d'au moins 10 kcal/mol pour les anions que pour les cations [160].

Le phénomène de très faible diffusion des ions à travers la bicouche lipidique est souvent expliqué par la création d'un pore transitoire dans la bicouche lipidique. La plupart des modèles actuels pour expliquer le phénomène de diffusion passive à travers une bicouche lipidique fait intervenir l'énergie de vibration thermique associée aux types de lipides constituant la membrane mais de nombreuses incohérences persistent. Un nouveau modèle fait intervenir la création de pores par la formation locale de regroupements très localisés de lipides pendant des temps de l'ordre de la picoseconde. Cette hypothèse est issue de la théorie des phonons [161].

Bien que ces coefficients de diffusion soient bien caractérisés, l'étude de l'interaction des ions avec une bicouche lipidique reste d'actualité car ces phénomènes permettent de mieux appréhender le mouvement et la localisation des charges des chaînes polypeptidiques des protéines membranaires. Une publication récente basée sur des enregistrements d'électrophysiologie et de simulations de dynamique moléculaire montre que les ions participent à la pénétration dans la bicouche en y créant une déformation, les têtes polaires remplaçant seulement une petite partie de l'eau d'hydratation des ions qui passent alors la membrane [162] dans leur état hydraté, contrairement au modèle de diffusion de solutés.

La diffusion de molécules d'eau à travers une bicouche lipidique peut varier fortement en fonction de la forme [153] de la bicouche. Elle est 10 fois plus faible dans des liposomes que dans des bicouches planes. La composition lipidique est aussi un facteur influençant la perméabilité : l'ajout de cholestérol à des liposomes ou des bicouches planes réduit également le flux d'eau d'un facteur 10.

La présence de protéines au sein de la membrane biologique permet d'accéder à de multiples fonctions, notamment celle de transport.

De nombreuses protéines de transport permettent le passage de molécules de façon plus ou moins spécifique en augmentant le coefficient de diffusion des molécules de manière considérable. Par exemple, le transport d'eau à travers la membrane cellulaire de certains épithéliums, notamment tout au long du néphron, s'effectue principalement grâce aux aquaporines [163], [164], chacune ayant un mode de régulation particulier et conférant une perméabilité de 10 à 100 fois supérieure à la diffusion passive d'eau à travers la membrane. L'aquaporine 1 est responsable de la réabsorption de 80% de l'eau filtrée au niveau glomérulaire. Les protéines de cette famille de 450 membres connus chez les êtres vivants sont très efficaces (jusqu'à un milliard de molécules par canal et par seconde) [165], spécifiques (certaines transportent également du glycérol et à l'urée [166]), mais leur fonctionnement est toujours guidé par le gradient osmotique, qu'elles facilitent [167], [168].

Outre ces protéines canaux, il existe des perméases permettant l'accès de substrats à l'intérieur de la cellule. Par exemple, pour le glucose, le coefficient de perméabilité passe de 10^{-10} cm/s dans des liposomes à 3.10^{-5} cm/s à travers la membrane des érythrocytes [154], [169]. Ce transport s'effectue dans des directions déterminées : les uniports ne transportent des solutés que dans un sens. Il existe également des co-transporteurs, les symports et antiports qui transportent des solutés respectivement dans le même sens ou dans le sens opposé.

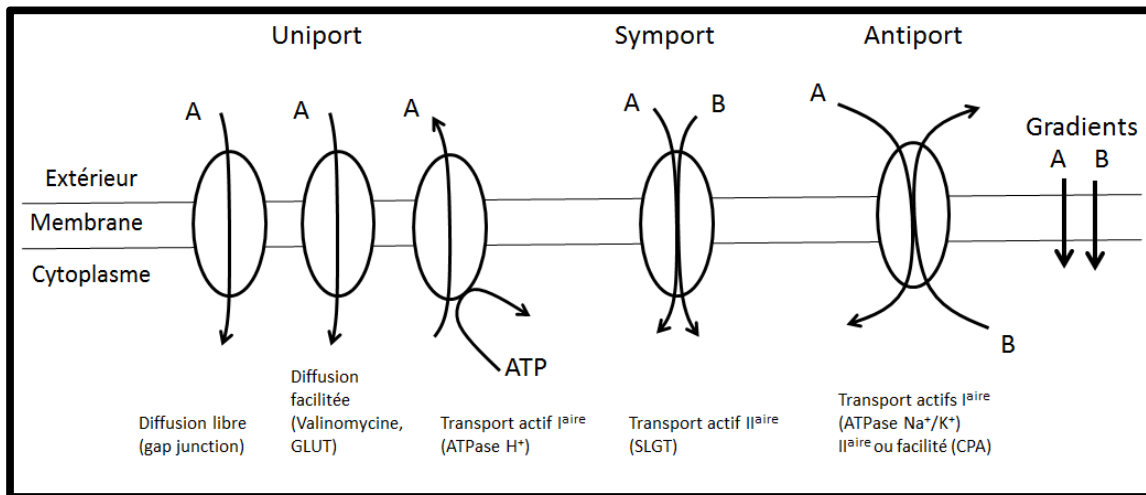


Figure 1.30 : les catégories de transporteurs dans les membranes biologiques

Ces transporteurs sont classés en 3 catégories :

Les transporteurs actifs font traverser les solutés contre le gradient de concentration ce qui nécessite de l'énergie. Dans un transport actif primaire, c'est l'hydrolyse de l'ATP qui fournit l'énergie. C'est par exemple le cas des ATPase Na^+/K^+ ou de l'ATPase à H^+ . Dans un transport actif secondaire, c'est le gradient chimique qui permet le transport. C'est par exemple le cas des co-transporteurs de glucose et de sodium de type SLGT : le glucose est transporté hors de la cellule contre son gradient de concentration grâce au passage d'un ion sodium. La capacité de transport de ce type de transporteurs est de 10^2 à 10^3 molécules/s.

Les transporteurs passifs laissent les solutés passer selon le gradient de concentration ou leur gradient électrochimique sans interagir avec eux. La vitesse de translocation des solutés est comprise entre 10^2 et 10^4 molécules/s.

Enfin, les canaux ioniques permettent aux ions de traverser la membrane en suivant leur gradient de concentration mais en interagissant avec eux. On parle alors de diffusion facilitée. La diffusion d'ions via des protéines canaux est extrêmement efficace, en général entre 10^7 et 10^8 molécules par canal et par seconde. Elle peut être également très spécifique. Cette spécificité est liée à la charge de l'ion mais également à la taille relative du pore de la protéine et de l'ion qui se déshydrate lors de son passage.

1.4.3.2 Modélisation de la membrane biologique

Comme une différence de potentiel est établie entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule grâce à ses protéines de transport, on peut modéliser la membrane plasmique [170] sous la forme d'un circuit électrique avec une valeur d'impédance caractérisée par une résistance mise en parallèle avec un condensateur (figure 1.30 A). En effet, une bicouche lipidique est isolante et permet la séparation de 2 milieux ioniques donc chargés. L'accumulation des charges de part et d'autre fait de cette bicouche lipidique un condensateur avec une valeur de capacité membranaire de 0,3 à $1,3\mu\text{F}/\text{cm}^2$ [160], [171].

En effet, la définition de la capacité pour un condensateur à plaque est :

$$C = \frac{\varepsilon \times \varepsilon_0 \times A}{d}$$

Où ε_0 = permittivité du vide = $8.854 \cdot 10^{-12}$ F/m

ε = constante diélectrique du matériau

A = aire des plaques

d = distance entre les plaques

Donc pour une bicouche lipidique, on a une capacité spécifique :

$$Cm = \frac{\epsilon \times \epsilon_0}{d}$$

Comme les lipides ont une structure hétérogène (voir figure 1.30 B), il est difficile de connaître précisément la valeur de la constante diélectrique. En général, on utilise une valeur entre 2 et 3 [172], [173].

De plus, la capacité varie non seulement en fonction de la composition des lipides mais également en fonction de la température, du potentiel membranaire, de la présence d'autres molécules dans la membrane. Donc pour l'épaisseur d'une membrane biologique de 4 nm, on obtient généralement des valeurs de capacité de l'ordre de 0,3 à 1,3 μF . Un dernier facteur qui a son importance lors de l'observation d'une membrane biomimétique est la technique utilisée pour fabriquer cette bicouche. En effet, la faible présence de solvants organiques restés piégés dans la structure de la bicouche peut également modifier la constante diélectrique du matériau ainsi que son épaisseur, modifiant du même coup la perméabilité membranaire.

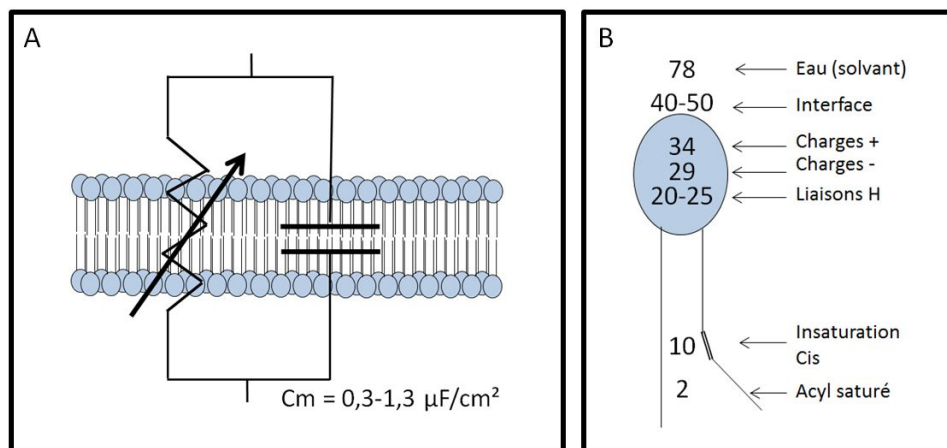


Figure 1.31 : modèle électrique d'une bicouche lipidique (A) et constante diélectrique ϵ d'un lipide (B)

Dans une membrane biologique, les protéines de transport permettent la conduction ionique et sont assimilables à des résistances. Ceci explique pourquoi la conductivité d'une membrane biologique est bien plus faible que celle d'une pure bicouche lipidique.

La conductance G , exprimée en siemens (S) est l'inverse de la résistance et traduit la capacité de la membrane à conduire le courant correspondant au déplacement des ions.

$$R = \rho \frac{d}{A} \text{ en Ohms } (\Omega)$$

$$G = \frac{1}{R} = \sigma \frac{A}{d} \text{ en Siemens (S)}$$

La conductance varie donc en fonction de ρ =résistivité (ohm/m) ou de son inverse la conductivité σ (S/m), de A =surface de la membrane (m^2), et de d = épaisseur de la membrane (m). La valeur de la résistivité de la membrane est un paramètre variable difficile à obtenir à cause de l'hétérogénéité de la membrane liée au type de lipides utilisés [171]. De plus, des

facteurs environnementaux font également varier la conductivité comme la température, qui influence la fluidité de la membrane et les phénomènes de convection dans les solutions, et la force ionique à cause des interactions entre les ions de la solution et la membrane [174]. Même la faible excitation de la membrane lors de son analyse par spectroscopie d'impédance peut faire varier la conductance d'un facteur 100 [175].

Une membrane biologique est donc modélisable sous forme de différents effecteurs électriques et des mesures d'impédance permettent de la caractériser finement. Les protéines canaux jouent le rôle électrique de résistance en permettant le flux sélectif d'ions et une pompe à ion dont le transport est électrogénique (pas de compensation de charge) peut être modélisée par un chargeur de batterie.

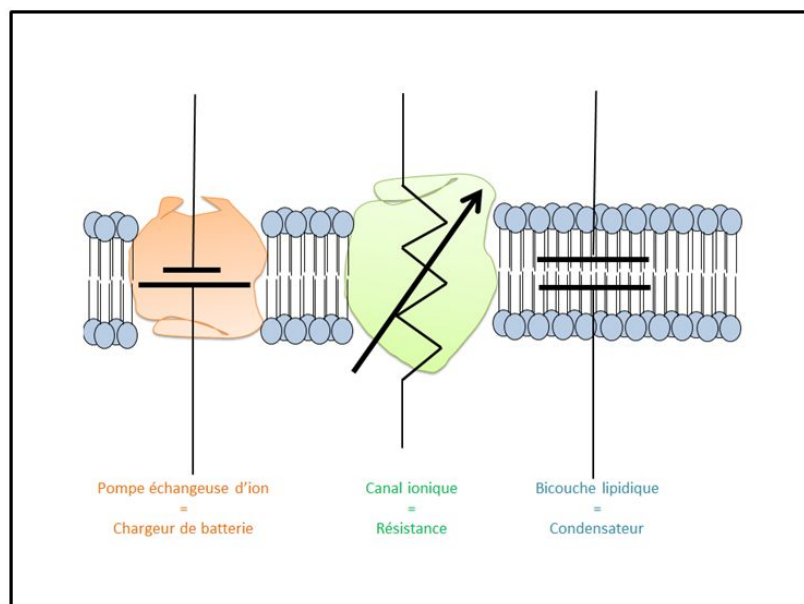


Figure 1.32 : modélisation des constituants d'une membrane sous la forme d'effecteurs électriques

1.4.3.3 Création d'une pile à base de membrane biomimétique

L'existence d'un gradient électrochimique d'ions à travers la membrane de toute cellule vivante a inspiré à D.Martin et P.Cinquin la réalisation d'une pile sur le concept de polarisation membranaire (dépôt d'un brevet en 2007 [176]). Il s'agit d'une biopile mettant en œuvre des protéines de transport ionique insérées dans des membranes biomimétiques. Cette membrane sépare deux compartiments électrolytiques comme le fait une membrane cellulaire et il est possible de transformer un gradient de Na^+ en gradient de H^+ grâce à un transporteur H^+/Na^+ .

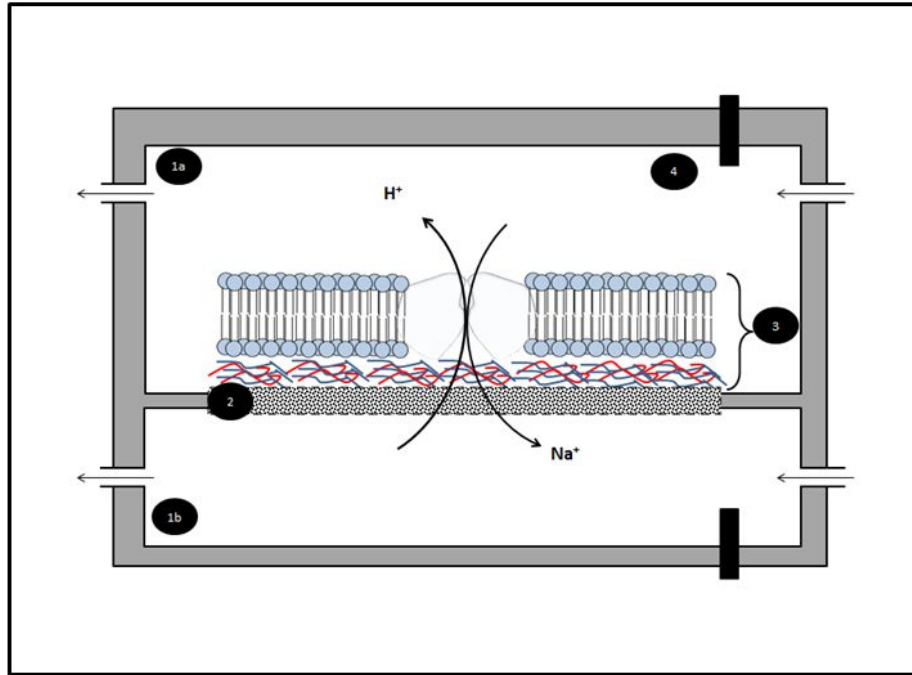


Figure 1.33 : schéma de principe de fonctionnement d'une pile à membrane biomimétique. Des compartiments (1a et 1b) sont séparés par un support poreux (2) sur lequel est déposée une membrane biomimétique (3). Cette membrane intègre des protéines canaux générant un flux d'ions entre les 2 chambres. La transformation du gradient de pH en énergie électrique a lieu au niveau d'électrodes (4).

De telles cellules artificielles produisant un potentiel membranaire rappellent le fonctionnement de certaines cellules spécialisées d'organismes comme le poisson torpille, appelés électrocytes. Ces électrocytes sont capables de générer des décharges électriques de forte intensité grâce à leur asymétrie membranaire [177], [178].

1.4.3.4 Fonctionnement de l'électrocyte, un modèle de super condensateur

La synapse neuro-musculaire est aujourd'hui encore très étudiée et cette jonction chez des espèces de poissons électriques est un bon modèle d'étude. Les cellules post synaptiques sont appelées des électrocytes. Ces cellules sont phylogénétiquement issues des cellules du muscle strié dont elles se différencient par le niveau d'expression génique de facteurs de transcription précoces impliqués dans la taille, l'excitabilité, la contraction et l'isolation des cellules [179]. Par exemple, les niveaux d'expression de l'ATPase Na^+/K^+ (excitabilité) ou du collagène (isolation) sont multipliés par un facteur 4 alors que les niveaux d'expression de l'actine et de la myosine (contraction) sont diminués d'un facteur 4. Cette démonstration a confirmé une observation déjà réalisée lors de la dissection de l'organe électrique du poisson torpille par Francesco Redi et Stephano Lorenzini dès 1671.

Les électrocytes possèdent une asymétrie membranaire : leur face innervée contient de nombreux récepteurs à l'acétylcholine et également une forte densité de canaux sodium voltage dépendant permettant la dépolarisation. La membrane non innervée très invaginée est maintenue au potentiel de repos à -85mV grâce à la Na^+/K^+ ATPase et à d'autres protéines canaux, notamment à Chlore et à Potassium. Cette dernière possède en outre une très faible résistance, ce qui permet la transmission rapide du signal électrique.

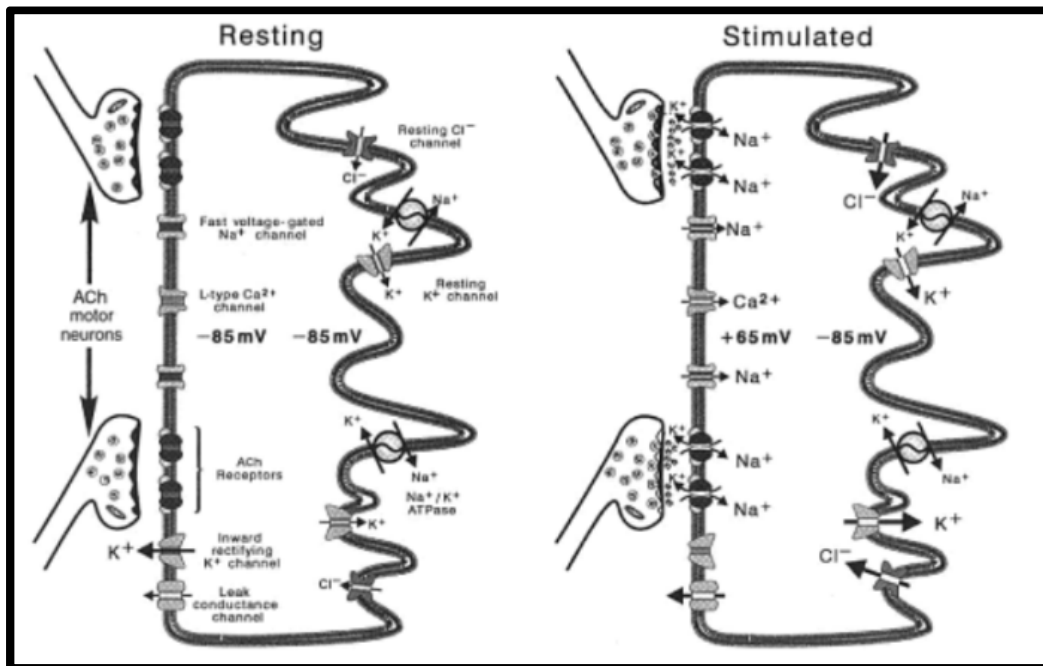


Figure 1.34 : la stimulation d'un électrocyte (reproduit de [177] p1028)

L'arrivée de l'influx nerveux libère de l'acétylcholine au niveau de la plaque neurale, ce qui permet l'activation des transporteurs de Na^+ : les ions Na^+ envahissent les électrocytes et le potentiel membranaire de la face innervée passe de -85mV à $+65\text{mV}$ alors que le potentiel membranaire de la face non innervée ne change pas et reste à -85mV . Cette dépolarisation génère donc un potentiel transcellulaire de 150mV . Ramené à l'épaisseur de la membrane, ce potentiel est en fait énorme, de l'ordre de $375\,000\text{V/cm}$. Selon notre modèle électrique simplifié présenté plus haut, l'électrocyte se comporte donc comme un super condensateur, les 2 types de membranes constituant 2 condensateurs en série. Le cytoplasme joue le rôle d'électrolyte où les ions se déplacent librement.

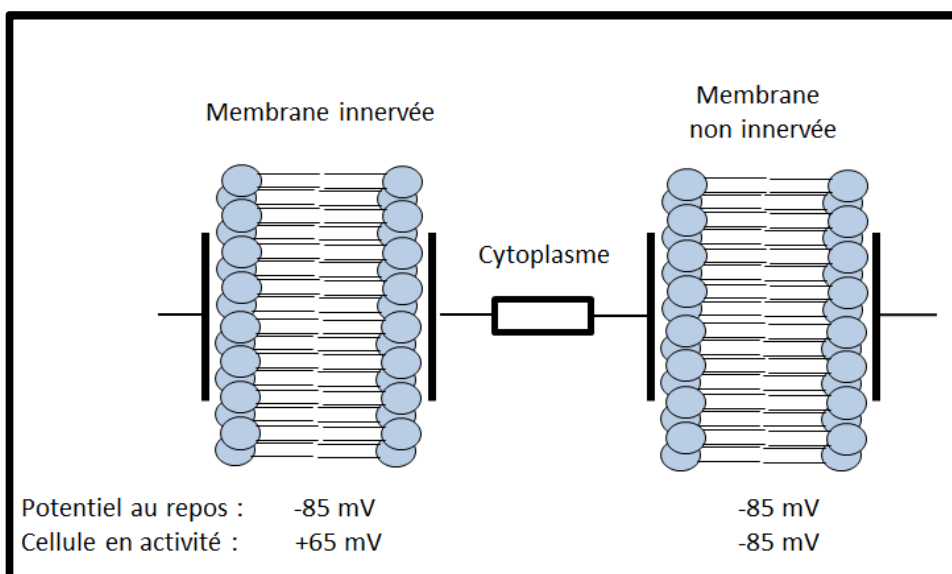


Figure 1.35 : modélisation électrique simplifiée d'un électrocyte par 2 condensateurs et une résistance en série.

Le couplage en série des électrocytes, observé dans l'organe électrique du gymnote, permet de générer de forts potentiels. Avec un potentiel transmembranaire de 150mV par cellule, 10 cellules en série génèrent autant qu'une pile bâton classique de 1,5V.

Le couplage des électrocytes s'effectue également en parallèle grâce à la séparation des colonnes d'électrocytes par un tissu collagénique qui constitue un septum isolant. Cet arrangement permet d'augmenter le courant : la décharge simultanée de toutes les colonnes d'électrocytes est possible grâce à la modulation du trajet des motoneurones les innervant : plus on s'éloigne de la queue, où est situé l'organe électrique, plus les neurones électromoteurs sont courts, ce qui permet la synchronisation des électrocytes.

Ce double arrangement série/parallèle varie d'une espèce de poisson électrique à l'autre selon la forme de leur organe électrique. L'organe du gymnote suit la forme longiligne du poisson et génère un fort potentiel (jusqu'à 600V) et peu de courant alors que celui du poisson torpille possédant plus de montage en parallèle génère des décharges correspondant à un fort courant à un potentiel plus « faible ». En 1960, les travaux de Bennet et Grundfest [180], [181] ont permis de mesurer des décharges de 16A sous 60V sur des raies électriques, ce qui correspond à une puissance de presque 1 kW.

Des simulations mathématiques basées sur le fonctionnement de l'électrocyte annoncent des puissances de $300\mu\text{W}$ en continu dans un dispositif de $72\ \mu\text{l}$ avec une densité de canaux de 350 par μm^2 [182]. La membrane des électrocytes se comporte donc comme une sorte de super-condensateur qui facilite le transport de charges sélectif de part et d'autre de la membrane.

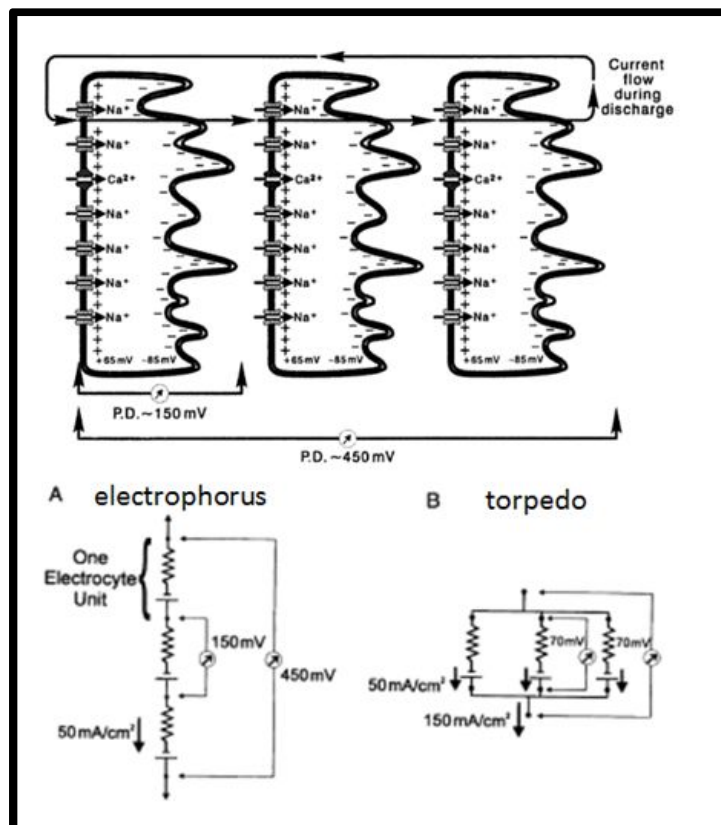


Figure 1.36 : Arrangement en série ou en parallèle des électrocytes (reproduit de [176] (p1032))

1.5 Objectifs de la thèse

Cette thèse comprend 5 chapitres.

Ce premier chapitre a dressé un état des lieux sur les dispositifs implantés et l'avancée des travaux dans le domaine de l'alimentation des dispositifs médicaux par des biopiles. Nous avons vu les limites des piles actuelles et nous nous sommes intéressés à la production d'énergie grâce à des piles bioinspirées, en particulier notre première génération de biopile enzymatique à glucose. Cette thèse détaillera dans les chapitres suivants la conception de biopiles enzymatiques implantables de nouvelle génération et la création d'une biopile à base de membranes biomimétiques.

Le chapitre 2 traitera des performances *in vivo* d'une deuxième génération de biopile enzymatique.

Le chapitre 3 sera consacré à la recherche de nouvelles voies pour augmenter la biocompatibilité des composants d'une 3^{ème} génération de biopiles enzymatiques.

Le chapitre 4 décrira les résultats d'implantation obtenus avec cette 3^{ème} génération de biopiles enzymatiques.

Enfin, dans un dernier chapitre, nous aborderons les aspects qui concernent la biopile à base de membranes biomimétiques. Ce chapitre décrira la production d'un canal ionique spécifique, la recherche d'un support poreux pouvant stabiliser cette membrane biomimétique dans le temps et sur une large surface et la fabrication d'une telle membrane.

1.6 Références du chapitre 1

- [1] J.D. Irish, P. Bobrowski, M. Kobusiewicz, J. Kabacinski, & R. Schild, « An artificial human tooth from the Neolithic cemetery at Gebel RamLah, Egypt. *Dental Anthropology*, vol. 17, n°1, 28-31, 2004.
- [2] G. Seguin, E. d'Incau, P. Murail, & B. Maureille, « The earliest dental prosthesis in Celtic Gaul? The case of an Iron Age burial at Le Chêne, France », *Antiquity*, vol. 88, n° 340, p. 488–500, 2014.
- [3] J. Mercier, « Des grottes préhistoriques à l'Académie Royale de Chirurgie : survol d'un parcours chirurgical passionnant », *e-mémoires de l'Académie Nationale de Chirurgie*, vol. 13, n° 1, p 012-019, 2014
- [4] L.P. Fischer, W. Planchamp, B. Fischer, & F. Chauvin, « Les premières prothèses articulaires de la hanche chez l'homme (1890-1960) », *Hist. Sci. Médicales*, vol. 34, n° 1, p. 57–70, 2000.
- [5] J.-L. Bouillot, S. Servajean, N. Berger, N. Veyrie, & D. Hugol, « Comment choisir une prothèse pour le traitement des éventrations abdominales? », in *Annales de chirurgie*, vol. 129, p. 132–137, 2004.
- [6] S. N. Williams, M. L. Wolford, & A. Bercovitz, « Hospitalization for Total Knee Replacement Among Inpatients Aged 45 and Over: United States, 2000-2010. », *NCHS Data Brief*, n° 210, p. 1–8, 2015.
- [7] S. Lavaud, « Boum des prothèses de hanche chez les 45-54 ans : effet collatéral du sport? », Medscape.18 fev 2015
- [8] V. H. Cumberland, « A preliminary report on the use of prefabricated nylon weave in the repair of ventral hernia. », *Med. J. Aust.*, vol. 1, n° 5, p. 143–144, 1952.
- [9] J. T. Scales, « Tissue reactions to synthetic materials. », *Proc. R. Soc. Med.*, vol. 46, n° 8, p. 647–652, 1953.
- [10] M. V. Sefton, « Consensus Conference on Definitions Chester, UK March 3–5, 1986 », *Biomaterials*, vol. 7, n° 4, p. 308–309, 1986.
- [11] P. J. Doherty, R. L. Williams, D. Williams, & A. J. C. Lee, « Biomaterial-Tissue Interfaces: Second Consensus Conference on Definitions in Biomaterials. », *Proc. of the 9th European Conference on biomaterials* Chester, 1991.
- [12] D.F. Williams, « On the nature of biomaterials », *Biomaterials*, vol. 30, n° 30, p. 5897–5909, 2009.
- [13] A. Kurella & N. B. Dahotre, « Review paper: surface modification for bioimplants: the role of laser surface engineering », *J. Biomater. Appl.*, vol. 20, n° 1, p. 5–50, 2005.
- [14] W. Khan, E. Muntimadugu, M. Jaffè, & A. J. Domb, « Implantable medical devices », in *Focal Controlled Drug Delivery*, Springer ISBN : 978-1-4614-9433-1, p. 33–59, 2014.
- [15] B. Larsson, H.A. Elmqvist, L. Ryden, & H. Schüller, « Lessons from the first patient with an implanted pacemaker », *Pacing Clin. Electrophysiol.*, vol. 26, n° 1, p. 114–124, 2003.
- [16] V. S. Mallela, V. Ilankumaran, & S. N. Rao, « Trends in cardiac pacemaker batteries », *Indian Pacing Electrophysiol. J.*, vol. 4, n° 4, p. 201–212, 2004.
- [17] J. C. Norman, G. W. Sandberg Jr, & F. N. Huffman, « Implantable nuclear-powered cardiac pacemakers », *N. Engl. J. Med.*, vol. 283, n° 22, p. 1203–1206, 1970.
- [18] V. Parsonnet, J. Driller, D. Cook, & S. A. Rizvi, « Thirty-One Years of Clinical Experience with “Nuclear-Powered” Pacemakers », *Pacing Clin. Electrophysiol.*, vol. 29, n° 2, p. 195–200, 2006.
- [19] M. Schaldach & U. Kirsch, « In vivo electrochemical power generation. », *ASAIO J.*, vol. 16, n° 1, p. 184–192, 1970.
- [20] D. Krewski, R. A. Yokel, E. Nieboer, D. Borchelt, J. Cohen, J. Harry, S. Kacew, J. Lindsay, A. M. Mahfouz, & V. Rondeau, « Human health risk assessment for aluminium, aluminium oxide, and aluminium hydroxide », *J. Toxicol. Environ. Health Part B*, vol. 10, n° S1, p. 1–269, 2007.
- [21] E. Rangasamy, J. Li, G. Sahu, N. Dudney, & C. Liang, « Pushing the theoretical limit of Li-CFx batteries: a tale of bifunctional electrolyte », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 136, n° 19, p. 6874–6877, 2014.
- [22] D. Linden, T.B. Reddy, *lithium batteries Handbook of batteries*. McGraw-Hill Pub., 2002.
- [23] B.B. Owens, P.M. Skarstad, D.F. Untereker, S. Passerini, *Solid-electrolyte batteries Handbook of batteries*. McGraw-Hill Pub., 2002.
- [24] G. Jeong, H. Kim, J. H. Park, J. Jeon, X. Jin, J. Song, B.-R. Kim, M.-S. Park, J. M. Kim, et Y.-J. Kim, « Nanotechnology enabled rechargeable Li-SO₂ batteries: another approach towards post-lithium-ion battery systems », *Energy Environ. Sci.*, vol. 8, n° 11, p. 3173–3180, 2015.
- [25] D. C. Bock, A. C. Marschilok, K. J. Takeuchi, & E. S. Takeuchi, « Batteries used to power implantable biomedical devices », *Electrochimica Acta*, vol. 84, p. 155–164, 2012.
- [26] Q. Zhang, K. J. Takeuchi, E. S. Takeuchi, & A. C. Marschilok, « Progress towards high-power Li/CFx batteries: electrode architectures using carbon nanotubes with CFx », *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 17, n° 35, p. 22504–22518, 2015.
- [27] P. Mayé, *Générateurs électrochimiques-Piles, accumulateurs et piles à combustible: Piles, accumulateurs et piles à combustible*. Dunod, ISBN : 978-210-052-991-9, 2010.
- [28] N. Imanishi, A. C. Luntz, & P. Bruce, *The lithium air battery: fundamentals*. Springer, 2014.
- [29] C. Broussolle, N. Jeandidier, & H. Hanaire-Broutin, « French multicentre experience of implantable insulin pumps », *The Lancet*, vol. 343, n° 8896, p. 514–515, 1994.
- [30] P. R. Dijk, S. J. J. Logtenberg, R. O. B. Gans, H. J. G. Bilo, & N. Kleefstra, « Intraperitoneal insulin infusion: treatment option for type 1 diabetes resulting in beneficial endocrine effects beyond glycaemia », *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, vol. 81, n° 4, p. 488–497, 2014.
- [31] « Reveal LINQ ICM Hospital PR Toolkit | Medtronic », www.linqpr.medtronic.com/
- [32] H.Lamraoui, « Conception d'un système d'occlusion urétral actif implantable pour le traitement de l'incontinence urinaire sévère », Thèse Université de Grenoble, 2010
- [33] « Guide CISIC 2014 du centre d'information sur la surdité et l'implant cochléaire ».

- [34] Schmidt, C. L., & Skarstad, P. M. (2001). « The future of lithium and lithium-ion batteries in implantable medical devices. », *Journal of power sources*, 97, 742-746, 2001.
- [35] A. Chen & P.K. Wright, « Thermoelectrics and its energy harvesting: Modules, systems and applications in thermoelectrics », *Medical Applications of Thermoelectrics*, D.M. Rowe CRC press, 26, 2012.
- [36] D.S. Petukhov, S.V. Selishchev, & D.V. Telyshev, « Total Artificial Heart: State-of-the-art. », *Biomedical Engineering*, vol. 49, n°4, p. 193-196, 2015.
- [37] S.M. Sale, N.G. Smedira, « Total artificial heart. » *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, 2012; vol. 26, n°2, p. 147-165, 2012.
- [38] J. G. Copeland, F. A. Arabia, R. G. Smith, & D. Covington, « Synthetic membrane neo-pericardium facilitates total artificial heart explantation », *J. Heart Lung Transplant.*, vol. 20, n° 6, p. 654-656, juin 2001.
- [39] M. Samak, J. Fatullayev, A. Sabashnikov, M. Zeriuoh, P. B. Rahmanian, Y.-H. Choi, J. Wippermann, T. Wahlers, B. Schmack, A. Ruhparwar, P. M. Dohmen, M. Karck, A.-F. Popov, A. R. Simon, & A. Weymann, « Past and Present of Total Artificial Heart Therapy: A Success Story », *Med. Sci. Monit. Basic Res.*, vol. 21, p. 183-190, 2015.
- [40] G. Gerosa, S. Scuri, L. Iop, & G. Torregrossa, « Present and future perspectives on total artificial hearts », *Ann. Cardiothorac. Surg.*, vol. 3, n° 6, p. 595-602, 2014.
- [41] Y. Kassif, M. Zilbershlag, M. Levi, A. Plotkin, & S. Schueler, « A New Universal Wireless Transcutaneous Energy Transfer (TET) System for Implantable LVADs—Preliminary In Vitro and In Vivo Results. », *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, vol. 32, n°4, S140-S141, 2013.
- [42] B.H. Waters, J.R. Smith, & P. Bonde, « Innovative free-range resonant electrical energy delivery system (FREE-D system) for a ventricular assist device using wireless power. » *ASAIO Journal*, vol. 60, n°1, p. 31-37, 2014.
- [43] L. Marchal, « Développement d'une nouvelle technologie Li-ion fonctionnant en solution aqueuse. » Thèse Université de Grenoble (2011).
- [44] B. Boutaud, « A global medical device company and a leader in the treatment of cardiovascular diseases. » *Communication Sorin. Workshop Dispositifs Médicaux* 2012.
- [45] M.-C. Lin, M. Gong, B. Lu, Y. Wu, D.-Y. Wang, M. Guan, M. Angell, C. Chen, J. Yang, B.-J. Hwang, & others, « An ultrafast rechargeable aluminium-ion battery », *Nature*, vol. 520, n° 7547, p. 324-328, 2015.
- [46] M. D. Slater, D. Kim, E. Lee, & C. S. Johnson, « sodium-Ion Batteries », *Adv. Funct. Mater.*, vol. 23, n° 8, p. 947-958, 2013.
- [47] D. Larcher & J. M. Tarascon, « Towards greener and more sustainable batteries for electrical energy storage », *Nat. Chem.*, vol. 7, n° 1, p. 19-29, 2015.
- [48] L. Cailloce, « Batterie sodium-ion: une révolution en marche », *CNRS Le journal* trimestriel n°283 p38-39, 2015
- [49] E. Freund & P. Luccese, « Densité énergétique de divers carburants », *L'hydrogène carburant de l'après-pétrole*, ISBN: 978-271-080-976-0
- [50] G.M. Bernard, « Method for producing dihydrogen from hydrogenated silicon », brevet EP2144847 A2, 2008
- [51] T. Starner, « Human-powered wearable computing », *IBM Syst. J.*, vol. 35, n° 3.4, p. 618-629, 1996.
- [52] « Galayko D et al, Electricity generation from human body motion : toward self-supplied implantable electronics. », *Symposium on biomaterial and smart systems* Cergy-Pontoise, 2014.
- [53] A. Pfenniger, M. Jonsson, A. Zurbuchen, V. M. Koch, & R. Vogel, « Energy harvesting from the cardiovascular system, or how to get a little help from yourself », *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 41, n° 11, p. 2248-2263, 2013.
- [54] H. Goto, T. Sugiura, Y. Harada, & T. Kazui, « Feasibility of using the automatic generating system for quartz watches as a leadless pacemaker power source », *Med. Biol. Eng. Comput.*, vol. 37, n° 3, p. 377-380, 1999.
- [55] A. Nasiri, S. A. Zabalawi, & D. C. Jeutter, « A linear permanent magnet generator for powering implanted electronic devices », *Power Electron. IEEE Trans. On*, vol. 26, n° 1, p. 192-199, 2011.
- [56] J. Y. Kang, « Micropower for medical applications », *Encycl. Med. Devices Instrum.*, 2006.
- [57] A. Delnavaz & J. Voix, « Flexible piezoelectric energy harvesting from jaw movements », *Smart Mater. Struct.*, vol. 23, n° 10, p. 105020, 2014.
- [58] B. M. Badr, K. R. Delaney, & N. Dechev, « Design of a Low Frequency Piezoelectric Energy Harvester for Rodent Telemetry », *Ferroelectrics*, vol. 481, n° 1, p. 98-118, 2015.
- [59] A. Cadei, A. Dionisi, E. Sardini, & M. Serpelloni, « Kinetic and thermal energy harvesters for implantable medical devices and biomedical autonomous sensors », *Meas. Sci. Technol.*, vol. 25, n° 1, p. 12003, 2013.
- [60] Y. Yang, G. D. Xu, & J. Liu, « A Prototype of an Implantable Thermoelectric Generator for Permanent Power Supply to Body Inside a Medical Device », *J. Med. Devices*, vol. 8, n° 1, p. 14507, 2014.
- [61] R. F. Drake, B. K. Kusserow, S. Messinger, & S. Matsuda, « A tissue implantable fuel cell power supply. », *ASAIO J.*, vol. 16, n° 1, p. 199-205, 1970.
- [62] E. Weidlich, G. Richter, F. Von Sturm, J. R. Rao, A. Thoren, & H. Lagergren, « Animal experiments with biogalvanic and biofuel cells », *Biomater. Med. Devices Artif. Organs*, vol. 4, n° 3-4, p. 277-306, 1976.
- [63] Y. Holade, K. MacVittie, T. Conlon, N. Guz, K. Servat, T. W. Napporn, K. B. Kokoh, & E. Katz, « Wireless Information Transmission System Powered by an Abiotic Biofuel Cell Implanted in an Orange », *Electroanalysis*, vol. 27, n° 2, p. 276-280, 2015.
- [64] M. C. Potter, « Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds », *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B Contain. Pap. Biol. Character*, vol. 84, n° 571, p. 260-276, 1911.
- [65] D. Pocaznoi, « Optimisation d'anodes microbiennes à partir de lixiviat de sol pour la conception de piles à combustible microbiennes », Thèse Université de Toulouse, 2012.
- [66] G. Lepage, « Caractérisation et optimisation d'une pile à combustible microbienne », Thèse Université de Grenoble, 2012.

- [67] B. I. Rapoport, J. T. Kedzierski, & R. Sarpeshkar, « A glucose fuel cell for implantable brain–machine interfaces », *PLoS One*, vol. 7, n° 6, p. e38436, 2012.
- [68] X. Xie, M. Ye, P.-C. Hsu, N. Liu, C. S. Criddle, & Y. Cui, « Microbial battery for efficient energy recovery », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 110, n° 40, p. 15925–15930, 2013.
- [69] R. Arechederra & S. D. Minteer, « Organelle-based biofuel cells: immobilized mitochondria on carbon paper electrodes », *Electrochimica Acta*, vol. 53, n° 23, p. 6698–6703, 2008.
- [70] M. Rasmussen, A. Shrier, & S. D. Minteer, « High performance thylakoid bio-solar cell using laccase enzymatic biocathodes », *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 15, n° 23, p. 9062–9065, 2013.
- [71] S. Shleev, A. Bergel, & L. Gorton, « Biological fuel cells: Divergence of opinion. », *Bioelectrochemistry*, vol. 106 (Pt A), p. 1–2, 2015.
- [72] M. Shichiri, Y. Yamasaki, R. Kawamori, N. Hakui, & H. Abe, « Wearable artificial endocrine pancreas with needle-type glucose sensor », *The Lancet*, vol. 320, n° 8308, p. 1129–1131, 1982.
- [73] Y. Zhang, J. Shen, H. Li, L. Wang, D. Cao, X. Feng, ... & L. Wang, « Recent Progress on Graphene-based Electrochemical Biosensors. », *The Chemical Record*, vol. 16, n° 1, p. 273–294, 2015.
- [74] D. Monti, G. Ottolina, G. Carrea, & S. Riva, « Redox reactions catalyzed by isolated enzymes », *Chem. Rev.*, vol. 111, n° 7, p. 4111–4140, 2011.
- [75] D. Sokic-Lazic, A. R. De Andrade, & S. D. Minteer, « Utilization of enzyme cascades for complete oxidation of lactate in an enzymatic biofuel cell », *Electrochimica Acta*, vol. 56, n° 28, p. 10772–10775, 2011.
- [76] W. Jia, X. Wang, S. Imani, A. J. Bandothkar, J. Ramirez, P. P. Mercier, & J. Wang, « Wearable textile biofuel cells for powering electronics », *J Mater Chem A*, vol. 2, n° 43, p. 18184–18189, 2014.
- [77] A. J. Bandothkar & J. Wang, « Wearable Biofuel Cells: A Review », *Electroanalysis*, 2016.
- [78] E. Katz, I. Willner, & A. B. Kotlyar, « A non-compartmentalized glucose/O₂ biofuel cell by bioengineered electrode surfaces », *J. Electroanal. Chem.*, vol. 479, n° 1, p. 64–68, 1999.
- [79] A. A. Babadi, S. Bagheri, & S. B. A. Hamid, « Progress on implantable biofuel cell: Nano-carbon functionalization for enzyme immobilization enhancement », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 79, p. 850–860, 2016.
- [80] N. Mano, F. Mao, & A. Heller, « Characteristics of a miniature compartment-less glucose-O₂ biofuel cell and its operation in a living plant », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 125, n° 21, p. 6588–6594, 2003.
- [81] F. Gao, L. Viry, M. Maugey, P. Poulin, & N. Mano, « Engineering hybrid nanotube wires for high-power biofuel cells », *Nat. Commun.*, vol. 1, p. 2, 2010.
- [82] V. Flexer & N. Mano, « From dynamic measurements of photosynthesis in a living plant to sunlight transformation into electricity », *Anal. Chem.*, vol. 82, n° 4, p. 1444–1449, 2010.
- [83] M. Rasmussen, R. E. Ritzmann, I. Lee, A. J. Pollack, & D. Scherson, « An implantable biofuel cell for a live insect », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, n° 3, p. 1458–1460, 2012.
- [84] L. Halámková, J. Halánek, V. Bocharova, A. Szczupak, L. Alfonta, & E. Katz, « Implanted biofuel cell operating in a living snail », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, n° 11, p. 5040–5043, 2012.
- [85] K. MacVittie, J. Halánek, L. Halámková, M. Southcott, W. D. Jemison, R. Lobel, & E. Katz, « From “cyborg” lobsters to a pacemaker powered by implantable biofuel cells », *Energy Environ. Sci.*, vol. 6, n° 1, p. 81–86, 2013.
- [86] W. M. S. Russell, R. L. Burch, & C. W. Hume, « The principles of humane experimental technique », *Universities Federation for Animal Welfare*, ISBN : 978-090-076-778-4, 1959.
- [87] S. Murtha, B. A. Pappas, & S. Raman, « Neonatal and adult forebrain norepinephrine depletion and the behavioral and cortical thickening effects of enriched/impooverished environment », *Behav. Brain Res.*, vol. 39, n° 3, p. 249–261, 1990.
- [88] T. Y. Pang & A. J. Hannan, « Environmental Enrichment: A Cure for Cancer? It’s All in the Mind », *J. Mol. Cell Biol.*, vol. 2, n° 6, p. 302–304, 2010.
- [89] L. Cao, X. Liu, E.-J. D. Lin, C. Wang, E. Y. Choi, V. Riban, B. Lin, & M. J. During, « Environmental and genetic activation of a brain-adipocyte BDNF/leptin axis causes cancer remission and inhibition », *Cell*, vol. 142, n° 1, p. 52–64, 2010.
- [90] D. G. Porter, « Ethical scores for animal experiments. », *Nature*, vol. 356, n° 6365, p. 101–102, 1992.
- [91] F. R. Stafleu, R. Tramper, J. Vorstenbosch, & J. A. Joles, « The ethical acceptability of animal experiments: a proposal for a system to support decision-making », *Lab. Anim.*, vol. 33, n° 3, p. 295–303, 1999.
- [92] M. Wadman, « London’s disastrous drug trial has serious side effects for research », *Nature*, vol. 440, n° 7083, p. 388–389, 2006.
- [93] P. Cinquin, C. Gondran, F. Giroud, S. Mazabrard, A. Pellissier, F. Boucher, J.-P. Alcaraz, K. Gorgy, F. Lenouvel, S. Mathé, P. Porcu, & S. Cosnier, « A glucose biofuel cell implanted in rats », *PLoS One*, vol. 5, n° 5, p. e10476, 2010.
- [94] R. P. de Vries & J. Visser, « Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides », *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 65, n° 4, p. 497–522, 2001.
- [95] E. Schuster, N. Dunn-Coleman, J.C. Frisvad, & P. Van Dijck, « On the safety of *Aspergillus niger*—a review. », *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 59, n° 4-5, p. 426-435, 2002.
- [96] S. Ramachandran, P. Fontanille, A. Pandey, & C. Larroche, « Gluconic acid: properties, applications and microbial production », *Food Technol. Biotechnol.*, vol. 44, n° 2, p. 185–195, 2006.
- [97] J. P. van Dijken & M. Veenhuis, « Cytochemical localization of glucose oxidase in peroxisomes of *Aspergillus niger* », *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 9, n° 4, p. 275–283, 1980.
- [98] C. F. Witteveen, M. Veenhuis, & J. Visser, « Localization of glucose oxidase and catalase activities in *Aspergillus niger* », *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 58, n° 4, p. 1190–1194, 1992.
- [99] Q. H. Gibson, B. E. Swoboda, & V. Massey, « Kinetics and mechanism of action of glucose oxidase », *J. Biol. Chem.*, vol. 239, n° 11, p. 3927–3934, 1964.

- [100] E. O. Odebunmi & S. O. Owulude, « Kinetic and thermodynamic studies of glucose oxidase catalysed oxidation reaction of glucose », 2009.
- [101] D. J. Candy, « Glucose oxidase and other enzymes of hydrogen peroxide metabolism from cuticle of *Schistocerca americana gregaria* », *Insect Biochem.*, vol. 9, n° 6, p. 661–665, 1979.
- [102] A. Pujol, « Synthèse et étude de nouveaux chélateurs sélectifs du cuivre (I) pour les maladies de type Wilson », Thèse Université de Grenoble, 2010.
- [103] E. Enaud, M. Trovaslet, F. Naveau, A. Decristoforo, S. Bizet, S. Vanhulle, & C. Jolival, « Laccase chloride inhibition reduction by an anthraquinonic substrate », *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 49, n° 6, p. 517–525, 2011.
- [104] C. Kang, H. Shin, Y. Zhang, & A. Heller, « Deactivation of bilirubin oxidase by a product of the reaction of urate and O₂ », *Bioelectrochemistry*, vol. 65, n° 1, p. 83–88, 2004.
- [105] M. F. Chaplin & C. Bucke, « Enzyme technology ». New York: Cambridge University Press, ISBN : 978-052-134-884-3, 1990.
- [106] F. A. Armstrong & G. S. Wilson, « Recent developments in faradaic bioelectrochemistry », *Electrochimica Acta*, vol. 45, n° 15, p. 2623–2645, 2000.
- [107] E. Katz, L. Sheeney-Haj-Idia, & I. Willner, « Electrical Contacting of Glucose Oxidase in a Redox-Active Rotaxane Configuration », *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 43, n° 25, p. 3292–3300, 2004.
- [108] F. Giroud, « Biomatériaux d'électrode appliqués à la réalisation et à la caractérisation d'un biocapteur immunologique et de biopiles enzymatiques », Thèse Université de Grenoble, 2011.
- [109] S. L. Mayo, W. R. Ellis, R. J. Crutchley, & H. B. Gray, « Long-range electron transfer in heme proteins », *Science*, vol. 233, n° 4767, p. 948–952, 1986.
- [110] S. Nakamura, S. Hayashi, & K. Koga, « Effect of periodate oxidation on the structure and properties of glucose oxidase », *Biochim. Biophys. Acta BBA-Enzymol.*, vol. 445, n° 2, p. 294–308, 1976.
- [111] Y. Degani & A. Heller, « Electron transfer from glucose oxidase to metal electrodes via electron relays, bound covalently to the enzyme », *J Phys Chem*, vol. 91, p. 1285–1289, 1987.
- [112] Y. Degani & A. Heller, « Direct electrical communication between chemically modified enzymes and metal electrodes. 2. Methods for bonding electron-transfer relays to glucose oxidase and D-amino-acid oxidase », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 110, n° 8, p. 2615–2620, 1988.
- [113] J. M. Goran, S. M. Mantilla, & K. J. Stevenson, « Influence of surface adsorption on the interfacial electron transfer of flavin adenine dinucleotide and glucose oxidase at carbon nanotube and nitrogen-doped carbon nanotube electrodes », *Anal. Chem.*, vol. 85, n° 3, p. 1571–1581, 2013.
- [114] M. Wooten, S. Karra, M. Zhang, & W. Gorski, « On the direct electron transfer, sensing, and enzyme activity in the glucose oxidase/carbon nanotubes system », *Anal. Chem.*, vol. 86, n° 1, p. 752–757, 2013.
- [115] C. Agnès, M. Holzinger, A. Le Goff, B. Reuillard, K. Elouarzaki, S. Tingry, et S. Cosnier, « Supercapacitor/biofuel cell hybrids based on wired enzymes on carbon nanotube matrices: autonomous reloading after high power pulses in neutral buffered glucose solutions », *Energy Environ. Sci.*, vol. 7, n° 6, p. 1884–1888, 2014.
- [116] A. Kontush, A. Reich, K. Baum, T. Spranger, B. Finckh, A. Kohlschütter, & U. Beisiegel, « Plasma ubiquinol-10 is decreased in patients with hyperlipidaemia », *Atherosclerosis*, vol. 129, n° 1, p. 119–126, 1997.
- [117] R. D. Milton, F. Giroud, A. E. Thumser, S. D. Minter, & R. C. Slade, « Hydrogen peroxide produced by glucose oxidase affects the performance of laccase cathodes in glucose/oxygen fuel cells: FAD-dependent glucose dehydrogenase as a replacement », *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 15, n° 44, p. 19371–19379, 2013.
- [118] J. Wang, « Electrochemical glucose biosensors », *Chem. Rev.*, vol. 108, n° 2, p. 814–825, 2008.
- [119] Y.-M. Yan, O. Yehezkeili, & I. Willner, « Integrated, Electrically Contacted NAD (P)⁺-Dependent Enzyme–Carbon Nanotube Electrodes for Biosensors and Biofuel Cell Applications », *Chem. Eur. J.*, vol. 13, n° 36, p. 10168–10175, 2007.
- [120] J. A. Duine, « The PQQ story », *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 88, n° 3, p. 231–236, 1999.
- [121] A. Oubrie, H. J. Rozeboom, K. H. Kalk, A. J. Olsthoorn, J. A. Duine, & B. W. Dijkstra, « Structure and mechanism of soluble quinoprotein glucose dehydrogenase », *EMBO J.*, vol. 18, n° 19, p. 5187–5194, 1999.
- [122] A. Oubrie, H. J. Rozeboom, K. H. Kalk, J. A. Duine, & B. W. Dijkstra, « The 1.7 Å crystal structure of the apo form of the soluble quinoprotein glucose dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus* reveals a novel internal conserved sequence repeat », *J. Mol. Biol.*, vol. 289, n° 2, p. 319–333, 1999.
- [123] M. Rasmussen, S. Abdellaoui, & S. D. Minter, « Enzymatic biofuel cells: 30 years of critical advancements », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 76, p. 91–102, 2016.
- [124] C. A. Janeway, P. Travers, M. J. Walport, M. J. Shlomchik, & others, « Immunobiology: the immune system in health and disease », vol. 2. Garland New York, ISBN : 978-081-534-123-9, 2001.
- [125] S. L. M. Van Loon, A. Smits, A. Driessen-Mol, F. P. T. Baaijens, & C. V. C. Bouten, « The immune response in in situ tissue engineering of aortic heart valves », *Calcif. Aortic Valve Dis.*, vol. 8, p. 207–245, 2013.
- [126] J. D. Bryers, C. M. Giachelli, & B. D. Ratner, « Engineering biomaterials to integrate and heal: the biocompatibility paradigm shifts », *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 109, n° 8, p. 1898–1911, 2012.
- [127] J. M. Anderson, « Biological responses to materials », *Annu. Rev. Mater. Res.*, vol. 31, n° 1, p. 81–110, 2001.
- [128] E. M. Sussman, M. C. Halpin, J. Muster, R. T. Moon, & B. D. Ratner, « Porous implants modulate healing and induce shifts in local macrophage polarization in the foreign body reaction », *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 42, n° 7, p. 1508–1516, 2014.
- [129] J. M. Anderson, A. Rodriguez, & D. T. Chang, « Foreign body reaction to biomaterials », in *Seminars in immunology*, vol. 20, p. 86–100, 2008.
- [130] P. M. Kou & J. E. Babensee, « Macrophage and dendritic cell phenotypic diversity in the context of biomaterials », *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 96, n° 1, p. 239–260, 2011.

- [131] L. Helming, E. Tomasello, T. R. Kyriakides, F. O. Martinez, T. Takai, S. Gordon, & E. Vivier, « Essential role of DAP12 signaling in macrophage programming into a fusion-competent state », *Sci. Signal.*, vol. 1, n° 43, p. ra11, 2008.
- [132] J. E. Puskas & M. T. Luebbbers, « Breast implants: the good, the bad and the ugly. Can nanotechnology improve implants? », *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.*, vol. 4, n° 2, p. 153–168, 2012.
- [133] C. Singh, C. S. Wong, & X. Wang, « Medical Textiles as Vascular Implants and Their Success to Mimic Natural Arteries », *J. Funct. Biomater.*, vol. 6, n° 3, p. 500–525, 2015.
- [134] J. Giner, G. Holleck, & P. A. Malachuk, « Eine implantierbare Brennstoffzelle zum Betrieb eines mechanischen Herzens », *Berichte Bunsenges. Für Phys. Chem.*, vol. 77, n° 10–11, p. 782–783, 1973.
- [135] T. Miyake, K. Haneda, N. Nagai, Y. Yatagawa, H. Onami, S. Yoshino, T. Abe, et M. Nishizawa, « Enzymatic biofuel cells designed for direct power generation from biofluids in living organisms », *Energy Environ. Sci.*, vol. 4, n° 12, p. 5008–5012, 2011.
- [136] F. C. Sales, R. M. Iost, M. V. Martins, M. C. Almeida, & F. N. Crespilho, « An intravenous implantable glucose/dioxygen biofuel cell with modified flexible carbon fiber electrodes », *Lab. Chip.*, vol. 13, n° 3, p. 468–474, 2013.
- [137] R. S. Teotia, G. J. Dahe, & J. Bellare, « In-situ coating of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymer on polysulfone hollow fiber membranes for hemodialysis », *Adv. Sci. Lett.*, vol. 20, n° 5–6, p. 1191–1197, 2014.
- [138] Q. Zhong, J. Yan, X. Qian, T. Zhang, Z. Zhang, et A. Li, « Atomic layer deposition enhanced grafting of phosphorylcholine on stainless steel for intravascular stents », *Colloids Surf. B Biointerfaces*, vol. 121, p. 238–247, 2014.
- [139] V. Andoralov, M. Falk, D. B. Suyatin, M. Granmo, J. Sotres, R. Ludwig, V. O. Popov, J. Schouenborg, Z. Blum, & S. Shleev, « Biofuel cell based on microscale nanostructured electrodes with inductive coupling to rat brain neurons », *Sci. Rep.*, vol. 3, 2013.
- [140] J. A. Castorena-Gonzalez, C. Foote, K. MacVittie, J. Halánek, L. Halámková, L. A. Martinez-Lemus, & E. Katz, « Biofuel cell operating in vivo in rat », *Electroanalysis*, vol. 25, n° 7, p. 1579–1584, 2013.
- [141] S. J. Singer et G. L. Nicolson, « The fluid mosaic model of the structure of cell membranes », *Science*, vol. 175, n° 4023, p. 720–731, 1972.
- [142] K. Simons & G. Van Meer, « Lipid sorting in epithelial cells », *Biochemistry (Mosc.)*, vol. 27, n° 17, p. 6197–6202, 1988.
- [143] T. Fujiwara, K. Ritchie, H. Murakoshi, K. Jacobson, & A. Kusumi, « Phospholipids undergo hop diffusion in compartmentalized cell membrane. », *The Journal of cell biology*, vol. 157, n°6, p. 1071–1082, 2002.
- [144] F. Daumas, N. Destainville, C. Millot, A. Lopez, D. Dean, & L. Salomé, « Confined diffusion without fences of a g-protein-coupled receptor as revealed by single particle tracking », *Biophys. J.*, vol. 84, n° 1, p. 356–366, 2003.
- [145] H. Horton, *Principes de biochimie*. Bruxelles: De Boeck-Wesmael, ISBN : 978-280-411-578-4, 1994.
- [146] G. J. Siegel, B. W. Agranoff, R. W. Albers, S. K. Fisher, & M. D. Uhler, « Basic neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects », ISBN : 978--039-751-820-3, 1999.
- [147] G. Karp et P. L. Masson, « Biologie cellulaire et moléculaire. » Bruxelles: De Boeck, ISBN : 978-280-416-011-1, 2010.
- [148] J. Jouhet, « Importance of the hexagonal lipid phase in biological membrane organization », *Front Plant Sci*, vol. 4, n° 494, p. 10–3389, 2013.
- [149] B. K. Tan, M. Bogdanov, J. Zhao, W. Dowhan, C. R. Raetz, & Z. Guan, « Discovery of a cardiolipin synthase utilizing phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol as substrates », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 109, n° 41, p. 16504–16509, 2012.
- [150] J. D. Unsay, K. Cosentino, Y. Subburaj, & A. J. García-Sáez, « Cardiolipin effects on membrane structure and dynamics », *Langmuir*, vol. 29, n° 51, p. 15878–15887, 2013.
- [151] G. M. Cooper, « *The cell: a molecular approach* » 2. ed. Washington, DC: ASM Press, ISBN : 978-087-893-106-4, 2000.
- [152] D. Bemporad, J. W. Essex, & C. Luttmann, « Permeation of small molecules through a lipid bilayer: a computer simulation study », *J. Phys. Chem. B*, vol. 108, n° 15, p. 4875–4884, 2004.
- [153] T.-X. Xiang & B. D. Anderson, « Permeability of acetic acid across gel and liquid-crystalline lipid bilayers conforms to free-surface-area theory. », *Biophys. J.*, vol. 72, n° 1, p. 223, 1997.
- [154] J. De Gier, J. G. Mandersloot, & L. L. M. Van Deenen, « Lipid composition and permeability of liposomes », *Biochim. Biophys. Acta BBA-Biomembr.*, vol. 150, n° 4, p. 666–675, 1968.
- [155] G. J. Bressleers, H. L. Goderis, & P. P. Tobback, « Measurement of the glucose permeation rate across phospholipid bilayers using small unilamellar vesicles Effect of membrane composition and temperature », *Biochim. Biophys. Acta BBA-Biomembr.*, vol. 772, n° 3, p. 374–382, 1984.
- [156] R. E. Wood, F. P. Wirth, & H. E. Morgan, « Glucose permeability of lipid bilayer membranes », *Biochim. Biophys. Acta BBA-Biomembr.*, vol. 163, n° 2, p. 171–178, 1968.
- [157] C. H. Nielsen, « Biomimetic membranes for sensor and separation applications », *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 395, n° 3, p. 697–718, 2009.
- [158] J. Kielland, « Individual activity coefficients of ions in aqueous solutions », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 59, n° 9, p. 1675–1678, 1937.
- [159] H. H. Girault, « Electrochimie physique et analytique. », *Presses polytechniques et universitaires romandes*, ISBN : 978-288-074-673-5, 2007.
- [160] R. F. Flewelling & W. L. Hubbell, « The membrane dipole potential in a total membrane potential model. Applications to hydrophobic ion interactions with membranes. », *Biophys. J.*, vol. 49, n° 2, p. 541, 1986.

- [161] M. Zhernenkov, D. Bolmatov, D. Soloviov, K. Zhernenkov, B. P. Toperverg, A. Cunsolo, A. Bosak, & Y. Q. Cai, « Revealing the mechanism of passive transport in lipid bilayers via phonon-mediated nanometre-scale density fluctuations », *Nat. Commun.*, vol. 7, p. 11575, 2016.
- [162] I. Vorobyov, T. E. Olson, J. H. Kim, R. E. Koeppe, O. S. Andersen, & T. W. Allen, « Ion-induced defect permeation of lipid membranes », *Biophys. J.*, vol. 106, n° 3, p. 586–597, 2014.
- [163] G. M. Preston, T. P. Carroll, W. B. Guggino, & P. Agre, « Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein », *Science*, vol. 256, n° 5055, p. 385–387, 1992.
- [164] C. Pietrement, « Les aquaporines présentes dans le rein », *Néphrologie Thérapeutique*, vol. 4, n° 7, p. 562–567, 2008.
- [165] P. Agre, M. Bonhivers, & M. J. Borgnia, « The aquaporins, blueprints for cellular plumbing systems », *J. Biol. Chem.*, vol. 273, n° 24, p. 14659–14662, 1998.
- [166] D. Fu, A. Libson, L. J. Miercke, C. Weitzman, P. Nollert, J. Krucinski, & R. M. Stroud, « Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity », *Science*, vol. 290, n° 5491, p. 481–486, 2000.
- [167] H. Sui, B.-G. Han, J. K. Lee, P. Walian, & B. K. Jap, « Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel », *Nature*, vol. 414, n° 6866, p. 872–878, 2001.
- [168] K. Murata, K. Mitsuoka, T. Hirai, T. Walz, P. Agre, J. B. Heymann, A. Engel, & Y. Fujiyoshi, « Structural determinants of water permeation through aquaporin-1 », *Nature*, vol. 407, n° 6804, p. 599–605, 2000.
- [169] A. Gjedde, « High- and Low-Affinity Transport of D-Glucose from Blood to Brain », *J. Neurochem.*, vol. 36, n° 4, p. 1463–1471, 1981.
- [170] C. Poignard & A. Silve, « Différence de Potentiel Induite par un Champ Electrique sur la Membrane d'une Cellule Biologique », *3EI*, n° 75, p. 11–20, 2014.
- [171] M. Naumowicz, A. D. Petelska, & Z. A. Figaszewski, « Capacitance and resistance of the bilayer lipid membrane formed of phosphatidylcholine and cholesterol », *Cell. Mol. Biol. Lett.*, vol. 8, n° 1, p. 5–18, 2003.
- [172] H. A. Stern & S. E. Feller, « Calculation of the dielectric permittivity profile for a nonuniform system: application to a lipid bilayer simulation », *J. Chem. Phys.*, vol. 118, n° 7, p. 3401–3412, 2003.
- [173] G. Gramse, A. Dols-Perez, M. A. Edwards, L. Fumagalli, & G. Gomila, « Nanoscale measurement of the dielectric constant of supported lipid bilayers in aqueous solutions with electrostatic force microscopy », *Biophys. J.*, vol. 104, n° 6, p. 1257–1262, 2013.
- [174] S. G. A. McLaughlin, G. Szabo, G. Eisenman, & S. M. Ciani, « Surface charge and the conductance of phospholipid membranes », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 67, n° 3, p. 1268–1275, 1970.
- [175] C. G. Cranfield, B. A. Cornell, S. L. Grage, P. Duckworth, S. Carne, A. S. Ulrich, & B. Martinac, « Transient potential gradients and impedance measures of tethered bilayer lipid membranes: pore-forming peptide insertion and the effect of electroporation », *Biophys. J.*, vol. 106, n° 1, p. 182–189, 2014.
- [176] P. Cinquin & D. Martin, « Dispositif de membrane artificielle biomimétique », brevet n° WO2009003936 A2 29 juin 2007
- [177] N. Sperelakis, *Cell physiology sourcebook essentials of membrane biophysics*. London, UK; Waltham, MA, USA: Elsevier/Academic Press, ISBN : 978-0-12-387738-3, 2012.
- [178] R. W. Hill, G. A. Wyse, et M. Anderson, *Animal physiology*, 3rd ed. Sunderland, Mass: Sinauer Associates, Inc. Publishers, ISBN : 9780878935598, 2012.
- [179] J. R. Gallant, L. L. Traeger, J. D. Volkening, H. Moffett, P.-H. Chen, C. D. Novina, G. N. Phillips, R. Anand, G. B. Wells, M. Pinch, & others, « Genomic basis for the convergent evolution of electric organs », *Science*, vol. 344, n° 6191, p. 1522–1525, 2014.
- [180] M. V. Bennett & H. Grundfest, « Electrophysiology of electric organ in *Gymnotus carapo* », *J. Gen. Physiol.*, vol. 42, n° 5, p. 1067–1104, 1959.
- [181] M. V. L. Bennett, M. Wurzel, & H. Grundfest, « The Electrophysiology of Electric Organs of Marine Electric Fishes I. Properties of electroplaques of *Torpedo nobiliana* », *J. Gen. Physiol.*, vol. 44, n° 4, p. 757–804, 1961.
- [182] J. Xu & D. A. Lavan, « Designing artificial cells to harness the biological ion concentration gradient », *Nat. Nanotechnol.*, vol. 3, n° 11, p. 666–670, 2008.

Chapitre 2 : Performance *in vivo* d'une 2^{ème} génération de biopile enzymatique

2.1 Introduction

La preuve de concept de fonctionnement *in vivo* d'une première biopile enzymatique a été réalisée par notre équipe en collaboration avec le Département de Chimie Moléculaire en 2010 avec une implantation de 11 jours dans la cavité abdominale d'un rat [1].

Le schéma ci-dessous représente une photographie de l'état de l'art au commencement de la thèse et l'identification des verrous empêchant le développement de la biopile enzymatique :

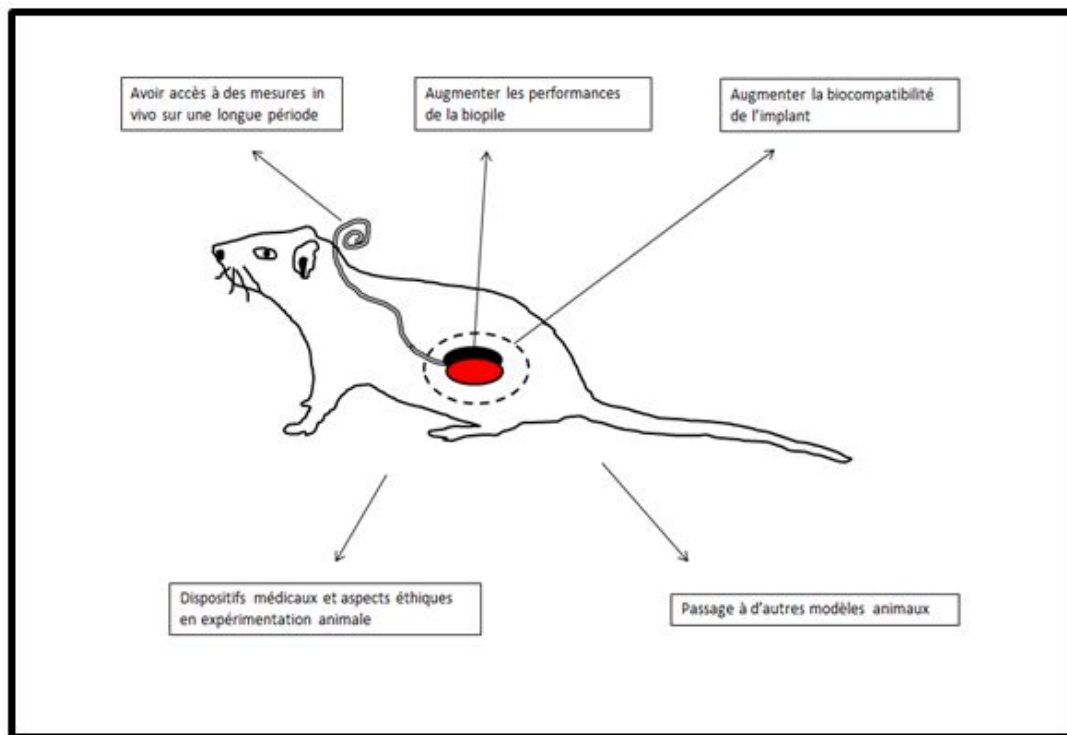


Figure 2.1 : état de l'art de l'implantation d'une première génération de biopile implantable

- Au niveau du transfert électronique entre l'enzyme et l'électrode : comme aucun transfert direct n'a pu être observé dans des électrodes réalisées avec une compression de graphite, nous nous sommes tournés vers un transfert médiaté dont l'inconvénient majeur est la diffusion de l'espèce hors de la biopile. Par exemple, il a été mesuré *in vitro* une perte de 90% de quinhydrone au bout de 20 jours dans un tampon. *In vivo*, elle est toutefois en théorie maintenue dans le sac de dialyse mais sa concentration au niveau des enzymes et conducteurs peut baisser, ce qui diminue la performance de la biopile.

- L'organisme tolérera plus facilement un implant de taille réduite. Il faut donc optimiser le design de la biopile pour augmenter la biocompatibilité du dispositif. Malgré la petite taille des électrodes, qui sont des disques de 1,3 cm de diamètre et 1 mm d'épaisseur, leur enrobage par les différentes membranes protectrices (les membranes d'acétate de

cellulose et de Dacron) mène à des implants d'environ 15mL, ce qui représente une taille importante pour une implantation chez le rongeur en intra-péritonéal.

- L'inconvénient majeur de l'acétate de cellulose réside dans le fait qu'il n'est pas manipulable aisément : l'hydratation est un paramètre essentiel à une bonne diffusion de molécules à travers cette membrane. Il devient alors impossible de le coller. Il faut inventer une méthode pour fixer cette membrane ou trouver une alternative en le remplaçant par un autre polymère poreux biocompatible.

- Les mesures électriques de la biopile chez le rongeur ont été réalisées avec des fils tunnelisés jusqu'à la nuque de l'animal, où ils étaient enroulés sur eux-mêmes avec la crainte d'un faux contact ou de l'arrachage du dispositif. Le meilleur résultat de durée d'implantation a été de 11 jours et les temps de mesures étaient toujours réduits à une quinzaine de minutes avec un animal en boîte de contention. Pour pouvoir analyser le fonctionnement de la biopile *in vivo*, il faut inventer un dispositif permettant des mesures sur des temps plus longs, voire en continu.

- Un dernier aspect concerne l'implantation de dispositifs médicaux et l'éthique animale : que peut-on mettre en place pour augmenter le bien-être animal dans le cadre de ces implantations ? Il est maintenant établi que le bien-être animal est corrélé avec l'obtention de résultats d'expérimentation de qualité.

Une deuxième génération de biopile a donc été conçue, avec l'objectif de traiter les difficultés que nous venons de résumer. Ce chapitre décrit cette nouvelle biopile, ainsi que les méthodes conçues pour estimer sa performance.

2.2 Performances obtenues in vitro par une biopile à transfert direct

L'optimisation apportée sur les bioélectrodes concerne l'utilisation d'une laccase à la place de la polyphénol oxydase pour la cathode et l'utilisation de nanotubes de carbone à la place du graphite dans les pastilles compressées.

Les laccases appartiennent à la famille des polyphénol oxydases. Elles sont très utilisées dans des applications industrielles, notamment dans le blanchissement de la pâte à papier, ou la détoxification de polluants de l'environnement[2]. Chez *Trametes versicolor*, elles interviennent dans la dégradation de la lignine par attaque oxydative des composés phénoliques.

La compression de laccase avec des CNT s'est révélée très efficace en ce qui concerne la connexion à l'électrode et a permis un transfert direct d'électron. La différence entre une laccase et une tyrosinase porte sur leur mécanisme réactionnel [3] : la tyrosinase (PPO) fait intervenir un centre à 2 cuivres, alors que la laccase utilise 4 cuivres, un site T1 permettant le transfert électronique vers l'électrode, et un cluster tri-nucléaire T2/T3 qui prend en charge l'oxygène (figure 2.2). Ces cuivres sont également liés aux histidines de la protéine par des liaisons de coordination [4].

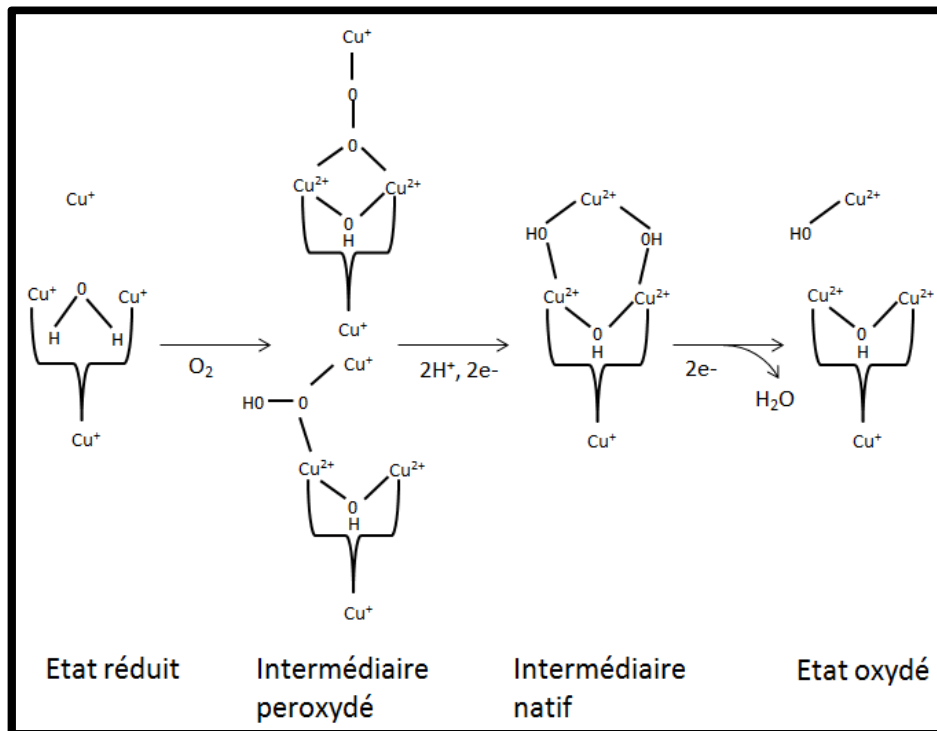


Figure 2.2 : réduction de l'oxygène par les laccases et la bilirubine oxydase en 3 étapes. (d'après [5])

La connexion directe de la laccase sur les nanotubes repousse les limites théoriques de son activité : le pH optimum de la laccase est de 5 [6] et son fonctionnement est inhibé par les chlorures.

Les nanotubes de carbone (CNT) sont des tubes creux de quelques micromètres de long, formés soit d'une couche monomoléculaire d'1 nm de diamètre de carbone pour les « single-walled CNT », soit de couches concentriques multiples pouvant atteindre une 50aine de nm pour les multi-walled CNT.

Ils sont utilisés dans un grand nombre d'applications grâce à leur faible poids, leur tenue mécanique, leur conductivité électrique, ainsi que leur très bonne résistance aux hautes températures (pointes d'AFM, textiles techniques, traitement anti-dépôt des peintures, ...)

Dans notre application, les MWCNT ont permis d'obtenir, avec une simple compression d'enzymes (GOX et catalase à l'anode, laccase à la cathode), des pastilles fournissant une forte puissance *in vitro* et *in vivo* sans l'aide de médiateurs. Une revue récente[7] résume l'avantage de l'utilisation de CNT ou de graphène pour immobiliser l'enzyme tout en créant un contact électrique entre l'enzyme et le matériau conducteur.

Ce transfert direct peut s'expliquer par 2 hypothèses : un nanofil de carbone plonge suffisamment profondément dans l'enzyme pour atteindre le site catalytique, ou l'enzyme change quelque peu sa conformation pour permettre un transfert direct entre le FAD et le CNT [8]. Il existe également la possibilité d'un transfert électronique inter-domaine, mis en évidence par exemple sur la cellobiose deshydrogénase [9], [10] où les électrons du FAD sont transférés au cytochrome b qui joue le rôle de médiateur rédox.

L'augmentation de la surface de contact dans le volume de l'électrode (l'électrode reste très poreuse tout en emprisonnant les enzymes), les qualités de conduction électrique des CNT, ainsi que l'augmentation du potentiel lié à l'absence de médiateurs, permettent

d'obtenir *in vitro* un maximum de courant à 0,6 V avec une puissance de biopile importante: $1\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$ après 1 mois de fonctionnement avec 5mM de glucose et 250 μM d' O_2 [8].

2.3 Lieu d'implantation de la biopile

2.3.1 Aspects physiologiques et choix du lieu d'implantation

Chez le rat et le lapin, nous avons choisi d'implanter la biopile en intra-abdominal. Comme nous l'avons dit plus haut dans cet exposé, c'est principalement à cause de la taille importante de l'implant mais d'autres raisons viennent étayer ce choix. C'est un compartiment où les fluides extracellulaires sont très présents. De plus, les mouvements des viscères peuvent permettre une diffusion facilitée du glucose et de l'oxygène.

Enfin, en 1989, G. Velho [11] a étudié la cinétique du glucose péritonéal en vue de l'implantation d'îlots de Langerhans comme pancréas artificiel. Il a montré que les concentrations de glucose sanguin et péritonéal étaient identiques dans des conditions physiologiques de repos. Cependant, dans cette expérience, si on administre du glucose par voie intra-veineuse, un délai d'environ 30 minutes est nécessaire pour équilibrer les concentrations.

Ce résultat contredit les expériences de Wolfson Jr *et al*, qui ont implanté un sac de dialyse pour des temps longs et mesuré des concentrations environ 2 fois plus faibles [12].

Nous avons voulu confirmer le choix du lieu d'implantation en mesurant *in vivo* la dynamique des flux du glucose dans l'abdomen d'un rat. Pour bénéficier d'un volume de liquide suffisant pour la mesure de la concentration intra-péritonéale de glucose, nous y avons injecté un volume important de solution isotonique de façon à réduire drastiquement la concentration de glucose intra-abdominale, puis nous avons suivi l'évolution de cette concentration et la glycémie au cours du temps.

Pour cela, au temps $t=0$ nous avons injecté 5mL de solution saline dépourvue de glucose en intrapéritonéal par l'intermédiaire d'un cathéter chez un rat anesthésié sous isoflurane. Une laparotomie a été réalisée à $t= 15\text{min}$ en maintenant les bords de la plaie soulevés pour éviter la présence de sang dans la cavité abdominale. Un glucomètre a été utilisé directement dans la cavité abdominale pour doser la quantité de glucose intra-abdominal. A l'exception de l'ouverture nécessaire à la mesure, la cavité est maintenue fermée pour éviter les échanges. Des prélèvements sanguins caudaux ont été effectués en début et fin d'expérience pour la mesure de la glycémie. Les mesures ont été faites en duplicat.

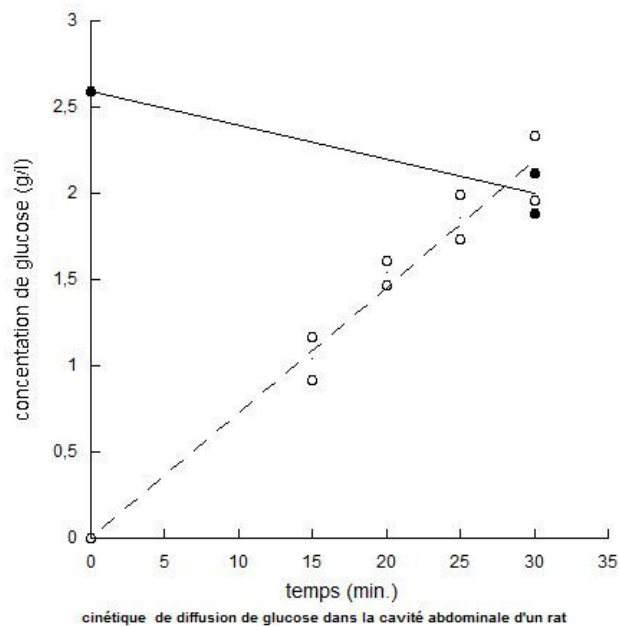


Figure 2.3 : cinétique de diffusion de glucose dans la cavité abdominale d'un rat. Les points noirs correspondent à la glycémie. Les points blancs correspondent à la concentration de glucose intra-abdominale. Les lignes correspondent aux courbes de tendances.

Le graphique présenté figure 2.3 montre que le glucose diffuse librement du sang jusqu'au compartiment de la cavité abdominale et que l'équilibre est atteint en environ 30 minutes. Cette expérience montre l'intérêt d'une implantation dans la cavité abdominale en ce qui concerne la biodisponibilité du glucose. Nous pouvons remarquer que la glycémie peropératoire est très élevée, avec plus de 2,5g/L au début de l'expérience. Cela s'explique par l'effet hyperglycémiant de l'anesthésiant, qui diminue l'insulinémie et augmente la cortisolémie [13]. De plus, il faut ajouter à cela les effets de la chirurgie, source de manipulation et de destruction tissulaire ayant également un effet hyperglycémiant.

Les implantations de piles biogalvaniques dans les années 1970 [14] ont montré une forte dépendance du lieu d'implantation par rapport à la biocompatibilité : les anodes en zinc sont oxydées en Zn^{2+} puis en ZnO en présence d'oxygène, ce qui diminue de façon importante la toxicité induite par les ions Zn^{2+} . Cette toxicité est plus limitée lors d'implantations intra-musculaires richement vascularisées que lors d'implantations en sous-cutané dans du tissu adipeux. La réaction a lieu après 6 à 8 mois en sous-cutané alors que certaines implantations ont duré jusqu'à 18 mois en intra-musculaire, ce qui montre que les toxines sont plus facilement éliminées lors d'implantations profondes dans un milieu richement vascularisé.

Le compartiment intra-abdominal chez le rat nous a donc semblé le plus approprié à l'implantation de notre biopile.

2.3.2 Consommation théorique de glucose et d'oxygène par la biopile implantée

La question à laquelle nous avons voulu répondre est la suivante: peut-on avoir une idée plus ou moins précise du rendement physiologique de la biopile en observant la

consommation des substrats, c'est-à-dire le glucose et d'oxygène, ou la production de gluconate.

Voici les courbes de courant obtenues *in vitro* en fonction des concentrations de substrat avec les bioélectrodes à transfert direct optimisées.

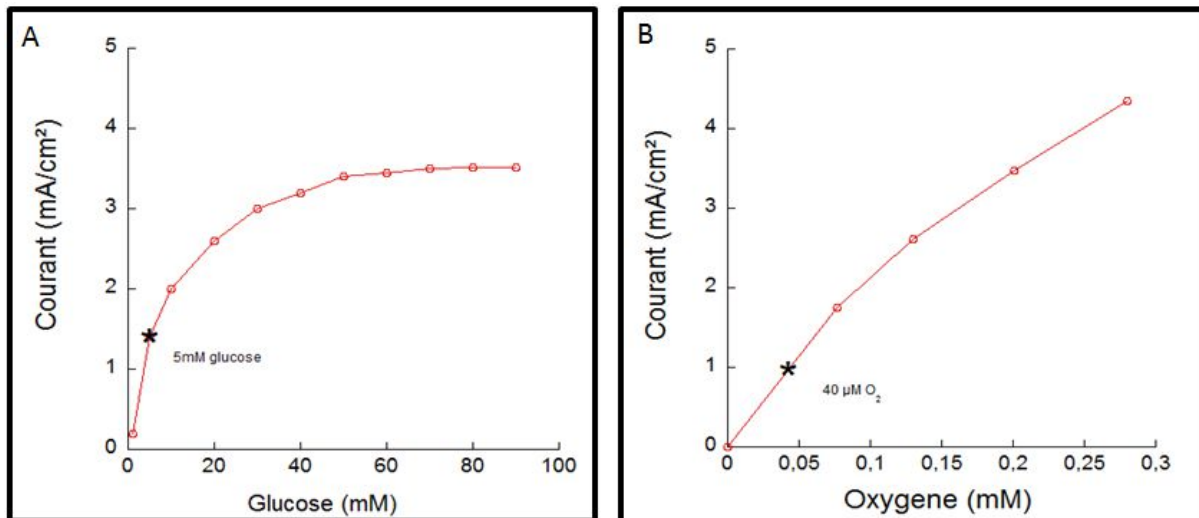


Figure 2.4 : réponses ampérométriques à 0 V des bioélectrodes en fonction de la concentration en substrats. En A, réponse de l'anode (-0,43 V) et en B, réponse de la cathode (0,5 - 0,58 V) (d'après [8])

L'analyse de l'anode en conditions saturantes en O₂ et en fonction de la concentration de glucose nous montre une courbe qui croît rapidement jusqu'à 50mM puis atteint un plateau à 3,5 mA/cm². A 5mM de glucose, le courant obtenu est de 1,5 mA/cm². A la cathode, la concentration d'O₂ est proportionnelle au courant obtenu. On peut voir qu'avec 40μM d'O₂, qui correspond à la quantité d'oxygène dissous dans le milieu extra cellulaire, on obtient un courant d'environ 1mA/cm², soit pour des électrodes de 0,5 cm de diamètre, environ 200μA

Nous voyons donc que notre biopile peut fournir jusqu'à 1 mA/cm² de courant aux conditions physiologiques.

La loi de Faraday nous dit que la quantité de glucose ayant réagi à l'électrode est proportionnelle à la charge électrique totale transférée au circuit :

$$i \cdot t = N \cdot n \cdot F$$

Avec i : intensité du courant (A)

t : temps (s)

n : nombre d'électrons transférés

F : constante de Faraday C/mol

N : nombre de moles de glucose consommé

On a donc

$$N = \frac{i \cdot t}{n \cdot F} = \frac{200 \cdot 1}{2 \cdot 96485} \approx 1 \text{ nmol/s de glucose consommé à l'anode}$$

Calculons maintenant la consommation moyenne de glucose par un rat Wistar : en considérant une énergie de 2860kJ libérée par l'oxydation complète d'une mole de glucose et

la consommation journalière moyenne d'un rat Wistar de 350kJ/jour/kg [15], on peut estimer une vitesse moyenne de consommation de glucose à :

$$\frac{350}{86400} \times \frac{10^6}{2860} \approx 1,4 \mu\text{mol/s/kg}$$

On peut noter que la vitesse de consommation de glucose à l'anode ne représente que 1% de la vitesse moyenne de consommation de glucose par le rat Wistar.

La mesure de la glycémie ne révélera rien car la consommation de glucose par la biopile sera masquée par le niveau global de glucose circulant. Il serait plus pertinent de doser localement le glucose à proximité de la biopile, car un changement local de concentration en substrats ou en gluconate peut gêner le bon fonctionnement de la biopile ou induire une hypoxie locale néfaste au fonctionnement de cellules proches.

Cependant, les concentrations de substrats au voisinage de la biopile sont très difficiles à évaluer en raison des phénomènes de diffusion qui vont évoluer dans le temps (mouvements ou non de l'animal, enrobage cellulaire du dispositif). De plus, introduire un biocapteur au voisinage de la biopile pour mesurer la quantité de glucose n'est pas possible sans modifier l'environnement même de la biopile.

2.3.3 Concentration en gluconate

2.3.3.1 le gluconate dans le métabolisme des mammifères

Bien que la glucose oxydase ne soit pas synthétisée chez les mammifères supérieurs, il existe cependant un métabolisme du gluconate. D'une part, l'acide gluconique est contenu dans de nombreux aliments (fruits, riz, miel,...) et est utilisé dans l'industrie alimentaire comme agent aromatisant, mais également en médecine sous forme de gluconate de calcium et de fer pour traiter les hypocalcémies ou les anémies [16] : 20 à 40% du gluconate est absorbé en étant transporté par des transporteurs d'anions non spécifiques [17], [18].

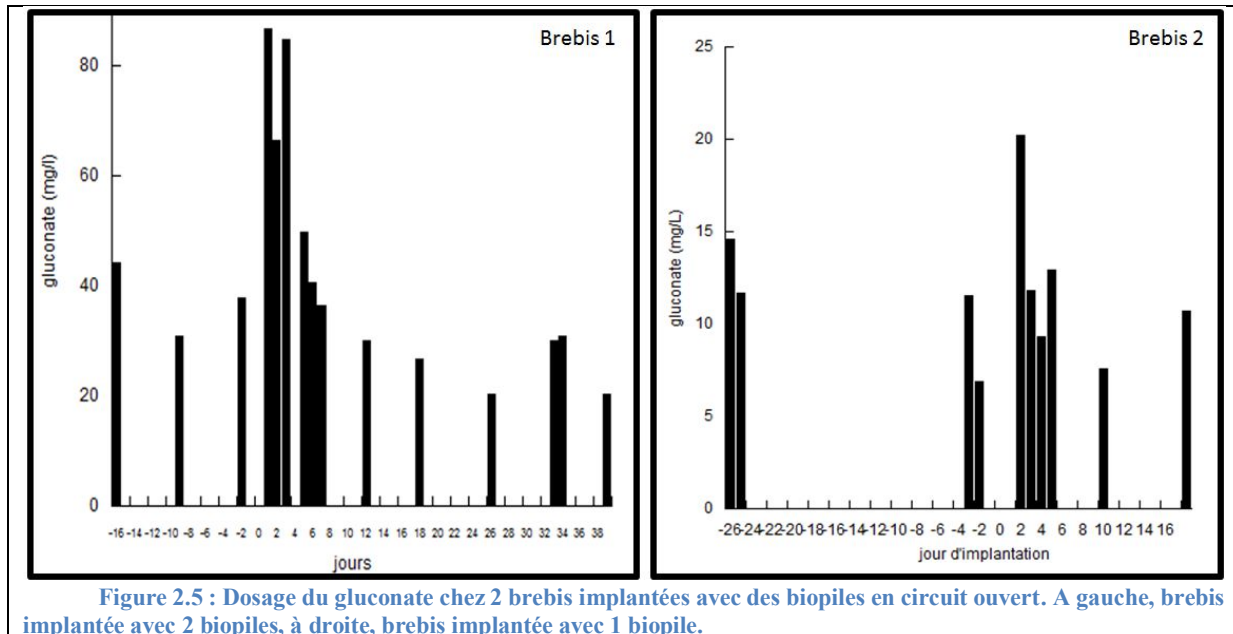
D'autre part, ce gluconate est un intermédiaire du métabolisme des glucides : en effet, la production de phosphogluconate est la première étape de la voie des pentoses phosphate contrôlée par la glucose 6 phosphate deshydrogénase. Cette voie métabolique n'est pas utilisée dans le muscle squelettique. Par contre, 10% du métabolisme glucosé passe par cette voie dans les cellules où la biosynthèse des acides gras et des stéroïdes est prépondérante, c'est-à-dire les glandes mammaires, le tissu adipeux, le foie et les corticosurrénales [19], [20]. Dans le foie, 30% du glucose oxydé passe par cette voie. Chez l'homme, la production endogène de gluconate est estimée à 450mg/kg pour une personne de 60 kg [21].

La production de gluconate par la glucose oxydase chez l'homme ne pose donc pas de problème de toxicité et un excès potentiel de gluconate est éliminé dans les urines. On retrouve le gluconate excrété suite à l'injection intraveineuse de gluconate de sodium marqué au ^{14}C chez le rat à 57% dans l'urine et 14% dans le CO_2 [22].

2.3.3.2 Dosage du gluconate chez une brebis implantée

Le dosage du gluconate est réalisable chez le rat avec l'utilisation d'une cage métabolique. Nous avons réalisé quelques essais mais le rapport bénéfices/aspects éthiques n'était pas suffisant dans l'état actuel des expériences pour pousser plus loin les investigations. En effet, le recueil des urines de 24H s'effectue au travers d'une grille sur laquelle le rat est placé dans un espace très réduit. Cet environnement constitue un stress supplémentaire qui pourrait interférer avec les données métaboliques. En revanche, nous avons dosé le gluconate dans les urines d'une brebis implantée avec 2 biopiles (une sous-

cutané, l'autre en intra-péritonéal) en circuit ouvert. Le fonctionnement des enzymes non connectées mène à la production de gluconate. Nous avons voulu savoir si cette production était détectable. Le protocole est décrit en annexe 1. Les résultats sont présentés ci-dessous.



On voit que la concentration excrétée de gluconate est en moyenne de 37 ± 7 mg/L avant implantation. Le jour 0 correspond au jour de l'implantation. Dès le premier jour, la concentration de gluconate double puis se restabilise à la valeur moyenne au bout de 6 jours.

Le volume urinaire journalier d'une brebis étant au maximum d'1L, cela correspond à une consommation de $37 \text{ mg} \times \frac{180}{196}$ soit 34 mg de glucose/24h.

Ces 34 mg de glucose correspondent à une énergie de

$$34 \times 10^{-3} \text{ (g)} \times 4,18 \text{ (J)} \times 4 \cdot 10^3 \text{ (cal/g)} = 569 \text{ J}$$

soit à une puissance moyenne de

$$\frac{569}{86400} = 6,6 \text{ mW} \pm 1,25 \text{ mW}$$

Une biopile débitant $10 \mu\text{W}$ en continu représente donc une consommation négligeable devant les 6,6mW d'énergie correspondant au gluconate excrété.

Nous pouvons cependant estimer par calcul la puissance que devrait produire une biopile pour que son activité génère une production de gluconate susceptible d'être séparée du « bruit de fond » métabolique. Il faudrait pour cela que notre biopile délivre en continu un courant de l'ordre de de 1 mA pendant 24h00, soit avec une différence de potentiel de 0,5 V, une puissance de $500 \mu\text{W}$.

En effet, en reprenant le calcul donné par la loi de Faraday,

On a :

$$N = \frac{i \times t}{n \times F} = \frac{0,001 \times 86400}{2 \times 96485} \approx 0,45 \text{ mmol}/24H \text{ de glucose consommé à l'anode}$$

Soit $0,45 \cdot 10^{-3} \times 196 \times 10^{-3} \approx 88 \text{ mg}/24H$ de gluconate

L'allure générale de la courbe est la même chez une autre brebis implantée avec 1 seule biopile en intra-péritonéal. On voit que la concentration moyenne de gluconate est cette fois-ci plus faible, de l'ordre de 10 mg/L et on observe également un pic de gluconate à 2 jours après l'implantation.

Les biopiles implantées étant en circuit ouvert, la production de gluconate n'est pas liée à la production d'un courant par la biopile. Elle est due à l'activité de la glucose oxydase non connectée à l'électrode mais cette activité est de toute façon masquée par le métabolisme. Ces pics observés correspondent très certainement à une perturbation métabolique due à l'opération.

Les résultats montrent qu'il faudrait implanter des biopiles plus puissantes pour pouvoir estimer le « rendement physiologique » d'une biopile :

$$\text{Rendement physiologique} = \frac{\text{puissance électrique produite}}{\text{puissance métabolique consommée}}$$

2.4 Miniaturisation et forme générale de l'implant

Un implant intrapéritonéal est relativement libre dans le ventre de l'animal et peut venir bloquer mécaniquement le transit intestinal, engendrer des troubles pouvant être source de douleur, et même provoquer la mort par occlusion intestinale. L'implant doit être le moins blessant possible, il faut favoriser les formes rondes de façon à générer le moins possible d'inflammation aigüe locale.

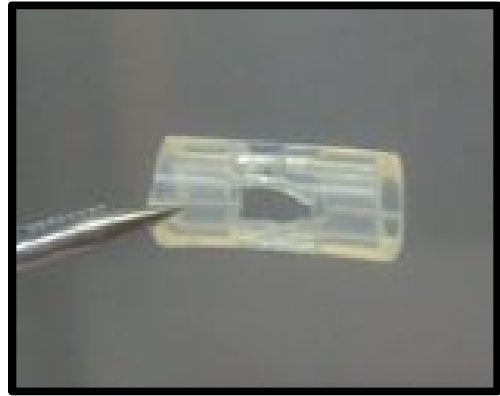
Un des premiers facteurs importants sur lequel nous avons porté nos efforts est donc la miniaturisation de l'implant.

2.4.1 Les bioélectrodes, la membrane filtrante et l'environnement aqueux

Les électrodes ont été miniaturisées sous forme de cylindres de 6 mm de longueur et 5 mm de diamètre, entourés d'une membrane d'acétate de cellulose (seuil de coupure de 6 à 8 kDa) et introduits dans un manchon de silicone perforé de 5 mm de diamètre. Le rôle de cette membrane est de limiter le gonflement de la pastille lors de son hydratation et de maintenir ainsi la cohésion étroite entre les nanotubes de carbone, les enzymes et l'électrode métallique. Le manchon permet d'obtenir la solidité mécanique nécessaire à la manipulation de l'objet, tout en conservant une certaine flexibilité. L'ouverture pratiquée de chaque côté permet l'accessibilité des substrats de la biopile.



Bioélectrodes après compression : cylindres de 5 mm de diamètre et 6 mm de long



Manchon perforé en silicone de 15 mm et 7 mm de diamètre.

Figure 2.6 : constituants de la biopile de 2^{ème} génération

Les étapes de la réalisation de la biopile à partir de des électrodes compressées, de membranes d'acétate de cellulose et du manchon de silicone sont présentées dans la figure 2.7.

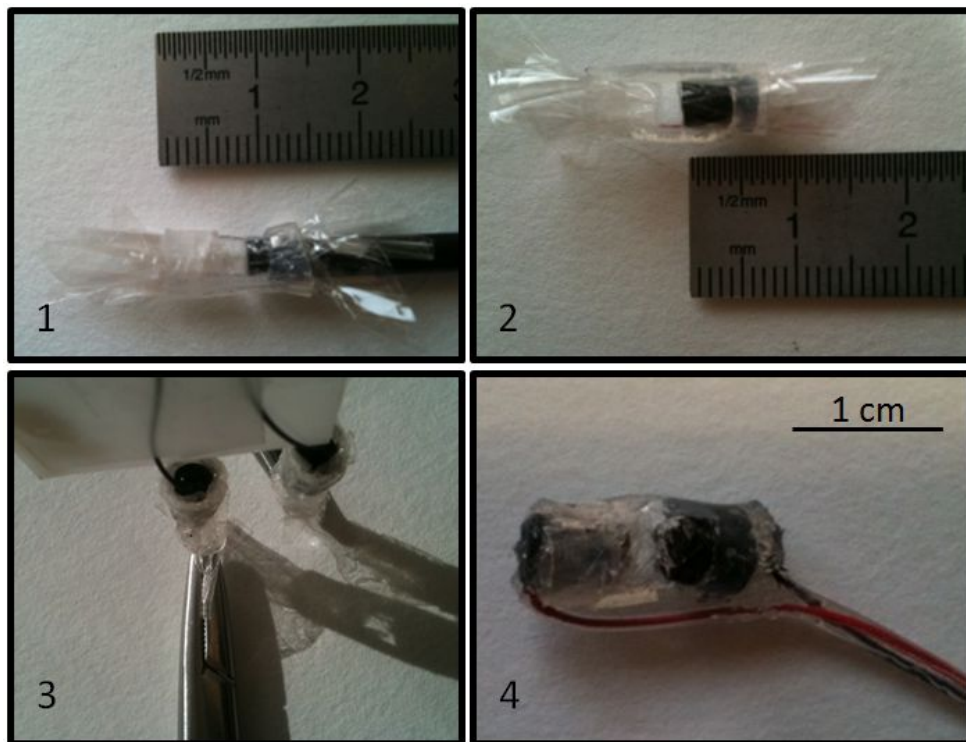


Figure 2.7 : étapes de réalisation de la biopile de 2^{ème} génération. 1) Introduction de la membrane d'acétate de cellulose à l'aide d'une tige en fibre de carbone de 5mm de diamètre. 2) Introduction des bioélectrodes. 3) Collage des fils avec de la pâte de carbone conductrice. 4) Enrobage du dispositif avec du silicone

La biopile est alors ensachée dans un 2^{ème} sac de dialyse contenant du tampon, pour que l'hydratation de la biopile soit maximale, ce qui permet en outre de conférer à la biopile le milieu aqueux dont elle a besoin pour fonctionner. De cette façon, nous sommes arrivés à réduire la taille de l'implant de manière significative, en obtenant un implant de forme conique de 2,5cm de haut et 1,5 cm de diamètre, soit un volume de 2mL environ. La biopile ainsi préparée en atmosphère stérile sous hotte à flux laminaire est présentée figure 2.12.

2.4.2 L'enrobage biocompatible

Comme nous l'avons évoqué dans l'introduction, nous avons utilisé pour les premières implantations 2 « couches » de protection de la biopile : la première couche est un sac de dialyse constituant un maillage laissant passer le glucose tout en évitant le passage des protéines, notamment les anticorps. Pour diminuer la réponse inflammatoire et permettre une bonne intégration de ce sac, nous l'avons recouvert d'une 2^{ème} couche de matériau en nous basant sur l'intégration des prothèses vasculaires.

Quelques prothèses vasculaires sont fabriquées à partir de polymères naturels comme la gélatine, le collagène, ou les tissus ou vaisseaux décellularisés mais celles-ci sont difficilement manipulables et peu reproductibles dans leur fabrication [23].

En revanche, il existe différents types de matériaux synthétiques à l'heure actuelle [24]–[27] pour fabriquer ces prothèses et leur fabrication est facilement contrôlable: le polypropylène, le polyuréthane (PU), le polytétrafluoroéthylène expansé (e-PTFE) plus connu sous son nom commercial Gore Tex[®] et le polyéthylène téréphtalate (PET) commercialisé sous le nom de Dacron[®].

Ces membranes ont été optimisées par des dépôts protéiques limitant l'adhésion cellulaire, mais les recherches actuelles s'orientent surtout vers l'utilisation de biomatériaux biodégradables [28] (PCL polycaprolactone, acide poly(lactique-co-glycolique PLGA), fibroïne de soie,...) et l'utilisation de nouvelles techniques de fabrication, notamment le dépôt de fibres par électrospinning ou électrospraying pour créer des architectures 3D mimant la matrice extracellulaire.

L'idée générale est d'implanter un matériau biodégradable facilitant l'endothélisation et remplacé progressivement par des néo-vaisseaux.

Le polypropylène ($[(CH_3-CH)-CH_2-]_n$) reste très peu utilisé dans les prothèses et nécessite un traitement antioxydant pour éviter sa dégradation *in vivo*.

Le polyuréthane ($[-NH-O=C-C-O-R-]_n$) est le moins utilisé malgré le fait qu'on peut facilement le rendre très flexible en jouant sur la chimie de fabrication (réaction d'un isocyanate et d'un alcool). Il nécessite cependant une modification chimique pour le rendre plus stable et non biodégradable. La première génération de prothèses polyuréthane libérait des sous-produits carcinogènes (2,4-toluène diamine) lors de sa dégradation *in vivo*. Les prothèses vasculaires de nouvelle génération (Vectra[®]) ne présentent pas de différence significative en terme de perméabilité primaire, secondaire et complications par rapport au PTFE et au PET [29].

Les prothèses les plus utilisées à l'heure actuelle sont le e-PTFE et PET [30]. Ces 2 types de matériaux permettent une excellente intégration de la prothèse et montrent peu de différence pour les greffes vasculaires. Les limites de ces greffes sont le vieillissement et l'occlusion des prothèses d'un diamètre inférieur à 6mm due au faible débit et à la différence de souplesse entre la prothèse et le vaisseau [31].

	PET (Dacron)		e-PTFE (Gore-Tex)		Polyurethane (PU)	
	tissé	tricoté	DIN (distance internodale) < 30µm	(DIN) >45µm	fibrillaire	mousse
avantages	meilleure stabilité, faible perméabilité et moins de saignement	porosité plus forte, prolifération cellulaire, extensible	biostabilité, faible porosité, pas de dilatation dans le temps	Biostabilité, Forte porosité, meilleure prolifération cellulaire	flexibilité, biocompatibilité et hémocompatibilité	
désavantages	rigide et peu d'incorporation tissulaire, effilochage	dilatation dans le temps	formation de sérome autour de la prothèse, peu d'incorporation cellulaire	desquamation tardive de l'endothélium si DIN >90µm	imperméable (couche intermédiaire en Thoralon®)	
cicatrisation	capsule fibrineuse à l'intérieur, collagénique à l'extérieur, qq amas endothéliaux	capsule de fibrine à l'intérieur, formation sporadique d'endothélium	fibrine et tapis de plaquettes, tissus conjonctif avec cellules géantes type FBR	Invasion de macrophages et PN, angiogénèse, migration fibroblastique	fine couche de fibrine, cellules géantes à l'extérieur, pas de prolifération cellulaire limitée	Meilleure prolifération cellulaire avec porosité plus forte

Figure 2.8 : prothèses vasculaires synthétiques d'après [32]

Le PET ($[O=C0-C6H6-O-CO-CH_2CH_2]_n$) se présente sous la forme d'une fibre polyester tissée ou tricotée. Le tricotage permet d'accéder à des prothèses plus souples et déformables [33]. Le Dacron tissé forme des pores de taille réduite, alors que le Dacron tricoté forme des boucles enchevêtrées donnant du velouté à la structure. Cette porosité, de l'ordre de 2500 mL/cm²/min (source Vascutek), environ 10 fois plus forte que pour le Dacron tissé, facilite la prolifération cellulaire au sein de la prothèse. L'imprégnation d'une matrice biodégradable[30] (collagène, albumine, gélatine) les rend étanches au moment de leur implantation et des greffages chimiques peuvent augmenter leur biocompatibilité en favorisant l'organisation des tissus naissants [34].

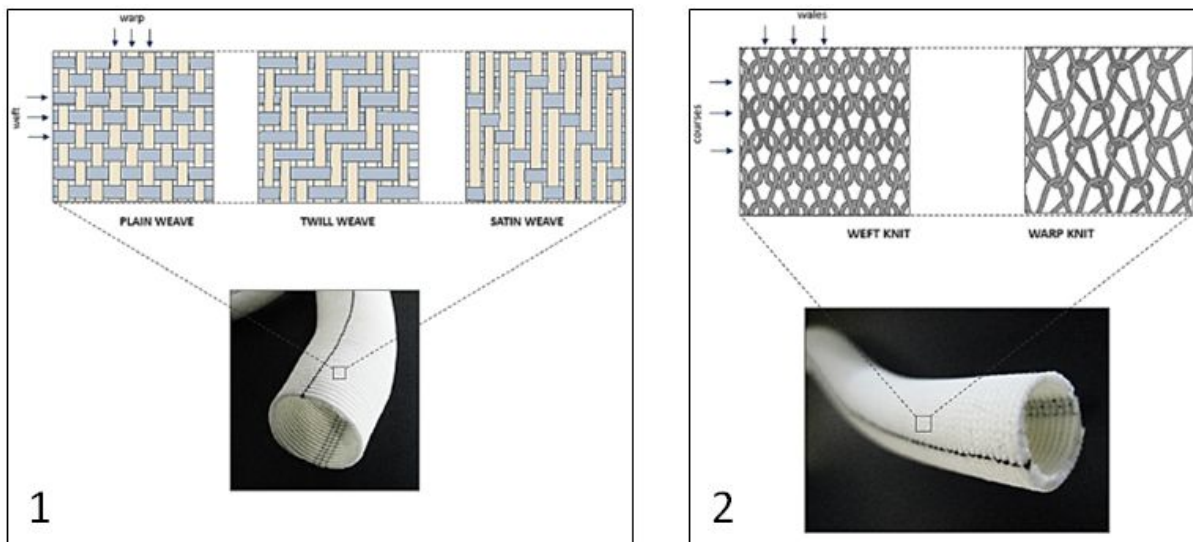


Figure 2.9 : prothèses en polyester. 1) Dacron® tissé 2) Dacron® tricoté [33]

Le e-PTFE ($[CF_2-CF_2]_n$) [35] est un matériau non-textile microporeux possédant une structure alvéolaire ouverte constitué de nœuds et de fibres entrelacées. Sa porosité est définie par la distance internodale (DIN), c'est-à-dire l'espace entre 2 nœuds (30, 60, ou 100µm). Lorsque la porosité est faible, de l'ordre de 30 µm, la colonisation cellulaire est très largement

histiocytaire et mène à une encapsulation fibreuse peu vascularisée. L'augmentation de la porosité permet d'incorporer du tissu conjonctif et la formation d'une néo-vascularisation.

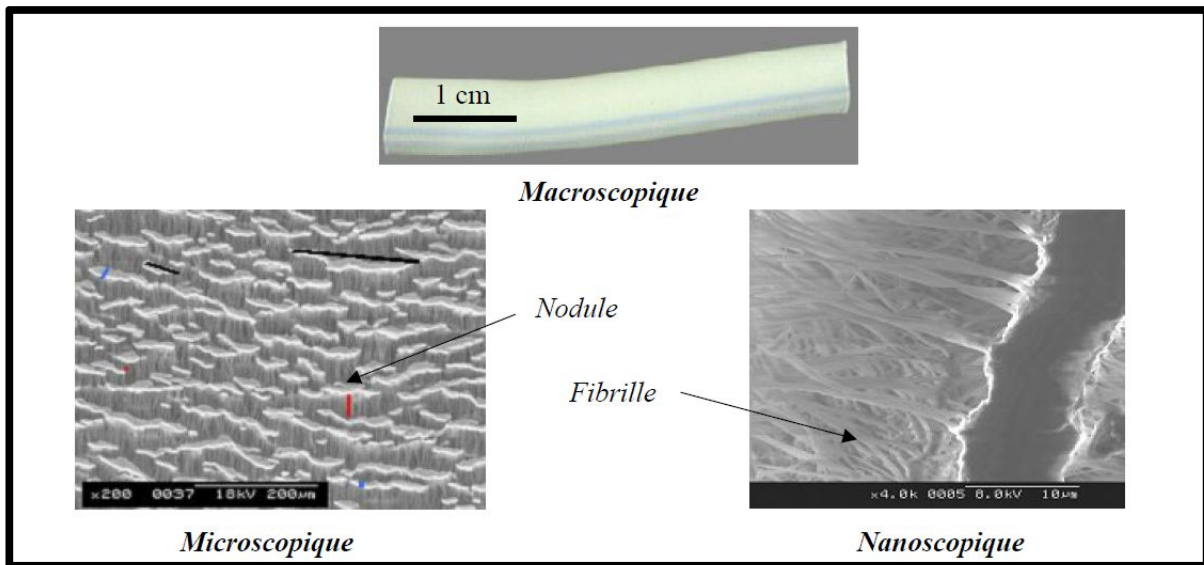


Figure 2.10 : structure à différentes échelles du e-PTFE (d'après [35])

L'utilisation que nous voulons faire de ces prothèses est toutefois quelque peu différente puisque l'on veut certes une matrice facilitant une colonisation cellulaire, mais également avoir une diffusion de glucose la plus grande possible. Or, l'hydrophobicité du téflon expansé est incompatible avec la diffusion libre de glucose. En effet, il est connu que seuls les gaz (et donc les molécules d'eau sous forme de vapeur) peuvent diffuser librement au travers de ce type de membrane microporeuse. Une expérience de diffusion passive entre 2 compartiments séparés par une membrane d'e-PTFE a montré que cette membrane était particulièrement isolante aux molécules de petite taille : des ions ferrocyanure ou la fluorescéine à forte concentration (détectée en spectrofluorimétrie) placés dans le premier compartiment, n'ont pas été mis en évidence dans le second compartiment même après plusieurs jours de diffusion.

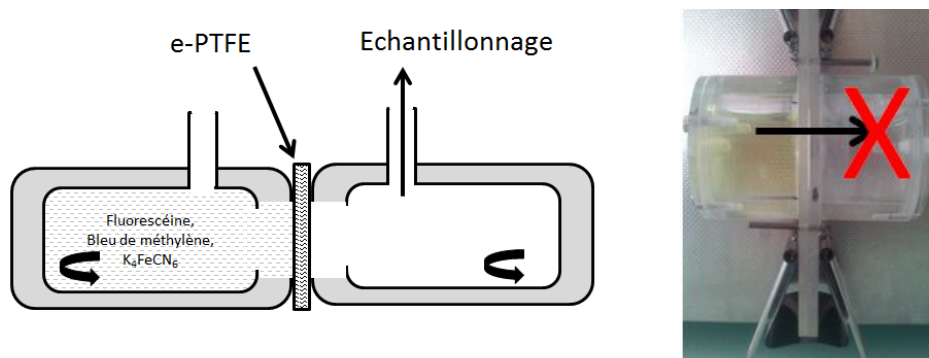


Figure 2.11 : expérience de diffusion au travers une membrane de e-PTFE

Les prothèses vasculaires en polyuréthane, comme les prothèses en PTFE, sont également non tissées. Elles présentent un avantage certain en termes de résistance mécanique à la ponction mais possèdent une couche imperméable séparant 2 couches microporeuses. La couche interne, recouverte par un traitement de surface, est conçue pour diminuer l'adhésion plaquettaire. La porosité forte de la couche externe permet la repousse tissulaire (Thoratec

corp. et Bard Peripheral Vascular Inc.). Comme la couche intermédiaire est étanche, le matériau n'est donc pas adapté à notre application.

Pour créer un environnement favorable à l'acceptation de l'implant, nous avons utilisé un enrobage en Dacron®.

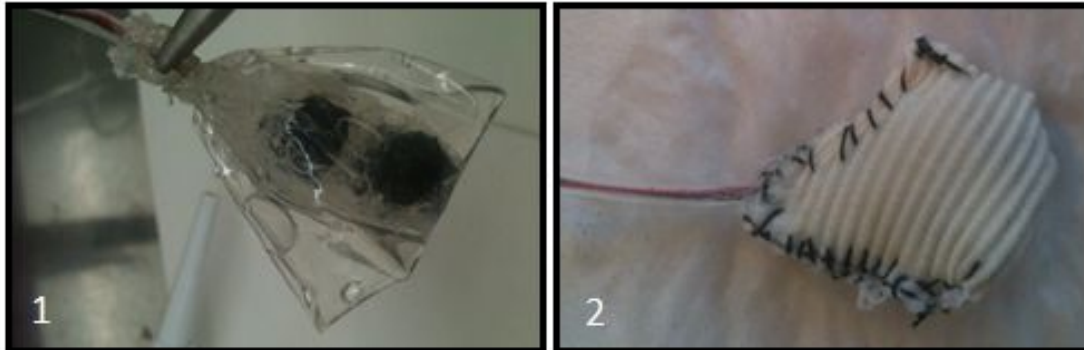


Figure 2.12 : dernière étape de préparation de la biopile de 2ème génération.

1) Un sac de dialyse 6-8 kDa permet de bien hydrater la biopile. 2) Un enrobage en polyester est cousu autour de la biopile pour conférer une couche de biocompatibilité avec l'hôte.

Nous avons pu confirmer que cette fibre polyester conférait une excellente biocompatibilité au dispositif sur une longue période: les autopsies pratiquées montrent que la biopile adhère le plus souvent à la graisse épidydimale du rat. Quelques adhérences à l'intestin et au colon sont parfois notées, sans incidence sur la bonne santé de l'animal.

Au niveau microscopique, cet enrobage de polyester est très rapidement colonisé par des cellules inflammatoires, mais cette inflammation est transitoire et laisse place à un tissu fibro-adipeux richement vascularisé.



Figure 2.13 : implant au voisinage du Dacron® après 2 mois d'implantation intra-abdominale. Les flèches horizontales pleines montrent les fibres de Dacron®, les flèches verticales pointillées montrent la vascularisation de l'implant.

L'analyse histo-pathologique des implants montre une excellente intégration cellulaire entre les fibres de Dacron. Ce type de prothèse perméable est d'un grand intérêt pour notre application, car les mailles sont progressivement colonisées par un tissu conjonctif d'abord lâche, inflammatoire et œdémateux puis fibreux mais conservant une vascularisation importante.

2.5 Mesure des paramètres électriques de la biopile implantée

Depuis la première version de biopile implantée, tout a été fait pour miniaturiser la taille de l'implant, y compris la taille des fils électriques utilisés. Nous avons utilisé dans un premier temps des fils monobrins en cuivre d'un très faible diamètre, introduits chacun dans un cathéter en polyéthylène (PE) de faible diamètre (0,56 mm), permettant de les isoler électriquement et de parfaire la biocompatibilité du système. Malheureusement, ces fils finissaient souvent par casser dans l'animal lors de la mesure.

Une des optimisations de la biopile a été d'utiliser un fil miniature vendu par la société Industrifil. Ce fil électrique a été choisi pour ses caractéristiques techniques : c'est un multibrin torsadé, ce lui procure solidité et souplesse, et son faible diamètre (0,3 mm) est tout à fait compatible avec une implantation dans le rat. Bien que l'isolant électrique qui le recouvre soit en Téflon[®], qui est un matériau inerte, nous avons introduit les fils dans un cathéter à paroi mince en silicone (1,5 mm int /1,9mm ext) pour rendre plus étanche le lien réalisé au niveau du sac de dialyse, guider les fils et faciliter la ressortie au niveau de la nuque.

Lors des premières mesures électriques réalisées sur animal vigile, les fils ressortaient dans leur cathéter en PE au niveau de la nuque. C'est en effet l'endroit le plus adéquat pour éviter que l'animal ne les voie et ne les ronger. Le cathéter était enroulé sur lui-même en formant une boucle. Pendant la mesure, le rat était placé dans une boîte de contention où les fils pouvaient être déroulés, dénudés et branchés au potentiostat. Malgré une habitude à la boîte de contention pendant quelques jours avant l'opération, si les mesures s'étendaient au-delà de 15 minutes, il arrivait souvent que le rat se mette à tourner dans le tube de contention en tirant sur les fils, ce qui pouvait engendrer un mouvement de la biopile implantée.

De plus, le rat libre de mouvements dans sa cage, finissait tôt ou tard par trouver le cathéter, le dérouler et le ronger. Ceci avait de multiples conséquences : la possibilité de mettre la pile en court-circuit si les 2 fils venaient à se toucher, les mesures devenaient impossible si le cathéter devenait trop court.

Comme nous envisagions d'implanter pour une durée de plus en plus longue tout en donnant la possibilité de mesurer pendant un temps plus long, il nous a paru indispensable d'optimiser la connectique entre la biopile et le potentiostat. Plusieurs solutions ont été envisagées pour pallier ce problème.

La première solution a consisté à poser un manchon en silicone soutenu par un treillis de Dacron. Cette optimisation était intéressante, car les fils étaient fixés dans une partie du manchon par de l'acrylique dentaire, ce qui empêchait tout mouvement des fils dans un sens ou dans l'autre. Le treillis de Dacron est suturé en sous-cutané pour le solidariser au rat et empêcher la sortie des fils lors des mesures. L'autre partie du manchon permettait le repliement des fils pour les protéger. Les mesures ont continué à se faire en boîte de contention, car la connectique jusqu'au potentiostat comprenait des éléments trop lourds pouvant fragiliser le bouton.

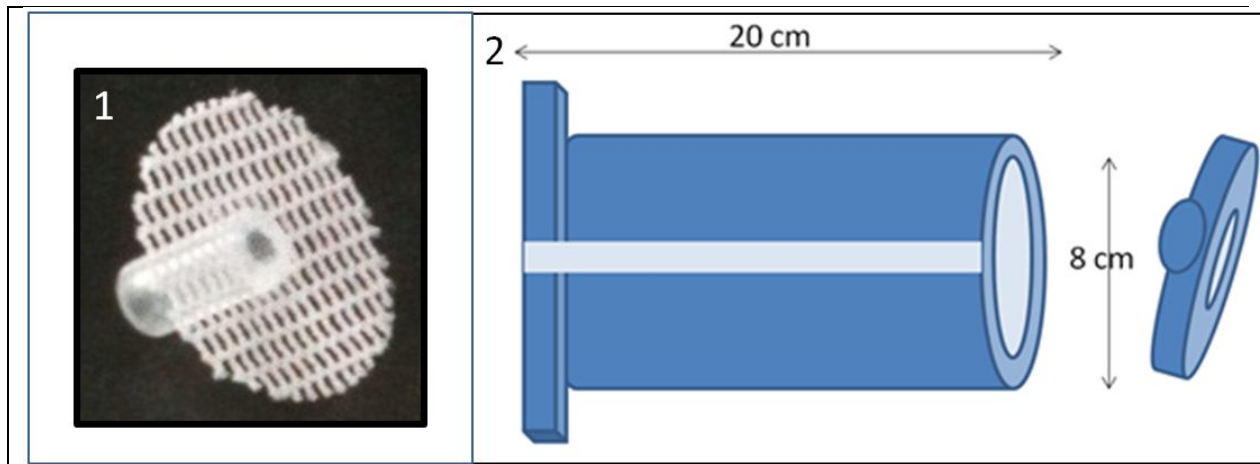


Figure 2.14 : un premier dispositif de mesure. 1) Bouton en Dacron®. 3) Mesure en boîte de contention.

La pose d'un connecteur sur l'animal nous a paru le système le plus simple à envisager pour réaliser des mesures sur l'animal libre de ses mouvements. Plusieurs stratégies ont été envisagées.

La pose d'un connecteur non fixé à l'animal s'est révélée infructueuse car l'animal l'a rapidement trouvé et arraché.

De même, nous avons envisagé de fixer le connecteur à un gilet spécialement conçu pour ce genre d'activité : celui-ci est composé de 2 parties. La première partie s'enfile par les pattes et vient se refermer au niveau de la nuque de l'animal avec un système d'agrafes et de velcro « velours » sur un tissu « crochet » constituant la 2^{ème} partie. C'est sur ce tissu que nous avons fixé le connecteur femelle. Pour être sûr que le rat n'arrache pas les velcros, nous avons renforcé la fermeture par la couture d'un tissu en polyester. Cela n'a malheureusement pas suffi, car le rat a rongé le gilet au bout de quelques jours, certes pas au niveau des renforts, mais au niveau du thorax, entre les pattes avant. Ce type de gilet est adapté à des expérimentations de courte ou moyenne durée inférieures à une semaine.

Nous avons alors envisagé de fixer le connecteur sur l'animal. En premier lieu, nous nous sommes intéressés à la pose d'un connecteur percutané.

En effet, Sabin *et al* 1997 [36] ont développé une technique de fixation permanente chez le lapin d'un connecteur percutané pour des mesures d'EEG à long terme en se basant sur des travaux suédois, pionniers dans le maintien de prothèses faciales grâce à des implants extra-oraux. Cette équipe a d'ailleurs implanté le premier connecteur percutané électrique pour stimuler l'oreille interne et diminuer les acouphènes [37].

L'opération s'effectue en deux étapes : on réalise d'abord une ostéo-intégration d'un implant constitué d'une plaque maintenue par l'intermédiaire de 4 vis en titane de 2 mm de diamètre vissées dans l'os crânien. Un contrefort percutané formé d'un anneau et du connecteur vient ensuite se visser dans la plaque à la manière d'un implant dentaire. Nous n'avons pas envisagé de réaliser ce type d'intervention chez le rat pour plusieurs raisons:

- La finesse de l'os du crâne,
- La complexité de la miniaturisation nécessaire et la technique à acquérir,

- La complexité de l'opération et le point de vue éthique : nécessité de fixer un connecteur sur le crâne pour une biopile intra-abdominale constitue un arsenal de techniques très (voire trop ?) important pour la collecte des données électriques.

En revanche, nous avons adapté une technique utilisée couramment en neurobiologie pour mesurer l'activité électrique de différentes zones du cerveau chez le rat, par exemple pour les travaux sur l'épilepsie (rat GAERS). Dans ce cas, l'animal est placé dans un cadre stéréotaxique équipé d'un micromanipulateur, et des trous sont réalisés grâce à une fraise dentaire. Un micromanipulateur permet de mettre en place les électrodes qui sont enfoncées dans les zones d'intérêt, et une vis d'ancrage assure le maintien de l'ensemble avec du ciment acrylique.

Dans notre cas, nous avons utilisé une vis miniature en acier inox 10/18 soudée directement sur un mini-connecteur de type Fisher ou reliée au mini-connecteur via un fil pour aider à la manipulation. Après mise à nu du crâne par dilacération des tissus conjonctifs, l'os est percé avec une fraise dentaire au niveau de l'hémisphère droit, puis la vis est introduite et vissée de 2/3 de tour. Le connecteur est ensuite enrobé d'acrylique dentaire pour l'isoler électriquement et pour consolider la fixation au crâne.

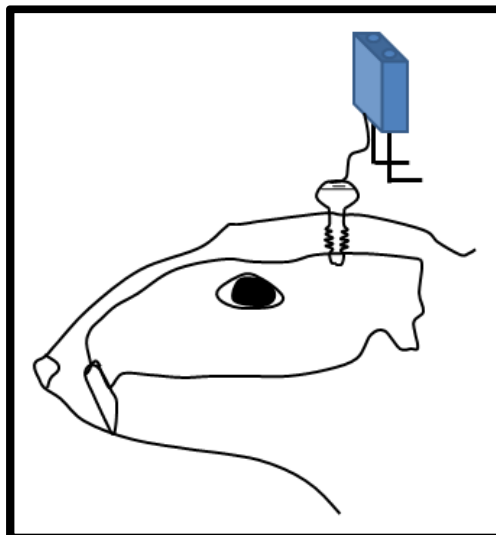


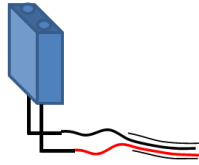
Figure 2.16 : un dispositif utilisant un connecteur fixé.

Les 2 essais que nous avons réalisés n'ont pas été concluants : le connecteur a fini par se décoller au bout de 6 jours pour l'un et de 9 jours pour l'autre. De plus, nous avons observé chez l'un des 2 rats, un changement de comportement, notamment de l'agitation, que nous n'avions pas observé jusqu'à présent.

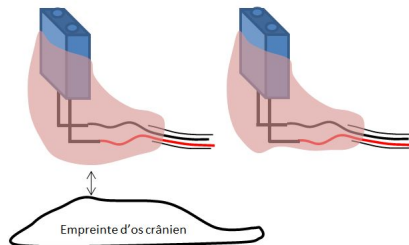
Nous avons finalement opté pour une solution consistant à enrober la base du connecteur dans un plot de ciment acrylique qui est ensuite collé sur le crâne de l'animal avec un mélange de cyano-acrylate biocompatible et d'acrylique dentaire. Pour que le connecteur épouse la forme du crâne, nous avons préparé un moule en ciment dentaire servant de support pendant la phase de solidification du ciment.

La figure 2.17 ci-dessous décrit les différentes étapes du collage du connecteur sur le crâne de l'animal.

Etape 1
soudure des fils au
connecteur.

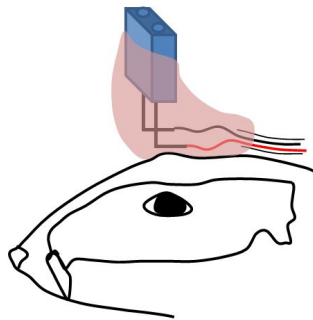


Etape 2
enrobage et moulage
du connecteur dans
l'acrylique dentaire



Os du crâne de rat et
moule en résine
photo polymérisable

Etape 3
collage du
connecteur sur le
crâne de l'animal



Etape 4
pose d'un cache-prise

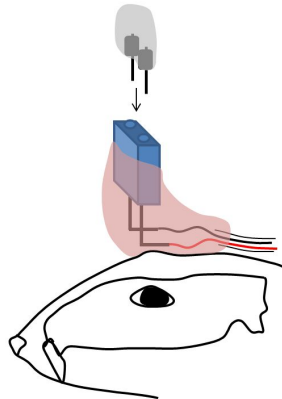


Figure 2.17 : étapes de la fixation d'un connecteur fixé sur le crâne du rat.

Cette technique s'est avérée efficace pour des mesures électriques sans décollement du connecteur pendant une quinzaine de jours. L'analyse macroscopique de cette région lors de l'autopsie des animaux montre des tissus parfois très inflammatoires, ainsi que du tissu conjonctif qui repousse entre le connecteur et l'os du crâne. L'utilisation d'un connecteur femelle évite les court-circuits avec la grille de la cage mais également lors de la toilette de l'animal. Le seul risque de court-circuit est la possibilité qu'une goutte d'eau du biberon ne tombe sur le connecteur. La pose d'un « cache-prise » mâle n'a pas été efficace dans le temps car le rat a assez rapidement trouvé le moyen de l'enlever.

Lors de la mesure, la liaison avec le potentiostat est réalisée avec un connecteur mâle qui vient s'adapter parfaitement au connecteur femelle fixé sur le crâne. Les fils utilisés sont les fils miniatures très légers utilisés pour l'implantation. Ils sont suspendus à une potence au-dessus de la cage du rat. Cette technique de collage du connecteur a permis d'obtenir des résultats très satisfaisants. En effet, elle a permis non seulement d'augmenter la durée totale de l'implantation (de quelques jours à une 20^{aine} de jours) mais également de rallonger les temps de mesure car, une fois le rat « branché », il est laissé libre de mouvement dans sa cage sans (trop) s'occuper des fils maintenus au-dessus de sa tête.

La fixation d'un connecteur permettant les mesures électriques de la biopile implantée est l'une des contributions décrites dans « single biofuel cells implanted in rats power electronic devices », présenté en fin de chapitre.

2.6 Mise en place d'un protocole de suivi des animaux

Le suivi des paramètres physiologiques s'est limité à la mesure de la masse corporelle et de l'alimentation, l'observation des fèces et du comportement général de l'animal. L'implantation de biopiles chez l'animal ne doit pas générer de douleur. La réussite des implantations tient en partie au fait que les animaux sont en bonne santé physique et psychologique, de préférence peu agressifs. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, les réponses biologiques au stress incluent la réponse du système immunitaire, et il est primordial pour nos expériences de favoriser une bonne cicatrisation ainsi qu'un état de bien-être évitant des pathologies opportunistes. En pratique, l'enrichissement du milieu couvre de nombreuses initiatives techniques ingénieuses et imaginatives pour occuper les animaux captifs. Différentes actions ont permis de diminuer le stress chez le rat.

-Un programme d'enrichissement du milieu a été mis en place, avec l'introduction d'un tunnel cartonné de 80mm de diamètre et d'une quinzaine de cm de long avec lequel le rat joue. Il peut également s'y cacher, ce qui a un effet apaisant pour lui. L'amélioration des conditions d'hébergement a permis de diminuer le stress et a favorisé la récupération post-opératoire.

-La mise en place d'un jeu quotidien entre l'expérimentateur et les animaux avant leur opération a facilité leur manipulation : le jeu consistait à pousser la sciure de la litière avec les doigts pour former un petit tas devant le rat, suite à quoi le rat répondait par la même action. Après ce jeu d'environ 4 à 5 minutes, le rat ne montrait aucun signe de stress ni d'agressivité lors de sa manipulation pour le branchement du connecteur. L'aspect social est particulièrement important pour nos implantations tant qu'un système de monitoring *in vivo* n'a pas été mis au point, car les rats doivent être isolés les uns des autres afin d'éviter le grignotage de leur connecteur.

-Au niveau de la gestion de la douleur, un anti-inflammatoire non stéroïdien (Rimadyl) a été prescrit et systématiquement injecté pendant les premiers jours suivant l'implantation puis de façon moins systématique en fonction du comportement de l'animal. Nous avons recherché les signes de douleur dans les comportements classiques comme la prostration, le dos voussé, le poil hérissé, mais aussi en utilisant l'échelle du « grimace facing » décrit récemment [37] comme un bon marqueur de la douleur chez le rongeur (plissement des yeux,

nez et joues moins bombées, oreilles repliées, moustaches rassemblées vers l'arrière du museau).

L'observation des paramètres physiologiques et comportementaux des animaux a montré l'innocuité des implantations pratiquées :

-Nous n'avons pas noté de manifestation de douleur avec les indicateurs cités plus haut.

-Les rats implantés avaient un comportement d'exploration et de toilettage normal.

-La cicatrice laissée par la laparotomie ainsi que par la pose du connecteur était rapidement résorbée après quelques jours.

-La pesée quotidienne des rats a montré que leur poids augmentait de façon régulière avec cependant une légère inflexion due à l'opération chirurgicale pendant les 2 ou 3 premiers jours.

-La pesée de l'alimentation a également montré une certaine constance, avec une moyenne de 26 ± 3 g d'aliments consommés par jour pendant la durée de l'expérimentation.

2.7 Performances obtenues in vivo par une biopile à transfert direct

Toutes les études réalisées dans les paragraphes décrits plus hauts ont permis l'implantation de cette 2ème génération de biopile fournissant une forte puissance volumique $160 \mu\text{W}/\text{mL}$. Nous montrons qu'elle est capable d'alimenter des dispositifs médicaux implantables.

Une telle puissance volumique représente un atout considérable par rapport aux piles classiques et justifie l'intérêt que l'on porte aux biopiles implantables. En effet, on dépasse la limite de $100 \mu\text{W}$ des dispositifs utilisant l'énergie physique. On voit que l'on peut atteindre la puissance nécessaire pour alimenter un sphincter urinaire artificiel avec une biopile de 10 mL, ou encore alimenter les pacemakers de future génération implantés directement dans le cœur : la miniaturisation est en effet un facteur essentiel et la pile n'occupera plus que $100 \mu\text{L}$ en délivrant $16 \mu\text{W}$.

Ces résultats ont mené à la publication d'un article dans Scientific Reports présenté ci-après [39] avec la permission de l'éditeur.



Single Glucose Biofuel Cells Implanted in Rats Power Electronic Devices

SUBJECT AREAS:
IMMOBILIZED ENZYMES
FUEL CELLS
BIONANO ELECTRONICS
ELECTROCATALYSIS

A. Zebda^{1,2}, S. Cosnier¹, J.-P. Alcaraz², M. Holzinger¹, A. Le Goff¹, C. Gondran¹, F. Boucher², F. Giroud¹, K. Gorgy¹, H. Lamraoui³ & P. Cinquin²

¹Univ Grenoble 1, CNRS, Département de Chimie Moléculaire, UMR-5250, ICMG FR-2607, BP-53, 38041 Grenoble Cedex 9, France, ²UJF-Grenoble 1/CNRS/TIMC-IMAG UMR 5525, Grenoble, F-38041, France, ³UroMems - 46 av. Félix Viallet - 38031 GRENOBLE cedex, France.

Received
21 December 2012

Accepted
25 February 2013

Published
22 March 2013

Correspondence and requests for materials should be addressed to S.C. (Serge.Cosnier@ujf-grenoble.fr) or P.C. (Philippe.Cinquin@imag.fr)

We describe the first implanted glucose biofuel cell (GBFC) that is capable of generating sufficient power from a mammal's body fluids to act as the sole power source for electronic devices. This GBFC is based on carbon nanotube/enzyme electrodes, which utilize glucose oxidase for glucose oxidation and laccase for dioxygen reduction. The GBFC, implanted in the abdominal cavity of a rat, produces an average open-circuit voltage of 0.57 V. This implanted GBFC delivered a power output of 38.7 μW , which corresponded to a power density of 193.5 $\mu\text{W cm}^{-2}$ and a volumetric power of 161 $\mu\text{W mL}^{-1}$. We demonstrate that one single implanted enzymatic GBFC can power a light-emitting diode (LED), or a digital thermometer. In addition, no signs of rejection or inflammation were observed after 110 days implantation in the rat.

Since the first successful cardiac pacemaker was implanted in 1960, a variety of implantable battery-powered devices has been developed for various indications, ranging from neurological disorders to hearing loss. The development of lithium batteries in the late 1960s led to better and smaller devices, which showed multiyear longevity and high reliability¹. Although such batteries continue to be considered as the first choice to power electronic medical implants, there are numerous efforts to develop alternative power-supply systems that are capable to operate independently over prolonged periods of time without the need for external recharging or refuelling²⁻⁴. Several alternatives have been explored in order to power implanted devices with energy from sources in the patient's body. However, systems that take advantage of the Seebeck thermoelectric effect, vibrations or body movements to generate power for an implanted device are limited because these techniques are dependent on the non-continuous nature of vibrations or temperature differences within the human body. GBFCs represent a more promising alternative because they are theoretically able to operate indefinitely due to the ubiquity of glucose and oxygen in the extra-cellular body fluid at constant levels of $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ and $45 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, respectively⁵⁻⁸.

The production of electric power out of body fluids of animals, using glucose as fuel, was first envisioned in the 1970's. In their review, Kerzenmacher et al. mentioned implanted abiotic glucose fuel cells using noble metals as catalysts³. However, the low specificity of the catalysts and the low power output density of these implanted devices precluded further developments.

Following recent developments in nano- and biotechnology, state-of-the-art biofuel cells guarantee high specificity to the fuel, along with satisfactory power densities. These milestones have given rise to a steady growing interest in this research field⁹.

Biofuel cells often employ enzymes to catalyze chemical reactions, thereby replacing traditional catalysts present in conventional fuel cells¹⁰⁻¹². These systems generate electricity under mild conditions through the oxidation of renewable energy sources¹³. The advantages of biocatalysts are reactant selectivity, activity under physiological conditions, and facile manufacturability¹⁴.

With the aim of developing implantable power sources in the human body, Katz and co-workers demonstrated that a GBFC can produce electricity from a snail¹⁵ and reported more recently two "Cyborg" lobsters connected in-series to power a watch¹⁶. Rasmussen et al¹⁷ placed a GBFC in an insect (*Blaberus discoidalis*, a cockroach species). Szczupak et al¹⁸ implanted GBFCs in clams and connected three of them in series. With this setup, a capacitor could be charged, allowing an electrical motor to rotate. Although these experiments were not performed with mammals, these studies demonstrate that GBFCs can produce electricity out of living organisms. It



appears that an attractive mode of operation for biofuel cells consists in the energy accumulation through capacitors for the intermittent activation of model devices. This mode of GBFC function may be applied to the activation of some sensor devices for medical monitoring.

Concerning the human implantable application, we recently reported a GBFC that is able to generate electric power inside a rat from glucose and oxygen contained in its body fluids¹⁹. This work was the first demonstration of an implanted GBFC delivering electrical power inside a living organism and, in particular, inside a mammal. However, both, the open-circuit voltage and power density were far below the levels required to supply implanted biomedical devices.

Our recent improvements in GBFC concepts in terms of carbon nanotube compression and direct electron transfer led to high open-circuit voltage (OCV), high power output, and stabilities over weeks²⁰. Taking advantage of this improved performance, we report here an original design of a GBFC, based on carbon nanotube-matrix bioelectrodes, and its successful implantation in a rat. One single implanted GBFC device of 0.24 mL volume (2.4 mL for the whole implant) produced the power required to operate, using a specially designed electronic circuit to charge a capacitor, two types of electronic devices: a LED and a digital thermometer.

Results

The bioelectrodes were formed by compression of a CNT/enzyme mixture to pellets and wired using a carbon paste²⁰. Such electrodes were wrapped in a dialysis membrane and placed in a perforated silicone tube (Figure 1A), protected by a silicon layer (Figure 1B), packed in dialysis bag, and sutured inside a Dacron[®] sleeve (Figure 1C). The GBFC was surgically implanted in the abdominal cavity of a rat where the wires were tunnelled up to the head. These wires were then soldered to a female connector and fixed on the skull (Figure 1D and E). Details about the GBFC production and implantation can be found in the methods section.

The performance of four biofuel cells implanted in four different rats was characterized electrochemically. Figure 2A shows the

evolution of the OCV values of four implanted biofuel cells. The measured maximum OCVs, obtained after 6–8 days, were in the range 510–660 mV (Figure 2B) and reflect the difference between the redox potential of laccase at the biocathode and the redox potential of GOx at the bioanode. Figure 2C represents the variation of the current as function of the biofuel cell voltage. For applied current between 150 and 700 $\mu\text{A cm}^{-2}$ the average voltage measured after 300 s of chronopotentiometry varies from 535 mV to 220 mV. Moreover, these GBFCs can continuously deliver electricity over 10 minutes at an applied discharge current of 150 $\mu\text{A cm}^{-2}$, producing 9.3×10^{-3} J. It should be noted that the voltage decreased slowly from 0.55 to 0.48 V, as it is displayed in the discharge curve of the implanted GBFC of rat 2 (Figure 2D).

To examine more accurately the GBFC voltage evolution, the latter was continuously recorded for an intermittent use of GBFC consisting of 5 minutes discharge at 50 $\mu\text{A cm}^{-2}$ followed by 7 minutes recovery at zero current. For four successive cycles, it appears that, during the discharge period, the GBFC loses less than 20 mV of its initial voltage. Furthermore, the voltage increased when the discharge was stopped, reaching its initial value after 7 minutes (Figure 2E).

These results clearly demonstrate that the implanted GBFCs are able to recover their equilibrium state after the discharge period. The time necessary to reach the initial equilibrium state is most likely due to the consumption of glucose and oxygen at the vicinity or inside the porous bioelectrodes during the GBFC discharge. These successive on-off discharge cycles indicate that this GBFC is able to deliver 50 $\mu\text{A cm}^{-2}$ during a total of 25 minutes of discharge per hour without altering its performance.

With the aim to illustrate the potential of implanted GBFC for powering real electronic devices, the implanted GBFC was connected to a boost converter (step-up converter) and applied to power a light-emitting diode (LED) that consumes 1.31×10^{-3} J (details in the method section). Figure 3A shows the illuminated LED connected to the GBFC via this boost converter. The related video (see supplementary informations) shows 5 successive flashes of the LED using this step-up. Taking into account the average time of energy

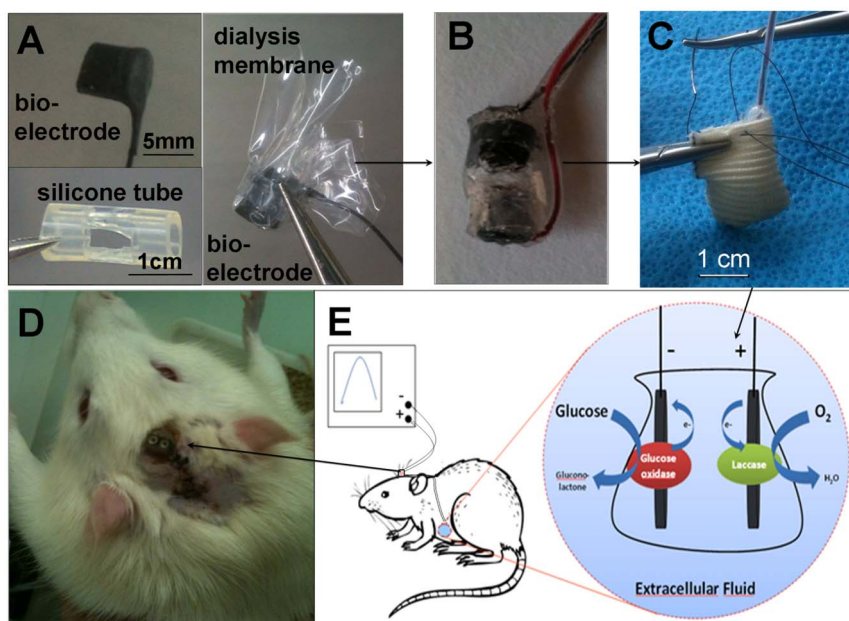


Figure 1 | From bioelectrodes to a biocompatible biofuel cell, implanted in the abdominal cavity of a rat. (A) Image of the components forming the biofuel cell: bioelectrode, perforated silicone tube, and bioelectrode wrapped in a dialysis membrane. (B) Image of our GBFC setup including both, bioanode and biocathode inserted in a silicone cylinder and sealed with silicone. (C) Photograph of the GBFC sutured in a Dacron[®] bag before implantation. (D) Electrical connection of the implanted GBFC in a Wistar rat; the output wires are fixed to the rat's skull. (E) Schematic description of the enzyme reactions producing electricity, their electrical connection and the GBFC location inside the rat.

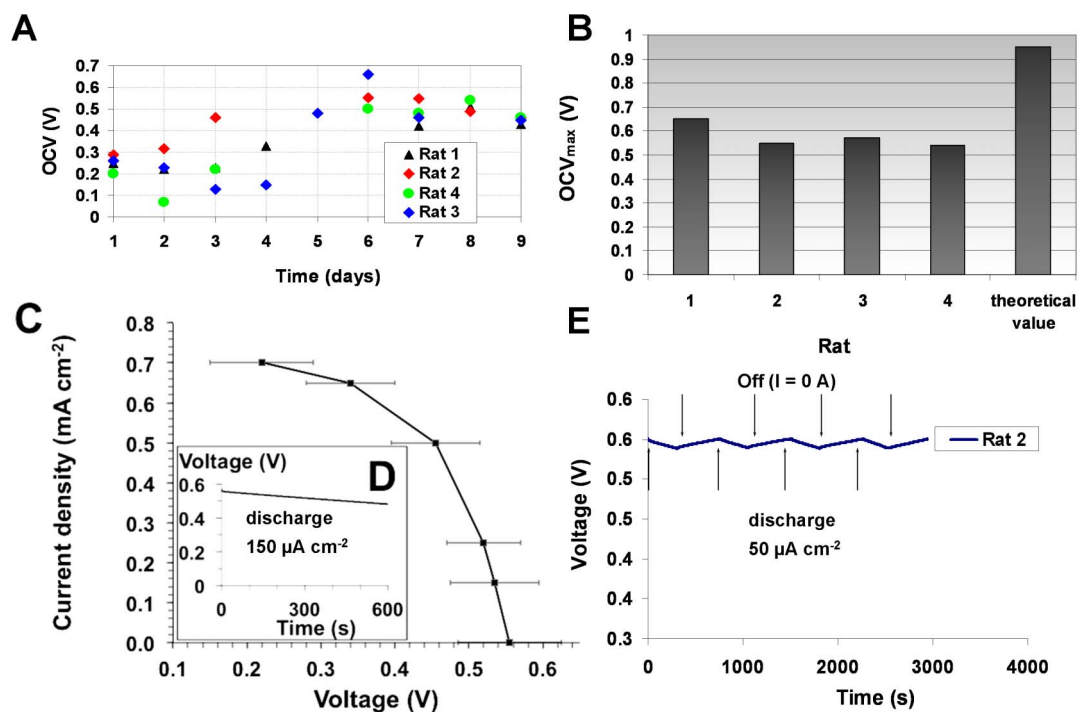


Figure 2 | Electrochemical characteristics of the implanted biofuel cell. (A) Evolution of OCV over time for 4 implanted GBFCs (B) Maximum OCVs recorded after 6–8 days; (C) Current versus average voltage. Potential values measured after 300 s of constant current discharges in the range 150–700 $\mu\text{A cm}^{-2}$. (D) Voltage dependence over time under continuous discharge of 150 $\mu\text{A cm}^{-2}$ (E) Evolution of the GBFC voltage during 4 discharge and stabilization cycles, using each time 50 $\mu\text{A cm}^{-2}$ discharge current for 5 minutes.

accumulation for 5 flashes as well as the power efficiency of the boost converter (75%), the implanted GBFC supplied an average power of 38.7 μW or 161 $\mu\text{W mL}^{-1}$.

In the same way, the implanted GBFC, combined with adapted electric circuitry, was used to power an electric thermometer that requires about 75 μW . Figure 3B and 3C shows the digital display of the powered and non-powered electric thermometer. It appears that the temperature is measured and displayed on an LCD screen when the device is connected to the GBFC. These results clearly show that the implanted GBFC can be considered as a real power source that is able to supply power to medical electronic devices.

Autopsies performed on the rats after 10 to 17 days show that the external side of the implant starts to be covered by a thin layer of vascularized tissues (See for instance rat 4, Figure 4A). After 110 days implantation in rat 1, the implant is surrounded by thick adherent adipose tissue richly vascularized (Figure 4B). The Dacron® bag,

conventionally used for implants, ensures excellent biocompatibility for the GBFC. To investigate whether the implanted GBFC can modify the physical fitness of the rat or its eating habits, we monitored daily the weight of the rat and the food consumed during more than 3 months. These observations were monitored with two rats: one rat implanted with a functional GBFC (rat 1) and another with a pseudo-GBFC containing BSA instead of enzymes (control rat). After a small weight loss due to the surgical intervention, the rat's weight increases gradually in a normal manner (Figure 4C) with an average food intake of 26 ± 3 g per day (Figure 4D). Nevertheless, it should be noted that this behavior does not reflect the biocompatibility of the electronic device in operation for three months due to the loss of connection with the biofuel cell after 9 days.

Discussion

The single implanted GBFC that we describe produces the highest output characteristics obtained for a GBFC inside the body of a mammal. One of the principal challenges for the development of an implantable electrochemical energy converter is the biocompatibility, which we achieved by enclosing the GBFC in a Dacron® bag. Moreover, our use of porous dialysis membranes inside the Dacron® bag not only prevents the external leakage of bioelectrode components (CNTs and enzymes) from the GBFC, but also prevents inward diffusion from the body fluids of biological macromolecules which can inhibit the activity of the enzymes.

The GBFC reported here produced a greater power output compared to our first report of an implanted GBFC operating with redox mediators¹⁹. In the current GBFC, the use of direct electron transfer between enzymes and electrodes led to a 20-fold increase in power density and an average OCV of 0.57 V obtained with a single GBFC. However, the *in vivo* performance was lower than that observed during the *in vitro* experiment²⁰. This was probably due to the dioxygen concentration in extracellular fluids (which is below 4.5×10^{-5} mol L⁻¹ at the venous level) being about four times lower than in the air-saturated buffer solutions that were used for the *in vitro*

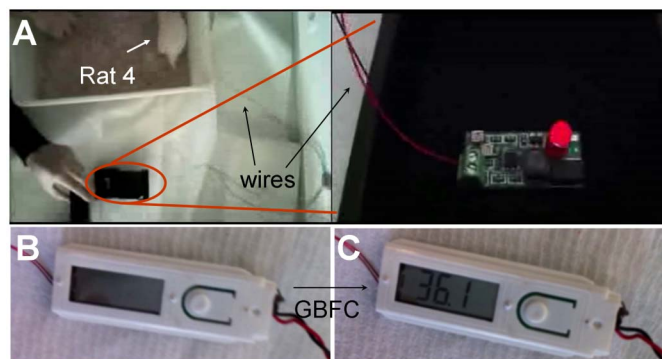


Figure 3 | A rat lights a LED and a digital thermometer (A) Image of the LED flashes after its connection to the implanted GBFC (see video in SI), Image of a digital thermometer (B) before and (C) after connection to the implanted GBFC.

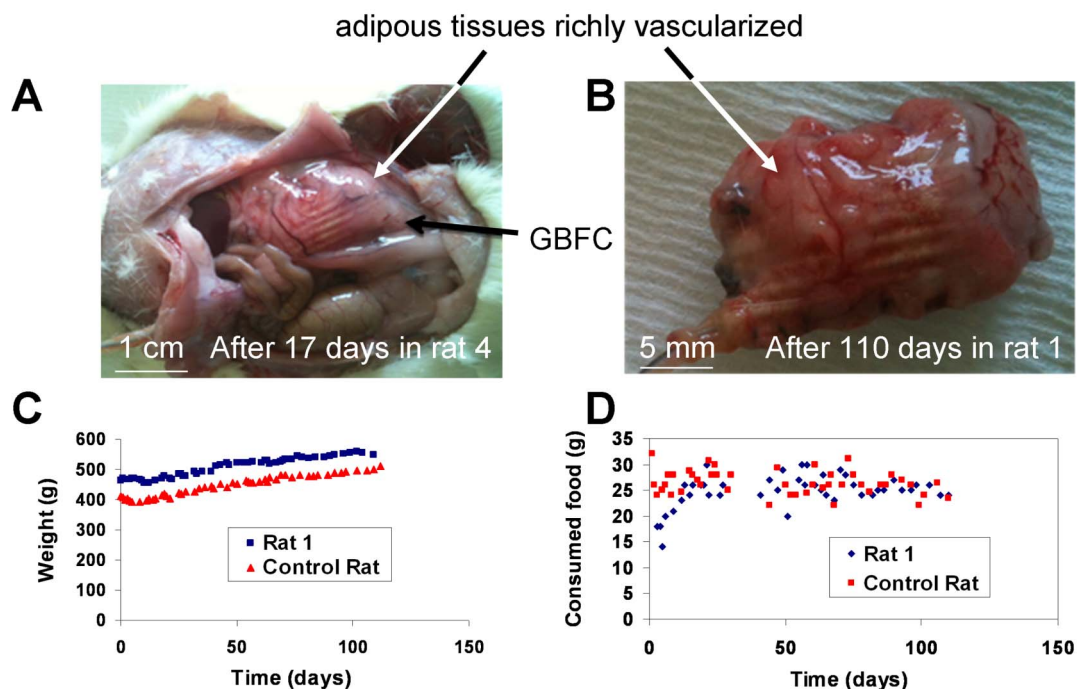


Figure 4 | Biocompatibility of the GBFC. Recovered GBFCs after (A) 17 days and (B) 110 days inside a rat. Both implants are surrounded by an adherent adipous tissue richly vascularized. Evolution of (C) the weight and (D) the food intake of the rat with a GBFC (rat 1) and of the control rat for 110 days.

experiments. All power consuming electrochemical tests of the implanted biofuel cells were tested 6–8 days after surgery and the maximum OCV was measured daily until the power loss of the GBFC. After autopsy of the rats and recovery of the implant, the observed power loss was in most cases due to the dislocation of the wires from the bioelectrodes and sometimes occurred because the rat dislodged the external connector used for the GBFC measurements. In order not to harm the rat, the electrical wires used to connect the cell to the external connector were very flexible and very thin. As a consequence, after about 9 days, we were faced with mechanical breakage of free wires or wire breakage and hence disconnection at the level of the bioelectrode. It is important to note that, unlike all previous experiences made by other research groups with insects, molluscs or lobsters, the animal is not immobilized or anesthetized but remains always freely moving. A clear statement about the lifetime of our biofuel cells is therefore not possible until those engineering issues are resolved.

The obtained power density of our implanted GBFC represents a promising solution to several issues for electronic medical devices. Compared to our previous results¹⁹, the volumetric power characteristics represent a 7-fold increase in performance ($161 \mu\text{W mL}^{-1}$ vs $24.4 \mu\text{W mL}^{-1}$) for a single implanted GBFC inside the body of a mammal, with an excellent biocompatibility ensured by the Dacron[®] bag. The GBFC that we report produces significant levels of energy at a single location and hence could be utilized as the power source for implanted sensor devices dedicated to medical monitoring. Further optimization of our GBFC could be expected to provide opportunities for other medical applications such as Multiple-lead Cardiac Resynchronisation Therapy (promising for some types of Heart Failures), or peripheral nerve stimulations (e.g. for pain control). In the case of peripheral nerve stimulation several small GBFCs could be used instead of the currently implanted bundle of wires from a single sealed battery.

Methods

Ethics statements. The care of the rats was approved by the European Communities Council Directive Animal Care and Use Committee. The experiments were

performed in accordance to their guiding principles (European Communities Council Directive L358-86/609/EEC). All protocols involving living animals were performed under license from the French Ministry of Agriculture (License number 38018 and 381141). The Committee on the Ethics of Animal Experiments of the Grenoble University (ComEth) approved the protocol under the number 103_LER-PRETA-JPA-01).

Chemicals. Commercial thin Multi-walled Carbon Nanotubes (9.5 nm diameter, purity > 95%) obtained from Nanocyl were used as received without any purification step. Glucose oxidase (GOx) from *Aspergillus niger* (100 U mg^{-1} solid), laccase from *Trametes versicolor* (20 U mg^{-1} solid) were purchased from Sigma-Aldrich and used without further purification. Cellulose membranes were purchased from Spectrumbags: Spectra/Por[®] Dialysis membrane, MWCO 6–8000 g mol^{-1} , flat width 32 mm, diameter 20.4 mm, vol/length 3.3 mL/cm.

Instrumentation. The electrochemical characterization and the biofuel cell tests were performed with an Autolab potentiostat 100 (Eco Chemie, Utrecht, The Netherlands).

Procedures to fabricate the bioelectrodes and the GBFC. The enzymes are mechanically confined into a CNT matrix by compression of a CNT/enzyme mixture as reported²⁰, affording direct electrical wiring between the redox active center and the electrode. Furthermore, the CNT matrix ensures high conductivity and high porosity, necessary for the diffusion of substrates. The bioelectrodes used for implantation are pellets with 6 mm thickness and 5 mm in diameter. Although only laccase is used at the cathode, GOx is combined with catalase at the anode. Catalase catalyzes the decomposition of hydrogen peroxide, produced by unwired GOx and hence prevents enzyme deactivation and serves for local oxygen depletion²¹. The whole GBFC was then formed by connecting the bioanode and biocathode.

Miniaturized insulated wires (UBA3219, industrifil) are connected to the CNT pellets via a conductive ink (Electrodag 4235S) (see manuscript: Fig. 1A bottom). Each pellet was then wrapped in a cellulose acetate membrane (see manuscript: Fig. 1A middle). These electrodes were then inserted into a perforated silicone sleeve (inner diameter: 5 mm) (see manuscript: Fig. 1A top) and enclosed by a silicone ring. Before use, the dialysis membrane, solutions and catheters were sterilized using an autoclave. The wires were then introduced into a biocompatible silicone tubing (721048, Harvard Apparatus; 1.9 mm outside diameter) that were then filled to a length of 3 cm with medical grade silicone. Silicone was also used to cover the non-biocatalytic parts of the silicone mould (see manuscript: Fig. 1.B). Thus, no wound or trauma can be imputed to the electrical circuitry and the wires were protected from short circuits.

The bagging of the implanted cell was carried out under a laminar flow hood under sterile conditions. The silicone sleeve containing the electrodes is inserted in a 16 mm flat width dialysis bag with a 100–500 Daltons MWCO (131054 Spectrumbags). The bag is then filled with approximately 1 mL sterile Ringer solution and closed while



avoiding air bubbles. The biocompatibility of the resulting device in the rat is due to an autoclaved Dacron® sleeve, wrapped around the dialysis bag, cut to the right volume, and then sutured with surgical filament (see manuscript: Fig. 1C).

Surgical implantation of the GBFC inside a rat. Male Wistar rats weighing 300–560 g were anesthetized with isoflurane under inhalational conditions. A median laparotomy was performed to insert the implant into the retroperitoneal space in left lateral position. The catheters containing the wires of the GBFC are subcutaneously tunneled from the abdomen up to the head of the rat (see manuscript: Fig. 1D and 1E). The wires were then soldered to a female micro-connector (BL3.36Z fischer elektronik) which was insulated and fixed to the skull by acrylic cement²². The GBFC was implanted in the retroperitoneal space (Fig. 1E) of the rat because the composition of the extracellular fluid in terms of glucose and oxygen is the same as in blood. The muscular abdominal wall and the skin were finally sutured separately and the animals allowed to recover from anaesthesia. After surgery, the animals received a single injection of an analgesic (Rimadyl, 5 mg kg⁻¹, i.m.).

After implantation, the rats were left to recover 24 hours. Each day, the rats were connected to a potentiostat to measure the open circuit voltage of the implanted GBFC.

The rats were not immediately sacrificed after the performance studies in order to evaluate the biocompatibility of the implants. As required, the rats were euthanized under anaesthesia (sodium pentobarbital 50 mg kg⁻¹, i.p.) by intra-cardiac injection of sodium pentobarbital (100 mg).

Power management of the glucose biofuel cell. Two different electronic devices have been designed to demonstrate the power management of the implanted biofuel cell. One is for powering a common medical digital thermometer (power consumption: 50 µA at 1.5 V) and another to light a LED (4.1 mA at 2.9 V). Both electronic designs are based on a low input voltage boost converter (BQ25504, Texas instruments, Dallas, Texas, USA). The global efficiency of this circuit is well-suited to these devices because it is optimized to operate within the GBFC's characteristics (input voltage: 0.3 V to 0.6 V, input current: 10 to 100 µA, output voltage: up to 3 V). For instance, the power efficiency of the voltage boost converter was around 75% for the LED demonstrator (average input voltage: 0.5 V for an average current of 70 µA and average output voltage of 2.9 V for an average current of 4.1 mA). The principle of the power management is the same for both demonstrators (thermometer and LED), whereby a capacitor is charged by the GBFC driving the boost voltage converter. When the capacitor voltage reaches a predetermined value, the stored power is released until the capacitor voltage decreases down to a determined value. The cycle is repeated as long as the device is charged by the biofuel cell. In the case of the demonstrator to power-on the thermometer, a capacitor value of 220 µF was chosen in order to keep the temperature displayed on an LCD screen for 10 s after a capacitor charge cycle of one minute. Regarding the LED demonstrator, the diode flashed for about 88 ms after 28 s, 52 s, 81 s, 115 s, and 169 s.

- Holmes, C. F. Electrochemical Power Sources and the Treatment of Human Illness. *J. Electrochem. Soc. Interface* **12** (3 (Fall)), 26 (2003).
- Roundy, S. On the Effectiveness of Vibration-based Energy Harvesting. *J. Intell. Mater. Syst. Struct.* **16** (10), 809 (2005).
- Kerzenmacher, S., Ducreé, J., Zengerle, R. & von Stetten, F. Energy harvesting by implantable abiotically catalyzed glucose fuel cells. *J. Power Sources* **182** (1), 1 (2008).
- Görge, G., Kirstein, M. & Erbel, R. Microgenerators for Energy Autarkic Pacemakers and Defibrillators: Fact or Fiction? *Herz* **26** (1), 64 (2001).
- Mano, N., Mao, F. & Heller, A. A Miniature Biofuel Cell Operating in A Physiological Buffer. *J. Am. Chem. Soc.* **124** (44), 12962 (2002).
- Mano, N., Mao, F. & Heller, A. Characteristics of a Miniature Compartment-less Glucose/O₂ Biofuel Cell and Its Operation in a Living Plant. *J. Am. Chem. Soc.* **125** (21), 6588 (2003).
- Chen, T. *et al.* A Miniature Biofuel Cell. *J. Am. Chem. Soc.* **123** (35), 8630 (2001).
- Rapoport, B. I., Kedzierski, J. T. & Sarpeshkar, R. A Glucose Fuel Cell for Implantable Brain-Machine Interfaces. *PLoS ONE* **7** (6), e38436 (2012).

- Holzinger, M., Le Goff, A. & Cosnier, S. Carbon nanotube/enzyme biofuel cells. *Electrochim. Acta* **82**, 179 (2012).
- Minteer, S. D., Liaw, B. Y. & Cooney, M. J. Enzyme-based biofuel cells. *Curr. Opin. Biotechnol.* **18** (3), 228 (2007).
- Atanassov, P. *et al.* Enzymatic Biofuel Cells. *The Electrochemical Society Interface* **16** (2), 28 (2007).
- Sarma, A. K., Vatsyayan, P., Goswami, P. & Minteer, S. D. Recent advances in material science for developing enzyme electrodes. *Biosens. Bioelectron.* **24** (8), 2313 (2009).
- Barton, S. C., Gallaway, J. & Atanassov, P. Enzymatic Biofuel Cells for Implantable and Microscale Devices. *Chem. Rev.* **104** (10), 4867 (2004).
- Barton, S. C. in *Handbook of Fuel Cells: Advances in Electrocatalysis, Materials, Diagnostics and Durability, Volumes 5 & 6*, edited by W. Vielstich, H. A. Gasteiger & H. Yokokawa (John Wiley & Sons, Weinheim, 2009), Vol. 5.
- Halámková, L. *et al.* Implanted Biofuel Cell Operating in a Living Snail. *J. Am. Chem. Soc.* **134** (11), 5040 (2012).
- MacVittie, K. *et al.* From "Cyborg" Lobsters to a Pacemaker Powered by Implantable Biofuel Cells. *Energy Environ. Sci.* **6** (1), 81 (2013).
- Rasmussen, M. *et al.* An Implantable Biofuel Cell for a Live Insect. *J. Am. Chem. Soc.* **134** (3), 1458 (2012).
- Szczupak, A. *et al.* Living battery - biofuel cells operating in vivo in clams. *Energy Environ. Sci.* **5** (10), 8891 (2012).
- Cinquin, P. *et al.* A Glucose BioFuel Cell Implanted in Rats. *PLoS ONE* **5** (5), e10476 (2010).
- Zebda, A. *et al.* Mediatorless high-power glucose biofuel cells based on compressed carbon nanotube-enzyme electrodes. *Nature Communications* **2**, 370 (2011).
- Plumeré, N., Henig, J. & Campbell, W. H. Enzyme-Catalyzed O₂ Removal System for Electrochemical Analysis under Ambient Air: Application in an Amperometric Nitrate Biosensor. *Anal. Chem.* **84** (5), 2141 (2012).
- Deransart, C. *et al.* Single-unit Analysis of Substantia Nigra Pars Reticulata Neurons in Freely Behaving Rats with Genetic Absence Epilepsy. *Epilepsia* **44** (12), 1513 (2003).

Acknowledgments

The authors would like to thank the Laboratory of Bioclinical Radiopharmaceutics (LRB) for providing rats. The authors also thank the Interdisciplinary Energy program of CNRS PR10-1-1, the ANR Emergence-2010 EMMA-043-02, and the ANR Investissements d'avenir - Nanobiotechnologies 10-IANN-0-02 programmes for financial support. This work was supported by French state funds managed by the ANR within the Investissements d'Avenir programme (Labex CAMI) under reference ANR-11-LABX-0004. Arielle Le Pellec is greatly acknowledged for technical assistance.

Author contributions

S.C. and P.C. initiated the project, designed and supervised the experiments, they analysed the data and wrote the manuscript with A.Z., C.G. and M.H. A.L.G. and A.Z. prepared and characterized GBFC before implantation, F.G., K.G., C.G., A.Z. and J.-P.A. characterized the implanted GBFC and carried out in vivo experiments, J.-P.A. and F.B. surgically operated for GBFC implantation in rats and performed the biocompatibility experiments and H.L. designed the electronic converter associated to the GBFC.

Additional information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/scientificreports>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

License: This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>

How to cite this article: Zebda, A. *et al.* Single Glucose Biofuel Cells Implanted in Rats Power Electronic Devices. *Sci. Rep.* **3**, 1516; DOI:10.1038/srep01516 (2013).

2.6.2 Conclusion du chapitre 2

Voici un schéma récapitulatif des points de blocage résolus lors de l'implantation de cette 2^{ème} génération de biopile. Mes contributions sont en couleur rouge.

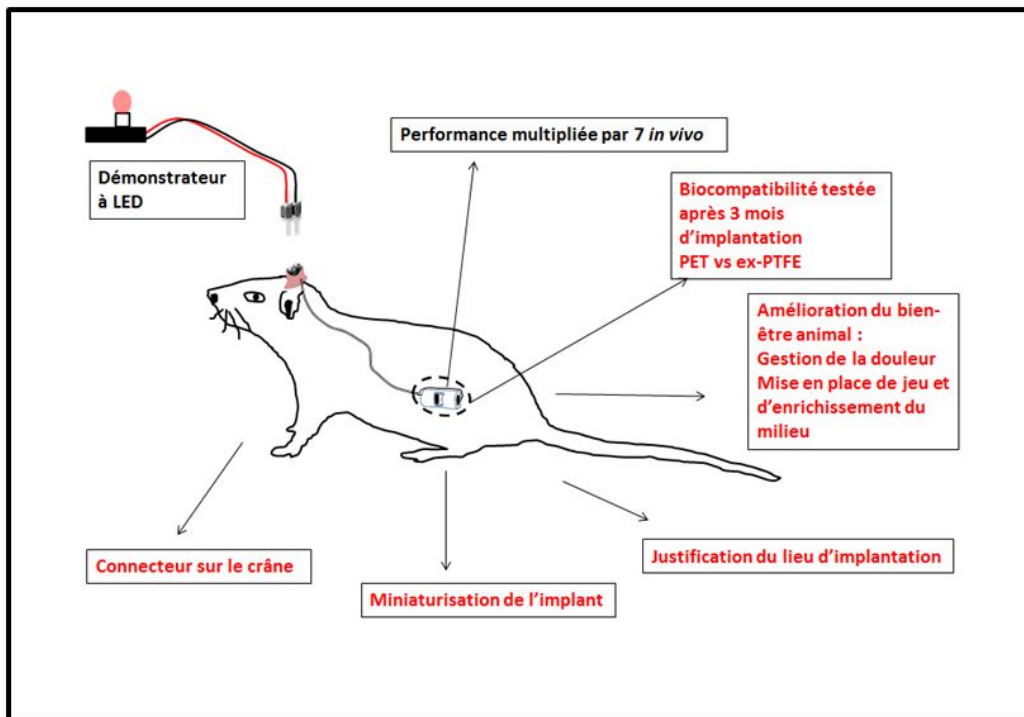


Figure 2.18 : Optimisations réalisées pour l'implantation d'une 2^{ème} génération de biopile.

Cette première série d'optimisations a amené de nouvelles questions pour améliorer le design de la biopile.

- Au niveau de la tenue mécanique des électrodes : la préparation des bioélectrodes par compression directe d'enzymes et de nanotube de carbones favorise le transfert électronique direct mais une hydratation trop importante de l'électrode la fait gonfler. Cette déformation peut mener à la perte de contact électrique entre les nanotubes de carbone ou à une perte de matériel au sein de l'électrode.

-Au niveau du fonctionnement des enzymes à plus long terme, notamment pour la laccase : peut-on créer un micro-environnement favorable au bon fonctionnement des enzymes et à leur connexion aux électrodes ? *In vivo*, on ne peut pas choisir les conditions de pH, de température et de salinité qui ne sont pas toujours adaptées au bon fonctionnement des enzymes de la biopile.

- Un des intérêts du modèle rat est sa relative résistance immunitaire. Certaines parties du dispositif implantable n'ont pas été stérilisées et la majorité des manipulations ont été réalisées sous hotte à flux laminaire. Il est nécessaire de stériliser le dispositif médical avant son implantation.

- Lors des autopsies, nous avons pu mettre en évidence la présence d'une inflammation à l'intérieur du sac de dialyse sans pouvoir en déterminer la cause de façon précise. Trois hypothèses ont pu être émises : l'inefficacité du lien autour du sac de dialyse, le manque de biocompatibilité de l'acétate de cellulose et surtout la non-stérilité de l'implant. Ces trois hypothèses peuvent se combiner pour provoquer une réaction inflammatoire non désirée.

Toutes ces questions nous ont amenés à concevoir une 3^{ème} génération de biopiles, présentée au chapitre suivant.

2.9 Références du chapitre 2

- [1] P. Cinquin, C. Gondran, F. Giroud, S. Mazabrard, A. Pellissier, F. Boucher, J.-P. Alcaraz, K. Gorgy, F. Lenouvel, S. Mathé, et others, « A glucose biofuel cell implanted in rats », *PLoS One*, vol. 5, n° 5, p. e10476, 2010.
- [2] P. Widsten & A. Kandelbauer, « Laccase applications in the forest products industry: a review », *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 42, n° 4, p. 293–307, 2008.
- [3] N. Durán, M. A. Rosa, A. D'Annibale, & L. Gianfreda, « Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidasés) immobilized on different supports: a review », *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 31, n° 7, p. 907–931, 2002.
- [4] A. Habrioux, K. Servat, S. Tingry, & B. Kokoh, « Performances of Enzymatic Glucose/O₂ Biofuel Cells », in *Biofuel's Engineering Process Technology*, M.A. Dos Santos Bernardes, Éd. InTech, ISBN : 978-953-307-480-1, 2011.
- [5] A. E. Palmer, S. K. Lee, & E. I. Solomon, « Decay of the peroxide intermediate in laccase: reductive cleavage of the OO bond », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 123, n° 27, p. 6591–6599, 2001.
- [6] A. Le Goff, M. Holzinger, & S. Cosnier, « Recent progress in oxygen-reducing laccase biocathodes for enzymatic biofuel cells », *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 72, n° 5, p. 941–952, 2015.
- [7] A. A. Babadi, S. Bagheri, & S. B. A. Hamid, « Progress on implantable biofuel cell: Nano-carbon functionalization for enzyme immobilization enhancement », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 79, p. 850–860, 2016.
- [8] A. Zebda, C. Gondran, A. Le Goff, M. Holzinger, P. Cinquin, & S. Cosnier, « Mediatorless high-power glucose biofuel cells based on compressed carbon nanotube-enzyme electrodes », *Nat. Commun.*, vol. 2, p. 370, 2011.
- [9] D. Kracher, K. Zahma, C. Schulz, C. Sygmund, L. Gorton, & R. Ludwig, « Inter-domain electron transfer in cellobiose dehydrogenase: modulation by pH and divalent cations », *FEBS J.*, vol. 282, n° 16, p. 3136–3148, 2015.
- [10] C. Schulz, R. Kittl, R. Ludwig, & L. Gorton, « Direct electron transfer from the FAD cofactor of cellobiose dehydrogenase to electrodes », *ACS Catal.*, 2015.
- [11] G. Velho, P. Froguel, & G. Reach, « Determination of peritoneal glucose kinetics in rats: implications for the peritoneal implantation of closed-loop insulin delivery systems », *Diabetologia*, vol. 32, n° 6, p. 331–336, 1989.
- [12] S. K. Wolfson, J. F. Tokarsky, S. J. Yao, & M. A. Krupper, « Glucose concentration at possible sensor tissue implant sites », *Diabetes Care*, vol. 5, n° 3, p. 162–165, 1982.
- [13] *Vidal 2016: le dictionnaire*. Issy-les-Moulineaux: Vidal, 2016.
- [14] M. Schaldach & U. Kirsch, « In vivo electrochemical power generation. », *ASAIO J.*, vol. 16, n° 1, p. 184–192, 1970.
- [15] M. Belouze, « Régulation originale de la balance énergétique du rat Lou/C: un modèle d'hyperactivité et de résistance à l'obésité », Université Claude Bernard-Lyon I, 2009.
- [16] D. H. Henry, N. V. Dahl, M. Auerbach, S. Tchekmedyian, & L. R. Laufman, « Intravenous Ferric Gluconate Significantly Improves Response to Epoetin Alfa Versus Oral Iron or No Iron in Anemic Patients with Cancer Receiving Chemotherapy », *The Oncologist*, vol. 12, n° 2, p. 231–242, janv. 2007.
- [17] M. M. Reddy et P. M. Quinton, « Control of dynamic CFTR selectivity by glutamate and ATP in epithelial cells », *Nature*, vol. 423, n° 6941, p. 756–760, 2003.
- [18] W. Ma, V. Compan, W. Zheng, E. Martin, R. A. North, A. Verkhratsky, & A. Surprenant, « Pannexin 1 forms an anion-selective channel », *Pflüg. Arch.-Eur. J. Physiol.*, vol. 463, n° 4, p. 585–592, 2012.
- [19] D. Voet & J. G. Voet, *Biochimie*. Bruxelles: De Boeck, ISBN : 978-280-414-795-2, 2005.
- [20] J. D. Rawn, C. François, & R. Crichton, *Traité de biochimie*. Paris: Editions universitaires, ISBN : 978-280-411-578-4 1990.
- [21] T. Lakhansky, « Gluconic acid and its derivatives », SIDS Initial Assessment Report For SIAM 18, *OECD Publishing*, 2004.
- [22] D. Salmony & J. K. Whitehead, « Studies on the oxidation of gluconate by animal tissues », *Biochem. J.*, vol. 58, n° 3, p. 408, 1954.
- [23] X. Ren, Y. Feng, J. Guo, H. Wang, Q. Li, J. Yang, X. Hao, J. Lv, N. Ma, & W. Li, « Surface modification and endothelialization of biomaterials as potential scaffolds for vascular tissue engineering applications », *Chem Soc Rev*, vol. 44, n° 15, p. 5680–5742, 2015.
- [24] P. Zilla, D. Bezuidenhout, & P. Human, « Prosthetic vascular grafts: wrong models, wrong questions and no healing », *Biomaterials*, vol. 28, n° 34, p. 5009–5027, 2007.
- [25] J. Chlupac, E. Filova, & L. Bacakova, « Blood vessel replacement: 50 years of development and tissue engineering paradigms in vascular surgery », *Physiol. Res.*, vol. 58, p. S119, 2009.
- [26] C. Singh, C. Wong, et X. Wang, « Medical Textiles as Vascular Implants and Their Success to Mimic Natural Arteries », *J. Funct. Biomater.*, vol. 6, n° 3, p. 500–525, 2015.
- [27] R. Y. Kannan, H. J. Salacinski, P. E. Butler, G. Hamilton, & A. M. Seifalian, « Current status of prosthetic bypass grafts: A review », *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, vol. 74B, n° 1, p. 570–581, 2005.
- [28] X. Ren, Y. Feng, J. Guo, H. Wang, Q. Li, J. Yang, X. Hao, J. Lv, N. Ma, et W. Li, « Surface modification and endothelialization of biomaterials as potential scaffolds for vascular tissue engineering applications », *Chem Soc Rev*, vol. 44, n° 15, p. 5680–5742, 2015.

- [29] M.H. Glickman, G.K. Stokes, J.R. Ross, E.D. Schuman, W.C. Sternbergh, J.S. Lindberg, *et al.*, « Multicenter evaluation of a polyurethaneurea vascular access graft as compared with the expanded polytetrafluoroethylene vascular access graft in hemodialysis applications. », *J Vasc Surg*, vol.34, n°3, p 465-473, 2001.
- [30] N. Chakfé, F. Dieval, F. Thaveau, S. Rinckenbach, O. Hassani, G. Camelot, B. Durand, J.-G. Kretz, G. européen de recherche sur les prothèses appliquées à la chirurgie vasculaire, et others, « Substituts vasculaires », in *Annales de chirurgie*, vol. 129, p. 301–309, 2004.
- [31] M. R. Kapadia, D. A. Popowich, & M. R. Kibbe, « Modified prosthetic vascular conduits », *Circulation*, vol. 117, n° 14, p. 1873–1882, 2008.
- [32] K. L. Gandhi, Éd., *Woven textiles: principles, developments and applications*. Oxford ; Philadelphia: Textile Institute : Woodhead Publishing Limited, ISBN : 978-184-569-930-7 2012.
- [33] C. Singh, C. S. Wong, & X. Wang, « Medical Textiles as Vascular Implants and Their Success to Mimic Natural Arteries », *J. Funct. Biomater.*, vol. 6, n° 3, p. 500–525, 2015.
- [34] M. Dhahri, A. Abed, R. H. Lajimi, M. B. Mansour, V. Gueguen, S. B. Abdesselem, F. Chaubet, D. Letourneur, A. Meddahi-Pellé, & R. M. Maaroufi, « Grafting of dermatan sulfate on polyethylene terephthalate to enhance biointegration », *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 98, n° 1, p. 114–121, 2011.
- [35] L'Hostis G, Durand B, Chafke N., « Le comportement mécanique du ePTFE. Oral communication. Colloque MECAMA, Aussois, France, January 25-30, 2004.
- [36] P. Sabin, D. Labbe, D. Levillain, L. Cazin, et J. Caston, « La connexion électrique percutanée permanente. Principes généraux », *Rev. Laryngol. Otol. Rhinol.*, vol. 118, n° 5, p. 335-342, 1997.
- [37] P. Sabin, B. Frachet, E. Kaluzinski, D. Labbe, B. Bonin, & D. Goga, « [A new application of extraoral implants: the permanent percutaneous electrical connection. Apropos a case]. », *Rev. Stomatol. Chir. Maxillofac.*, vol. 100, n° 3, p. 123-31, 1999.
- [38] S. G. Sotocinal, R. E. Sorge, A. Zaloum, A. H. Tuttle, L. J. Martin, J. S. Wieskopf, J. C. Mapplebeck, P. Wei, S. Zhan, S. Zhang, et others, « The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions », *Mol. Pain*, vol. 7, n° 1, p. 1, 2011.
- [39] A. Zebda, S. Cosnier, J.-P. Alcaraz, M. Holzinger, A. Le Goff, C. Gondran, F. Boucher, F. Giroud, K. Gorgy, H. Lamraoui, & P. Cinquin, « Single glucose biofuel cells implanted in rats power electronic devices », *Sci. Rep.*, vol. 3, 2013.

Chapitre 3 : Etudes *in vitro* et *in vivo* de la biocompatibilité de nouveaux matériaux de biopiles

Ce 3^{ème} chapitre est consacré à la recherche de solutions innovantes pour remplacer le sac de dialyse précédemment utilisé comme membrane filtrante, notamment l'emploi d'une capsule biocompatible et la fabrication d'un nouveau type de membrane. Des études de diffusion et de biocompatibilité ont été menées *in vitro* et *in vivo*. Pour compléter ces études de biocompatibilité, nous avons abordé la problématique posée par la stérilité de l'implant.

3.1 Alternatives au boudin de dialyse

3.1.1 Capsule polyamide

3.1.1.1 Fabrication et montage

Le design d'enrobage des électrodes dans un sac de dialyse noué avec une épissure de nylon présentait un désavantage majeur : l'étanchéité du nœud n'était pas garantie, comme l'atteste la présence de pus dans le sac retrouvé à plusieurs reprises lors des autopsies. Des échanges entre l'intérieur du sac et l'extérieur peuvent avoir lieu et générer d'une part une réaction inflammatoire importante (cellules de l'immunité, anticorps) et d'autre part la possibilité de fuite des enzymes et des nanotubes de carbones dans l'organisme, ce qui non seulement détériore la pile, mais surtout peut engendrer des problèmes de toxicité et d'inflammation.

Nous avons essayé sans succès de coller le sac d'acétate de cellulose sur lui-même avec différentes colles (polyacétate de vinyle à chaud, cyanoacrylate, ...) en nous heurtant à des difficultés techniques : délitement de la colle en solution, bouchage des pores de la membrane, rigidité importante du matériau après collage. Le collage est toutefois possible sur la membrane sèche, mais se pose alors le problème de son hydratation. En effet, pour que la biopile s'hydrate et soit en contact direct avec une grande quantité d'eau, la membrane doit pouvoir échanger l'eau à l'extérieur alors qu'il y a de l'air piégé à l'intérieur, ce qui est un processus trop lent pour envisager cette possibilité.

Une solution envisagée a été de fabriquer une capsule en résine polyamide biocompatible [1] PA2200 en impression 3D, qui a permis de coller ou sertir une membrane d'acétate de cellulose de façon pérenne. Les tolérances obtenues par cette technique d'impression 3D ne permettent pas d'envisager un sertissage réversible sans collage de la membrane de dialyse. Le collage a été réalisé grâce à un apprêt déposé côté capsule permettant de boucher les pores et d'améliorer la mouillabilité, ce qui évite à la colle cyanoacrylate de se répandre à la surface de l'acétate de cellulose et de la boucher [2]. Ce système n'est pas envisageable dès qu'on utilise de l'acétate de cellulose d'une porosité inférieure à 2KDa, car le séchage avant collage de la membrane commerciale modifie ses propriétés de diffusion. Voici une photo du dispositif avant et après montage :

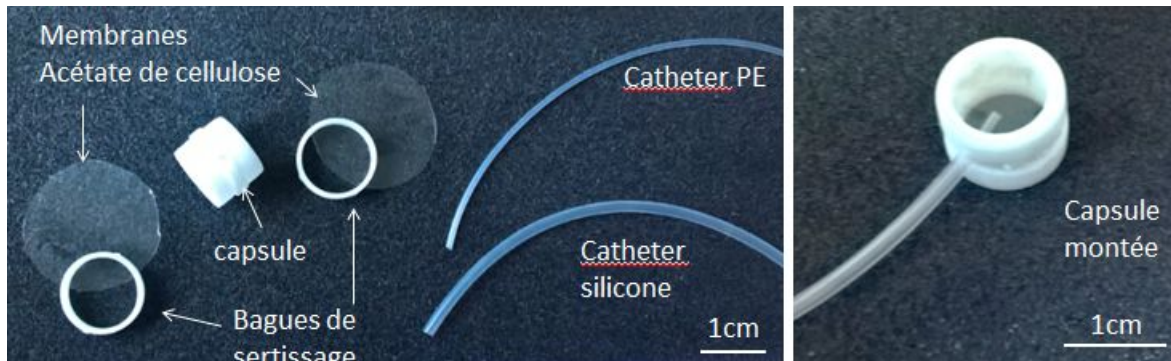


Figure 3.1 : capsule polyamide avec membranes d'acétate de cellulose

Les étapes de montage de cette capsule sont détaillées ci-dessous :

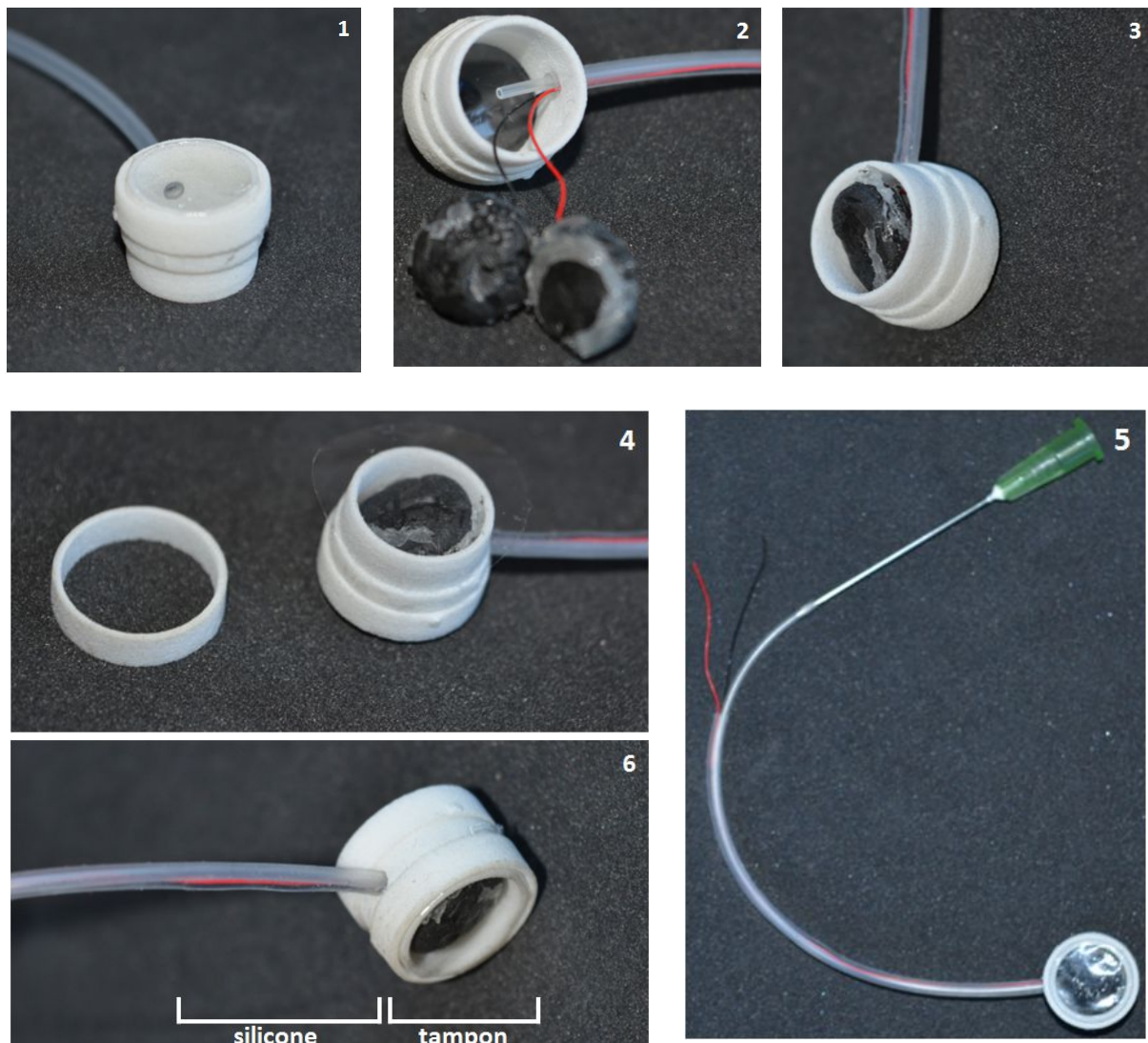


Figure 3.2 : étapes de montage de la capsule polyamide contenant la biopile. 1) Collage du cathéter silicone et de la membrane de dialyse face 1. 2) Introduction des fils des bioélectrodes et d'un cathéter en polyéthylène (PE) dans le cathéter silicone. 3) Mise en place des bioélectrodes dans la capsule. 4) mise en place de la bague de sertissage face 2 et collage. 5) Remplissage de la capsule par le cathéter en PE. 6) Remplissage silicone pour boucher la capsule et retrait du cathéter PE.

Le remplissage de la capsule sous environnement stérile est réalisé après stérilisation du dispositif contenant les bioélectrodes. Cette mise en eau par l'intermédiaire du cathéter en

silastic[®] contenant les fils électriques permet l'hydratation de la membrane d'acétate de cellulose et des bioélectrodes.

3.1.1.2 Qualité du collage et étude de diffusion de molécules in vitro

La qualité du collage a tout d'abord été testée in vitro par diffusion de molécules fluorescentes.

Une étude de diffusion de molécules fluorescentes a permis de montrer l'efficacité du dispositif in vitro : du FITC-dextran (70KDa) ou de la fluorescéine libre à une même concentration de $10\mu\text{M}$ ont été placés dans la capsule, fermée de chaque côté par une membrane d'acétate de cellulose ayant un seuil de coupure de 6-8 kDa. Cette capsule a été mise à incuber dans 10 mL de tampon PBS et des aliquotes de cette solution ont été prélevées pendant une durée supérieure à 1 mois.

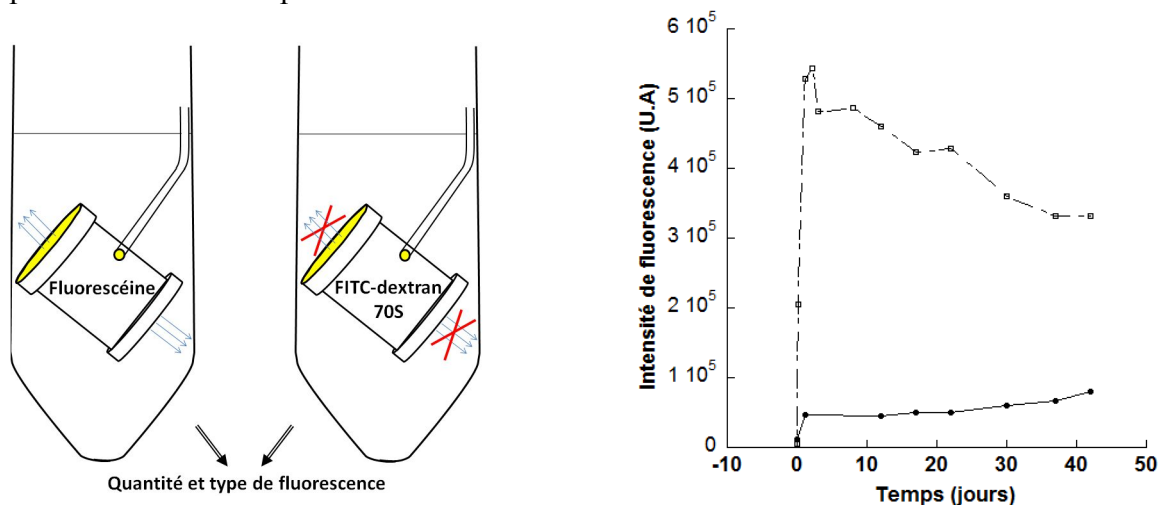


Figure 3.3 : Utilisation de la capsule dans une expérience de diffusion de molécules fluorescentes. On suit l'apparition dans le dialysat au cours du temps de la fluorescéine libre (carrés vides, ligne pointillée) et du FITC-dextran 70S (ronds pleins, ligne continue) emprisonnés dans la capsule.

La diffusion de fluorescéine libre est visible de façon quasi instantanée : le collage ne bouche pas les pores. La fluorescence décroît ensuite car le tube est transparent et n'a pas été protégé de la lumière. On observe un phénomène de photoblanchiment.

La fluorescence de l'échantillon 70S augmente elle aussi dès le premier jour. On pourrait penser à une fuite du dispositif à cause de cette augmentation de fluorescence. Cependant, s'il y avait fuite, la fluorescence continuerait d'augmenter, ce qui n'est pas le cas car la courbe est relativement stable dans le temps, même si elle augmente très légèrement à partir de 25 jours.

De plus, une mesure par spectroscopie à corrélation de fluorescence (FCS) nous a permis de montrer que l'espèce qui diffusait dans ce cas ne correspondait pas à du FITC-Dextran 70S. Il est en effet possible de discriminer la fluorescéine et le FITC-dextran 70S par leur temps caractéristique de diffusion lors de leur passage dans un volume confocal de détection. Ce temps de diffusion est en effet proportionnel à la taille de la molécule considérée. La modélisation est réalisée à partir de la fonction d'auto-corrélation. Voici les mesures obtenues avec ces différentes molécules avec une puissance laser de 1% permettant d'augmenter le rapport signal/bruit tout en limitant le photoblanchiment:

Echantillon	Count Rate [kHz]	Counts per Molecule [kHz]	Diffusion Time 1 [μ s]	Diffusion Time 2 [μ s]	Particles 1 [%]	Particles 2 [%]	Number Particles	Correlation	Structure Parameter	Triplet Fraction [%]	Triplet Time [μ s]
Fluoresceine	221,289	13,555	23		100		16,508	1,061	3,8	34	1,15
FITC-dextran70S	38,755	14,676	128		100		3,348	1,299	3,8	52	1,46
Mix 70/30	87,162	19,047	29	128	70,6	29,4	5,189	1,193	3,8	59	0,94

Figure 3.4 : Discrimination de 2 molécules fluorescentes de taille différente par spectroscopie de corrélation de fluorescence (fluorescéine seule, FITC-dextran 70S seul, et un mélange 70/30 des 2 molécules).

La fluoresceine a un temps caractéristique de diffusion de 23 μ s alors que celui du FITC-dextran70S est de 128 μ s. Un mélange des 2 fluorophores montre qu'on discrimine bien les 2 molécules et que leur dosage est possible par cette technique.

Nous avons ensuite analysé le dialysat de FITC-dextran70S présenté figure 3.3 : un seul type de molécule est présent dans la solution et son temps caractéristique de diffusion est compris entre 23 et 25, donc très éloigné de 128 μ s attendus. Il correspond à la taille d'une molécule de taille proche de la fluoresceine, très certainement celui du FITC libre. Le dispositif ne fuit donc pas et la fluorescence observée est liée à une dégradation du FITC-dextran70S ou au fait que cette molécule commerciale est mal purifiée.

3.1.1.3 Qualité du collage et étude de biocompatibilité in vivo

Afin de tester in vivo l'étanchéité de la capsule et sa biocompatibilité, nous avons réalisé l'implantation d'une capsule vide en remplaçant les membranes d'acétate de cellulose avec des membranes de parylène. Le parylène est utilisé en dépôt sur tout type de surface pour les rendre étanches et protège les dispositifs implantables des fluides et gaz. Il est très stable chimiquement et propice au développement cellulaire. Comme cette membrane est imperméable, elle va pouvoir nous permettre de tester l'étanchéité du système, vis-à-vis des cellules comme des liquides de l'organisme. L'implant, constitué d'une capsule en polyamide montée avec 2 membranes de parylène sans enrobage de Dacron[®], a été introduit en intra abdominal chez le rat après stérilisation par ionisation. L'autopsie a été réalisée au jour 6 après implantation. L'analyse macroscopique de l'implant montre que l'intérieur de la capsule est resté sec. Aucune croissance tissulaire n'a pu être mise en évidence dans le dispositif.

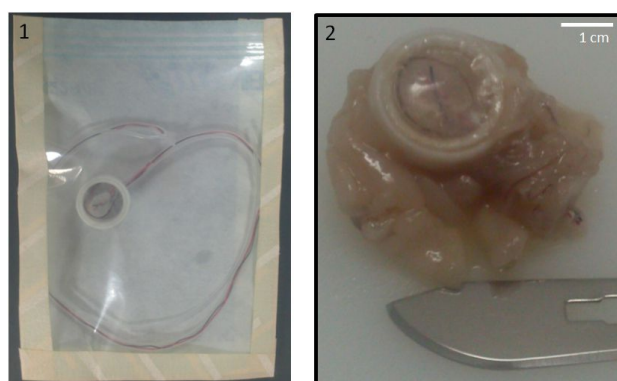


Figure 3.5 : test in vivo de la capsule polyamide implantable.
1) Dispositif entier après stérilisation aux rayons γ . 2) Implant fixé au formol après 6 jours d'implantation

En revanche, la surface de la résine est recouverte d'une gaine de tissu fibro-adipeux peu adhérent. Au niveau microscopique, l'analyse anatomo-pathologique des tissus montre un tissu conjonctif inflammatoire avec la présence de polynucléaires neutrophiles et de lymphocytes. On distingue nettement 3 zones concentriques autour du tube silicone proche de la jonction avec la capsule : la première zone comprend des hématies, de la fibrine et des cellules inflammatoires. La 2^{ème} couche est constituée d'un amas de cellules fibroblastiques plus ou moins organisées avec quelques polynucléaires neutrophiles. Enfin, en périphérie, le

tissu conjonctif est organisé, dense avec une organisation vasculaire de veinules et d'artérioles.

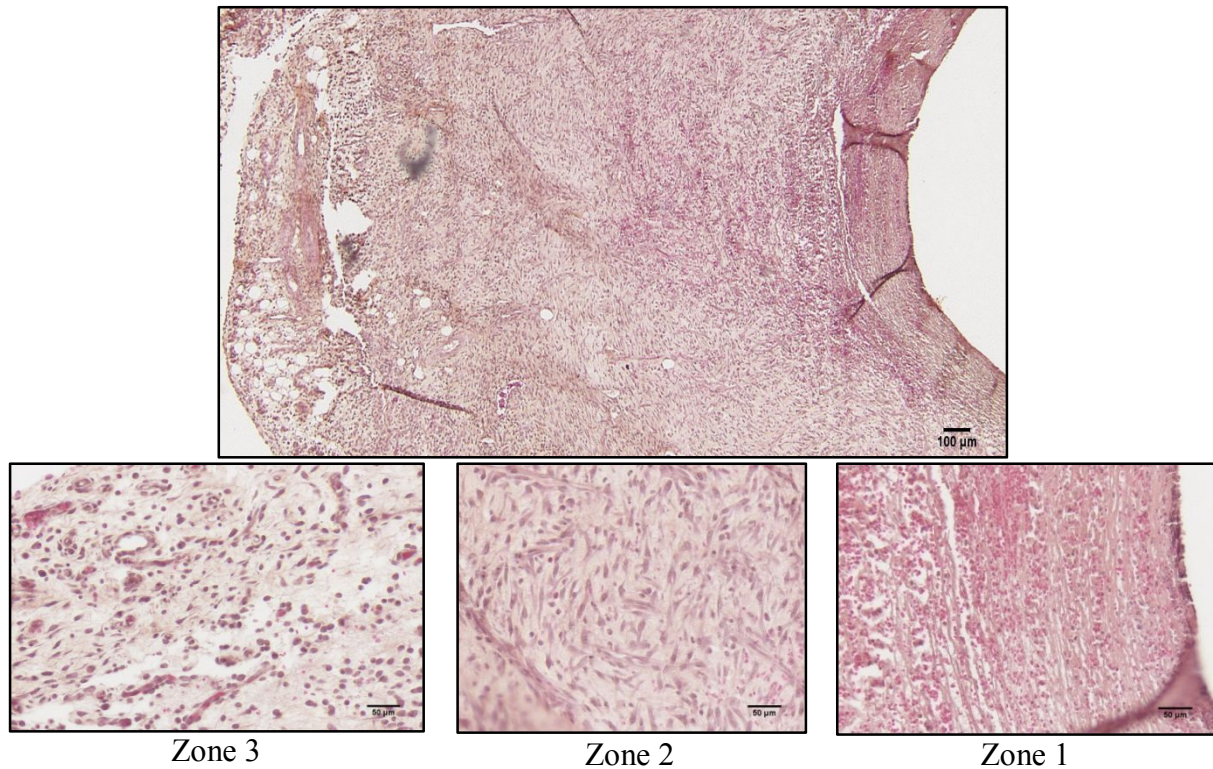


Figure 3.6 : Analyse anatomopathologique de la zone de jonction cathéter silicone-capsule polyamide après 6 jours d'implantation de la capsule polyamide.

La membrane de parylène est quant à elle recouverte d'une fine couche de cellules non adhérentes. Le tissu est peu inflammatoire.

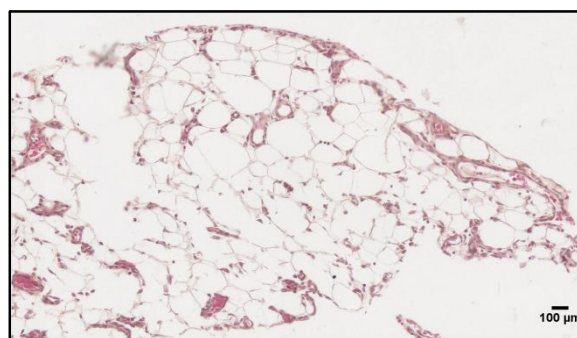


Figure 3.7 : tissus recouvrant le parylène

Ce type de capsule, dont la perméabilité a été testée in vitro et la biocompatibilité in vivo, est bien adapté pour permettre à la biopile de fonctionner dans un environnement aqueux. Elle se révèle par contre peu adaptée à des implantations de longue durée, car l'implant n'est pas richement vascularisé, contrairement à la prothèse en Dacron utilisée précédemment. Après seulement 6 jours d'implantation, l'implant est recouvert de tissus peu vascularisés : le dispositif évoluera rapidement vers une encapsulation fibreuse.

3.1.2 Membrane de silicium poreux

3.1.2.1 Introduction

Nous avons cherché une autre alternative aux membranes polymériques naturelles en utilisant des membranes de silicium nanoporeux.

Le silicium poreux [3] est un support de choix pour le développement de biocapteurs et de moules nanostructurés pour différents polymères (PDMS, polylactide, polystyrène, polycaprolactone, ...). Les premières recherches sur ce sujet datent de 1996 et 40 articles sont en moyenne publiés chaque année sur ce sujet depuis 8 ans. C'est l'administration de médicament (libération passive ou contrôlée) qui a surtout bénéficié de l'utilisation du silicium poreux et le nombre de publications sur le sujet croît de façon exponentielle depuis 15 ans.

La principale caractéristique du silicium poreux est sa biodégradabilité et sa biocompatibilité. En effet, la forme soluble du silicium, l'acide orthosilicique Si(OH)_4 , intervient de manière favorable dans le métabolisme des os et des tissus de soutien [4]. C'est un avantage certain pour l'administration de drogues faiblement absorbées ou de très faible solubilité : les nanoparticules de silicium, qui présentent une très large surface spécifique ($800\text{m}^2/\text{g}$) alliée à une forte porosité (50-80%), sont alors utilisées comme réservoir pour stocker des molécules d'intérêt thérapeutique (anticancéreux, analgésiques, anti-inflammatoires, peptides, ...) et la dissolution progressive du silicium poreux en acide orthosilicique [5] dans le corps permet le relargage de la drogue. La silice est éliminée par les reins. Certaines applications sont déjà en tests pré-cliniques comme de la radiothérapie ciblée [6] ou l'administration de drogues dans le corps vitré pour soigner certaines maladies rétinienues [7].

Mais revenons à l'utilisation du silicium poreux comme support en tant que membrane filtrante. Ce type de membrane présente des avantages majeurs :

- La forte porosité du matériau apporte une grande surface d'échange.
- La taille des nanopores permet le passage des molécules de petite taille comme les substrats de notre biopile mais empêche celui des protéines et *a fortiori* des cellules.
- Les modifications de surface par dopage ou dépôt métallique permettent de la rendre conductrice.
- Les membranes sont facilement empilables, car supportées par du silicium non poreux, ce qui permet là encore d'augmenter la surface d'échange et la diffusion des substrats.

En revanche, l'un des verrous réside dans sa biodégradabilité. En effet, comme nous l'avons vu plus haut, c'est l'un des avantages de son utilisation dans les systèmes d'administration de médicaments.

Nous avons conçu des membranes dont la fabrication a été confiée à la société ST microelectronics. Dans le cadre du projet IBFC, le partenaire CEA-LETI a mis à point le greffage chimique de polyéthylène glycol -silane (PEG-silane) qui a permis de stabiliser les membranes pour envisager leur utilisation dans un milieu complexe comme le liquide extracellulaire. La silanisation évite au silicium poreux de se dégrader et la présence de PEG rend la surface hydrophile tout en réduisant l'encrassement de la membrane par les protéines. L'équipe du CEA a réalisé la caractérisation des membranes par microscopie électronique à balayage, par mesure d'angle de contact pour les aspects physiques et par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) pour la composition chimique après traitement. Nous avons de notre côté étudié les phénomènes de diffusion ionique par spectroscopie d'impédance à 4 électrodes, afin d'avoir accès aux propriétés diélectriques du matériau. La diffusion de molécules de différentes tailles (glucose, fluorescéine, protéines) à travers cette membrane nous a permis de calculer des coefficients de diffusion comparables à ceux de

l'acétate de cellulose. Ces travaux sont présentés plus en détail dans l'article en préparation exposé dans le paragraphe 3.1.2.2.

L'originalité de nos travaux réside dans la caractérisation des membranes dans un milieu proche des conditions physiologiques et sur des temps relativement longs, ce qui est peu souvent le cas dans la plupart des publications sur le sujet. L'étude du comportement des membranes de silicium poreux a montré que la silanisation apportait une stabilisation importante de l'ordre de 60 jours lors de leur incubation dans un tampon salin de type PBS.

Ce nombre est à comparer avec les quelques minutes après lesquelles on voit apparaître la formation de bulles d'hydrogène, témoin de la dégradation de la membrane non traitée. La dissolution d'acide silicique modifie la structure nanoporeuse de la membrane qui finit par se boucher. Dans le plasma, milieu plus complexe, on observe tout de même une dégradation de la membrane qui conduit à l'effondrement de la structure du silicium poreux sur elle-même et au bouchage des pores après 1 semaine d'incubation, ce qui témoigne tout de même de l'efficacité du traitement. Le bouchage des pores est peut-être également amplifié par l'adhésion de protéines à la surface de la membrane.

Une implantation de longue durée dans le corps ne peut pas être envisagée avec ce type de membranes, à moins de réussir à silaniser de façon parfaite la surface : le moindre Si-OH resté libre va se dissoudre et la membrane finira toujours par se dégrader et s'effondrer sur elle-même.

Cependant, l'utilisation de poly-ethylene-glycol (PEG, $[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}]_n$) permet de limiter l'adsorption des protéines à la surface de la membrane. Cette résistance à l'adsorption, dénommée « biofouling » en anglais, est très probablement liée à la capacité du polymère à retenir en son sein de grandes quantités d'eau, de par sa composition moléculaire mais également du fait de sa conformation spatiale [8]: les liaisons hydrogènes établies entre le polymère (le PEG) et le solvant (l'eau) créent une barrière énergétique suffisante pour éviter les liaisons électrostatiques ou hydrophobes entre des protéines et la membrane. Ce phénomène est très bien décrit dans plusieurs revues, notamment celle de M.Morra [9].

L'utilisation du PEG comme molécule d'anti-encrassement a montré une efficacité suffisante pour continuer des recherches dans cette voie en traitant la membrane constituant la couche de biocompatibilité avec ce type de molécule ou en utilisant un polymère possédant ce type de propriétés (figure 5 page 13 de l'article qui suit). LE PEG est très utilisé en cosmétique et dans la vectorisation de médicaments. Il est important de noter l'existence d'anticorps anti-PEG chez des sujets sains ou des patients traités, ce qui pourrait également constituer un frein au développement futur de ce type de membrane [10,11].

3.1.2.2 Surface chemical stabilisation of porous silicon for biomimetic membranes used in physiological conditions

Surface chemical stabilisation of porous silicon for biomimetic membranes used in physiological conditions

Abdoulatif Baraket,^a Jean-Pierre Alcaraz,^a Chantal Gondran, Marie-Line Cosnier^{*a}, Philippe Cinquin^a, Donald K Martin^a

Received 00th January 20xx,
Accepted 00th January 20xx

DOI: 10.1039/x0xx00000x

www.rsc.org/

In the present study, we report the stabilisation of porous silicon (pSi) membranes in physiological medium. The pore sizes of these membranes were between 5 and 20 nm, whilst the membrane thickness was around 70 μm . The surface of pSi was firstly stabilised by chemical surface oxidation using RCA1 and RCA2 protocols, followed by a PEGylation process using a silane-PEG. This chemical surface modification has shown a good stability of pSi in PBS for a long period, while leaving the pSi surface sufficiently hydrophilic for buffer circulation through the membrane. This was confirmed by a good filtration and diffusion of several biomolecule sizes without any blocking of the pSi structure. The diffusion coefficient of fluorescein through the membrane was $D_{(\text{SiP})} = 2 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$, and $2.2 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$ for glucose. This latter has continued to diffuse through the pSi membrane after two months of pSi membrane conservation in PBS. These preliminary results are very promising for filtration or purification of biomolecule buffers. The chemical stabilisation of pSi membrane opens the possibility to its implantation for a long period.

Introduction

Porous silicon (pSi) was widely used in biomedical applications due its biocompatibility and many other attractive physical and chemical properties^{1, 2}. This material was mainly used in medical field for the development of biosensors³ and drug delivery^{4, 5}. However, the surface of pSi evolves in physiological media due to many factors related to pH, temperature, percentage of porosity, surface chemistry⁶ etc. The freshly prepared porous silicon has always a hydride silicon structure (SiH_x , $x=1, 2 \text{ or } 3$)^{6, 7} which is a very reactive chemical structure in physiological medium. Therefore, the hydride silicon structure turns into orthosilicic acid ($\text{Si}(\text{OH})_4$) in aqueous solutions in the physiological pH range.

Dissolution of pSi in physiological medium can be an important tool for drug delivery or some specific porous silicon based biosensors. Nevertheless, this phenomenon of dissolution can also be an obstacle when pSi silicon is used as a membrane for

ions or biomolecule exchanges⁸. Therefore, membranes based on pSi have a specific thickness and pore size allowing the circulation of a certain size of biomolecules through the membrane. The evolution of pSi in physiological mediums can be highlighted either by a change of the membrane pores size or by a total blocking of these pores, as well as by a diminution in the membrane thickness which can affect the flow and thus properties of diffusion. To overcome this problem, several techniques such as molecular self assembly, chemical and plasma treatment, electroless deposition of metals or coating of biomaterials have been reported in the literature⁹. All these surface modification methods have been developed taking into account the pore sizes, the membrane thickness and the pores density.

It is known that the most common techniques used to preserve the chemical structure of pSi were the oxidation and silanisation. Thermal oxidation was reported as the better process to completely oxidize the pSi surface¹⁰. Oxidation with this technique requires an annealing of pSi at $\sim 700^\circ\text{C}$ under oxygen flow. At this temperature the pSi was known by changing its structure and thereby the flow properties. It is possible to perform a back-bond oxidation at a lower temperature 250 - 450°C under flow of oxygen. The oxidation with this process generates hydroxyl groups on pSi surface, but there were always remaining hydride silicon groups on the pSi surface¹⁰. Another soft technique to oxidize pSi has been

^a ISA, Institut des Sciences Analytiques, Département LSA, 5, rue de la Doua, 69100 Villeurbanne, France. Téléphone: +33 437 42 35 69.

^b Université Grenoble Alpes / CNRS / TIMC-IMAG UMR 5525 (SyNaBi), Grenoble, France, Faculté de Médecine 38706 La Tronche cedex - France.

^c Université Grenoble Alpes / CNRS / DCM UMR 5250 (BEA)

^d Electronic Supplementary Information (ESI) available: [details of any supplementary information available should be included here]. See DOI: 10.1039/x0xx00000x

reported by L. Jiang et al.¹¹ using oxygen plasma. In their study, the authors have demonstrated that during the plasma process, the oxygen ions concentration increase inside the membrane regarding the pore size and the porous silicon membrane thickness. Therefore, for narrow pores, the oxygen ions concentration cannot reach a certain depth. Consequently, this technique can be only used for thin porous membranes. Regarding this fragile structure of pSi, only aqueous chemical treatments remain the best candidate for pSi oxidation, as chemical aqueous solutions cross all the membrane, and oxidize thus all pSi surface. Several liquid phase oxidations have been developed in the literature such as KOH, KNO₃, H₂O₂, H₂SO₄, and piranha solution (sulphuric acid + hydrogen peroxide)¹²⁻¹⁵. These oxidants turn the pSi surface into hydroxyl groups with a release of hydrogen.

In addition to the oxidation, pSi can also be silanised with different terminated silane groups for bio-functionalization or protection of its surface for implantation. In this interest, N. Naveas et al.¹⁶ has reported an exhaustive work about chemical stabilization of porous silicon using a silane-amine 3-aminopropyl-triethoxysilane known as APTES. The amine terminated groups allow grafting several biomolecules on pSi surface. In this study, the author has made a comparison between a treated APTES pSi previously oxidised by thermal and by chemical protocols. In the same principle A. Bragaru et al.¹⁷ have reported about APTES bio-functionalization of porous silicon using a combination of several oxidation protocols based on hydrogen peroxide. Although this silane reagent opens the possibility to graft a large range of biomolecules onto pSi surface, it is not recommended to use it for implantable devices due to the high nonspecific adsorption caused by amine groups of APTES with other biomolecules. For this interest a polyethylene glycol silane (silane-PEG) was used as an alternative silane reagent for implantable devices passivation. PEG is known in the literature for minimizing non specific protein binding while leaving the surface hydrophilic. Several protocols have been developed for the PEGylation of pSi, including the silylation protocols. A recent paper¹⁸ describes the functionalization of porous silicon with silane-PEG-NHS to provide a homogeneous biomolecules coating on the surface. The latter were made on pSi previously oxidized thermally, by RCA1 and RCA2 protocols or by other oxidation processes¹⁸⁻²¹.

In the present research, we have studied the stabilisation of porous silicon in phosphate buffered saline (PBS) which is close to the real physiological condition. We have proposed several protocols to protect the pSi while leaving the porous surface sufficiently hydrophilic allowing the circulation of buffers through the membrane. Indeed, the membranes were oxidized firstly by piranha solution, sulfuric acid (H₂SO₄), hydrogen peroxide (H₂O₂), and RCA1+RCA2 protocols. Afterward, a silane monolayer with PEG-terminated groups has been optimized to cover the whole surface of pSi matrix which is in contact with the physiological medium. After each treatment, the

membranes were immersed in PBS solution to validate the pSi stabilization. Diffusion experiments and 4 electrodes electrochemical impedance spectroscopy allowed us to characterize the functionalized membrane and a final test of the membrane over time after incubation in blood plasma was done to validate the use of this technique.

Experimental

Reagents

Sulfuric acid 95%, hydrogen peroxide 35%, Hydrochloric acid (37%), ammonium hydroxide (30%), Fluorescein sodium salt, FITC Dextran, Bovin Serum Albumin (BSA), Glucose were purchased from Sigma-Aldrich. 2-[Methoxy(polyethyleneoxy) propyl]trichlorosilane (TCS) was purchased from ABCR, Germany. The glucose assay kit Glucose-GOD400 was purchased from Libios, France.

Preparation of porous silicon membranes

Porous silicon (pSi) material has been electrochemically generated in a hydrofluoric solution (HF) on a 200 mm diameter silicon substrate platform. A schematic of the process is displayed in supplementary (Sfigure 1). The 200 mm equipment is composed of a cleaning and an anodisation chambers and it is fully automatic. Anodic dissolution of silicon was performed in a double tank cell where the front and back side of silicon wafer were immersed in the same electrolyte solution. This was made from a hydrofluoric/isopropanol (IPA) mixture with 7 volumes of HF (50 % weight) and 3 volumes of IPA. The porous silicon layer has been obtained on a <100> boron-doped silicon substrate with a 10-20 mOhm.cm resistivity. Anodisation has been performed, at room temperature, in a galvanostatic mode with a current density equal to 17 mA/cm². A 100µm depth, of pSi thickness has been achieved by adjusting the time process. In such conditions, a porosity gradient was observed throughout the depth profile and attributed to HF lowering concentration due to the low species replacement as process goes by. Afterward, DRIE process was performed from the back side of Si wafer through a photo-mask in order to open the porous silicon membrane. DRIE process was stopped once the pSi layer was achieved. The final thickness of porous membrane was ~ 70µm.

Chemical surface oxidation of pSi

Sulfuric acid and Hydrogen peroxide

Porous membranes were separately dipped in concentrate aqueous sulfuric acid (95%) and hydrogen peroxide (35% wt.in H₂O) at different times. A pre-wetting of porous surface membranes with ethanol was necessary to help sulfuric acid and hydrogen peroxide to cross the membranes. These were then rinsed three times with deionized (DI) water.

Base Piranha

The membrane were dipped in a mixture of hydrogen peroxide and sulfuric acid (3/4 : 1/4) for 1 hour. The same technique of pre-wetting with ethanol was used to help piranha solution cross the membrane. Afterward the membranes were rinsed three times with DI water

RCA protocols

In this step the membranes were dipped in the first aqueous solution called RCA1²² made from a mixture of concentrate ammonium hydroxide (98%), hydrogen peroxide (35%) and water with a ratio of (1:1:5) at room temperature. These membranes were then rinsed 5 min in DI water for three times and dried with a smooth stream of compressed air in order to avoid breaking membranes.



Scheme 1: Diagram illustrates the RCA1 and RCA2 protocols for porous silicon oxidation.

Scheme 1 illustrates the RCA protocol. After RCA1 treatment, the membranes were dipped again in a second aqueous solution called RCA2 made from a mixture of hydrochloric acid (37%), hydrogen peroxide (35%) and water with a ratio of (1:1:5) at 65°C for 5 min. Finally, the membranes were rinsed in water for 5 min three times and dried with compressed air.

Silanisation

The oxidized porous membranes were immersed in a vessel purged with argon and filled with heptane solution containing 17 mM of 2-[methoxy(polyethyleneoxy)propyl]trichlorosilane (TCS). This static silanisation was made at different times at room temperature. The membranes were then washed 5 min in acetone, then in ethanol, and dried with a slight stream of nitrogen. Finally, the TCS treated membranes were left in oven at 80°C during 30min in order to enhance TCS chemisorption onto pSi surface.

Wettability

Contact angle measurements (CAM) were made to characterize untreated pSi and chemically treated pSi, using Kruss equipment (DSA100W, Germany). The contact angles were analyzed with deionized water and the measurements were repeated five times for each substrate.

Scanning electron microscopy (SEM)

Scanning electron microscope (SEM) characterization was made after each step in order to follow the porous membrane evolution. Membranes were cleaved and placed onto the holder of SEM machine (5500a HITACHI).

Fourier-transformed infrared (FTIR) analysis

All spectra were measured with a Bruker IFS 55A FTIR spectrometer. The spectrometer employed a DTGS detector in transmission mod, sensitive to the infrared region from 4000 to 500 cm⁻¹. All spectra were recorded at 4 cm⁻¹ resolution and averaged using 32 scans. The spectrometer was monitored from a personal computer using OPUS software.

Four electrodes electrochemical impedance spectroscopy (EIS) analysis

The four-electrode impedance measurements were performed using the cell shown in [supplementary \(Sfigure 2\)](#) with a VSP300 Biologic potentiostat. The porous silicon membrane was clamped between two compartments with silicone flat gaskets. Each compartment was filled with 10 fold diluted PBS and contained a platinum electrode (current carrying electrode) and an Ag/AgCl electrode (reference electrode). 51 measurements were conducted over a frequency region of 200KHz - 100mHz, with an applied voltage amplitude of 20mV peak to peak. Four-electrode technique is used to minimize the effects of electrode polarization on impedance measurements. Impedance plots were fitted to an equivalent electrical circuit using the ZView software (Scribner Associates, Inc).

Diffusion experiment procedure:

Fluorescence test

Optical fluorescence characterisations were performed using fluorescein (FITC) labelled biomolecules or recombinant Yellow Fluorescent Protein (YFP). These have been filtered through pSi membrane. Therefore, 100µL of buffer containing FITC fluorescent biomolecules or 20 µL of 1.7µg/µL of YFP was dropped on the back side of the membrane and the optical observation was made from the other side ([Supplementary Sfigure 3](#)). The capillary force drives the liquid into the membrane. After 10 min the liquid can be seen on the other side. The fluorescence images were taken using a fluorescence microscope (Olympus Bx60 apparatus, equipped with 10×, 40× lenses and a monochrome camera USPT x10). Samples were observed by FITC fluorescence light which was excited with a 494(±25) nm band-pass filter and fluorescence from the sample was observed with a 518(±70) nm band-pass filter

Dosage of biomolecules

The diffusion apparatus was a PermeGear side-bi-Side Cell ([Supplementary Sfigure 4](#)). It consists of two chambers, each of 5ml volume. The porous silicon membrane was clamped between the chambers with two flat Teflon foam gasket to avoid any leakage. The chamber (chamber B) was filled with only PBS.

Glucose and fluorescein diffusion analysis :

The kinetic diffusion was immediately started after filling the chamber (A) with 10 g/L glucose or 0.2 mg/mL fluorescein (FITC) in PBS solution. The two solutions were homogenized by stirring with magnetic barrels and a chosen temperature of 25°C was controlled by water jackets. Aliquots of 50 μ L from the chamber (B) were then sampled at different times. Glucose concentration was obtained by using the glucose assay kit (LIBIOS). The absorbance and fluorescence were being measured with a VICTOR spectrofluorimeter microplate reader (Perkin Elmer). The same passive diffusion experiment was performed with dialysis 6-8 kDa cellulose acetate membrane as a reference for diffusion. Experiment with sheep plasma: the glucose concentration in the sheep plasma placed in chamber A was increase to 10 g/L and the diffusion occurs against PBS in chamber B. Aliquots were sampled after 20 minutes of diffusion and glucose concentration in chamber (B) was obtained using the same glucose assay kit. The membranes were then incubated in sheep plasma supplemented with sodium azide 0.01% to avoid any bacterial contamination during the 2 weeks of experiment.

Protein diffusion analysis :

A protein lysate from an E.Coli culture was prepared in distilled water by sonication and centrifugation at 15000 rpm for 20 min. The protein concentration was determinate with the Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay Kit. Briefly, it combines the reduction of Cu^{2+} to Cu^+ by proteins in an alkaline medium followed by the colorimetric detection of the cuprous cation chelated by bicinchoninic acid. A concentration of 1.5 g/l of total protein extract was used in the diffusion experiments. For the filtration experiment, where a pressure of 0.1 bar was applied to the membrane, a volume of 20 μ l of protein lysate was extracted from the filtered buffer and analyzed on a 12 % SDS-PAGE colored with Coomassie brilliant blue and quantified by BCA protein assay kit. For the passive diffusion experiment, in PermeGear cell, a volume of 5 ml of PBS containing 5.5 g/l of lysate was made in chamber (A) against only 5 mL of PBS in chamber (B). After 40 min of passive diffusion, a sample of 300 μ l of chamber B was precipitated with 80% acetone and 20 μ l samples from both A and B chambers were put on a 15 % SDS PAGE colored with Coomassie brilliant blue and quantified by BCA protein assay kit.

YFP preparation:

The production of the recombinant yellow fluorescent protein (YFP) is described in Simkin AJ et al. works²³. Briefly, the YFP was cloned in pQE plasmid, produced in E.coli M15, purified on Ni-NTA column and desalted on a PD10 column. The protein was then stocked frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. The final concentration was 1.7 μ g/ μ L.

Results and discussion

Chemical stabilisation of porous silicon

Silicon porous membranes were treated by several chemical protocols in order to be used in physiological mediums. These protocols were chosen in such a way that they will not change the geometry and the structure of silicon pores. Figure 1 shows the front-side and the back-side of an individual chip of 20mm x 20mm.

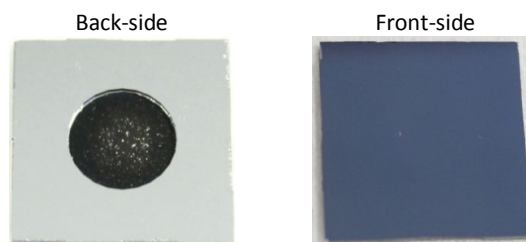


Figure 1: Different views of an individual porous silicon membrane

The back-side of the membrane has a very hydrophobic character (contact angle of $\sim 130^\circ$ (Figure 2)) due to the presence of hydrosilane bonds (Si-H_x , $x=1,2,3$) onto the porous surface. This chemical structure prevents the circulation of water through the membrane. In addition, the high roughness of the back-side of the membrane also contributes to the high hydrophobic character (Figure 8a, b). This rough structure was formed because of the deep reactive ion etching (DRIE) which is performed to open the membranes.

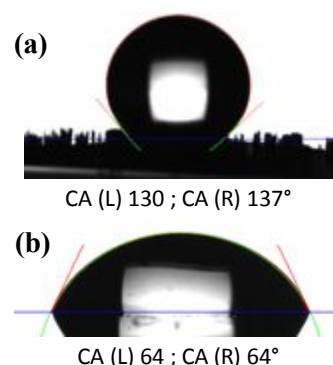


Figure 2: Contact angles and profiles of the water droplet on (a) the back-side of the membrane (rough side) without any treatment and (b) the front-side of the membrane (smooth side).

It is possible to pre-wet the membrane with ethanol in order to improve water circulation through the membrane. Indeed, the difference of how ethanol and water wet the surface is related to how the $-\text{OH}$ group is positioned in water or in ethanol molecules. Therefore, ethanol (weakly polar solvent $\epsilon = 24.3$) leads to a decrease in water contact angle, which improves then the wetting by water. As the latter is very polar ($\epsilon = 80$), it wet thereby hydrophilic surface by forming hydrogen bonds with surface chemical function²⁴. In this interest E. Mery²⁵ has reported an exhaustive work of porous silicon wettability and surface energy using different ratio of ethanol/water mixture. Although this technique has helped the circulation of water through the membrane, it cannot be used for physiological medium due to the presence of ethanol. This can denature biomolecules present in physiological mediums and requires a non convenient two step

procedure. In addition and more importantly, the freshly prepared pSi dissolves in water or in physiological serum to orthosilicic acid. The kinetic of pSi dissolution depends on the pore sizes as well as on the pH and the temperature of the medium [6] and prevents the use of this type of membrane as a diffusion barrier, even for short term use (minutes). In the present work, the dissolution of pSi in PBS buffer (pH 7.4 at room temperature (24°)) was observed by the naked eye by a formation of hydrogen bubbles on the surface of the porous membrane (Figure 3c) (see supplementary video). To overcome this problem of pSi dissolution, four chemical protocols were proposed in this work in order to protect the pSi surface. After each chemical treatment, the membranes were dipped in aqueous solution of PBS to validate the absence of hydrogen bubbles and thus the chemical stabilisation of pSi.

Piranha treatment

Although the piranha treatment gave good results in terms of surface oxidation and stabilization in PBS solution (absence of hydrogen bubbles), this protocol was excluded because it creates strong deformation of the 70 μm membrane. This may change the pSi structure, the pore size and thus, the flow of biomolecules.

Sulfuric acid

Treatment by sulfuric acid gives hydrophilic behaviour of pSi. However, it leaves lots of sulfur contamination molecules, which was difficult to remove and clean afterward. The sulfur residue was confirmed by the presence of hydrogen sulfide bubbles even after many times of rinsing for long periods. In addition, this treatment changes significantly the density of the porous bulk (Figure 4c and d), compared to the oxidation made by hydrogen peroxide, in which the porous structure remained open on all the membrane (Figure 4a and b). Consequently, the oxidation with sulfuric acid has been excluded.

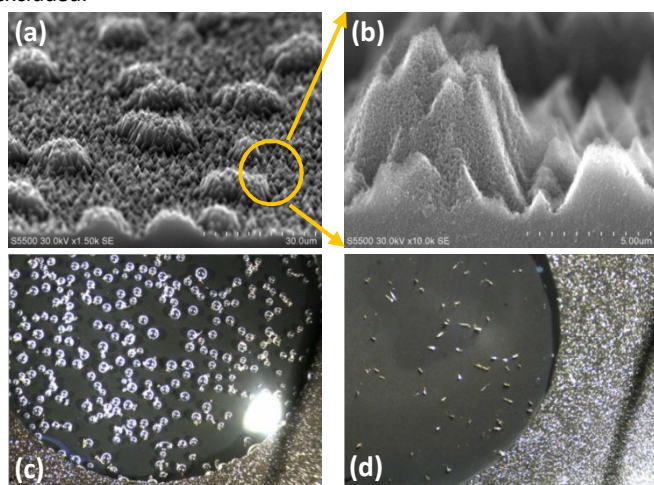


Figure 3: (a,b) SEM images of the back-side of the membrane showing the high roughness of the surface, (c) hydrogen bubbles formation in presence of PBS onto a non stabilized pSi membrane, (d) absence of hydrogen bubbles in presence of PBS for a stabilized pSi.

Hydrogen peroxide

In order to enhance the pSi oxidation with hydrogen peroxide, several combinations of parameters were made by changing the time of oxidation and H₂O₂ concentration. The oxidation time was varied from 1 to 30 hours, whilst the hydrogen peroxide was used at 35% or diluted in water (1:3).

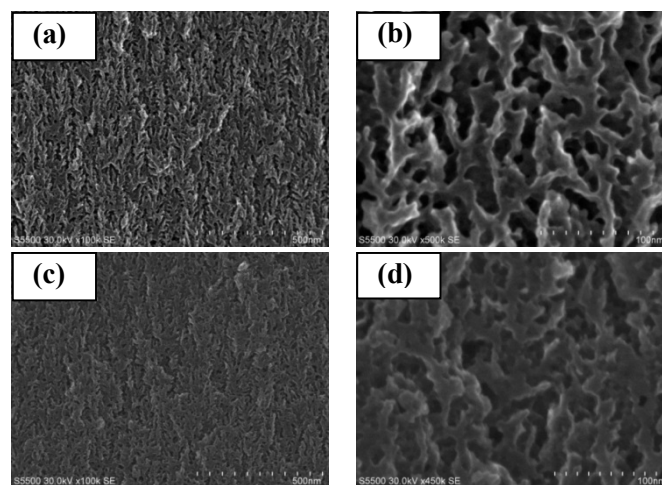


Figure 4: SEM images (cross view) of membranes oxidized by: (a, b) hydrogen peroxide H₂O₂ and (c, d) sulfuric acid H₂SO₄.

Figure 5I shows FTIR analysis of the pSi after different types of oxidation in comparison with an unoxidized pSi membrane. The three peaks 2000, 2150 and 2200 cm⁻¹ for non treated pSi, corresponds to the three forms of Si-H bonds which exist on the freshly prepared pSi.

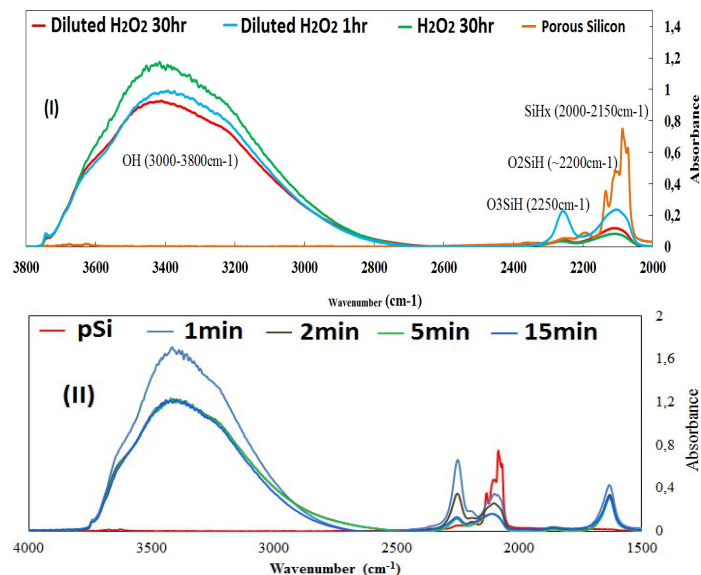


Figure 5: FTIR spectra for the analysis of (I) different types of pSi oxidation (II) RCA treatments at different times.

After 1hr of oxidation, these peaks decrease significantly with an apparition of a large peak between 3000 and 3800 cm⁻¹ which corresponds to OH bonds highlighting a significant pSi oxidation. This treatment of 1hr by hydrogen peroxide was not sufficient to totally stabilize the pSi. This was confirmed by a weak formation of minute hydrogen bubbles after 1hr of pSi immersion in PBS. By

increasing the duration of oxidation, the OH-peak increases accompanied by a significant decrease of Si-H peaks. The maximum oxidation state was achieved at 30hr of pSi oxidation at 30%. In these conditions, the oxidized pSi was sufficiently stabilized as no hydrogen bubbles were seen even after 4hr of pSi immersion in PBS. The oxidation with hydrogen peroxide has shown good preliminary results in terms of stability. However, the oxidation time of 30 hr was too long and it may generate an over oxidation which can affect the flow properties.

RCA1 and RCA2 treatment

To optimize the oxidation through these processes, RCA1 and RCA2 treatments were applied at different times. Therefore, FTIR measurements were performed after each RCA treatment to control the pSi oxidation. Si-H peaks were greatly reduced after 5 min of RCA treatment. Consequently, for only 5min of oxidation, similar results have been obtained when compared to those made by 30hr of oxidation using H₂O₂ (Figure 5 II). Normally, the RCA1 treatment was made at 65-80°C (REF). At this temperature with a concentrate ammonium hydroxide, the RCA1 contributes to the oxidation of pSi as well as to the dissolution of the formed silicon oxide. This was confirmed by an embrittlement of the porous membrane. In order to minimize this phenomenon the RCA1 step was made at room temperature followed by RCA2. In these conditions, the porous silicon was stable in PBS for three days. After this period, the porous structure was totally collapsed (Figure 6a).

With the aim to its implementation, pSi should be stable for a long period in physiological serum. For this interest, pSi membranes were silanised after their RCA oxidation in order to improve their stabilization time. Therefore, a silane-PEG 2-[Methoxy(polyethyleneoxy)propyl]trichlorosilane (TCS) was used at 17 mM for one hour immediately after RCA oxidation as it was previously described. This treatment was widely sufficient to preserve the pSi structure surface after 2 months of its incubation in PBS buffer (pH 7.4) with glucose (Figure 6b). This pSi stabilization result is very promising for biomolecules diffusion through the membrane for a long period without any blocking of the membrane.

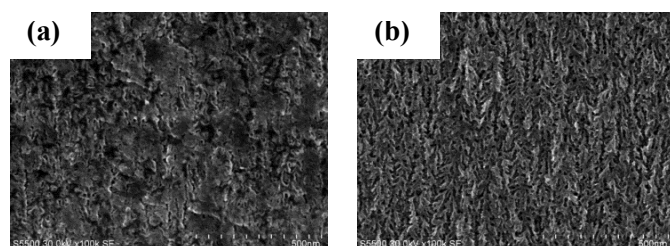


Figure 6 : SEM images for : (a) a totally collapsed structure of RCA oxidized porous silicon after three days in PBS, (b) RCA oxidized pSi and silanised with TCS at 1% after two month of its incubation in PBS.

Ion permeability of the nanoporous silicon membrane

Ion permeability properties of the porous membrane were studied by electrochemical impedance spectroscopy with a 4-electrode

configuration. Over time, the aging of the membrane is observed. This aging results in the decrease of permeability and an increase in the overall impedance. To demonstrate the beneficial effect of TCS treatment of the porous membrane, the comparison during the time between an only oxidized membrane and a TCS treated membrane was conducted. Figure 7a shows the Nyquist plot of the impedance obtained on the day zero for an oxidized and a TCS treated membrane. Figure 7b represents the Nyquist diagram obtained for these membranes after 2 days of PBS incubation for the oxidized membrane and 1 month of PBS incubation for the TCS silanised membrane. It can be seen that the overall impedance increases from about 500 to 2800 ohms after 1 month for a TCS treated porous membrane while these changes are obtained by only 2 days (from 500 to 4000 ohms) without silanisation treatment of the porous membrane.

Equivalent circuits (figure 7a, b) were used to find the electrical parameters corresponding to Figure 7a, b. The line passing through the data points in Figure 7a and b represent the fits using this circuit, and its superposition on the data points indicated a good match of the model with the measured data. For zero day, the equivalent circuit consists of a parallel RC corresponding to the ion transfer resistance, $R_{interface}$, and the double layer capacity, $C_{interface}$, at the membrane/solution interface (Figure 7a). Constant phase element (CPE) is used instead of capacitance, to account of surface inhomogeneity of the interface between solution and porous membrane.

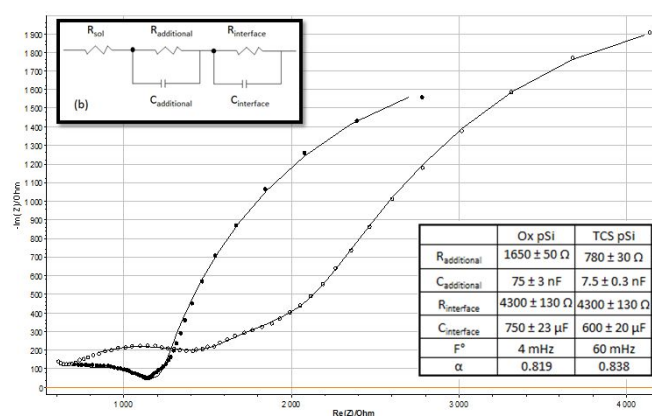
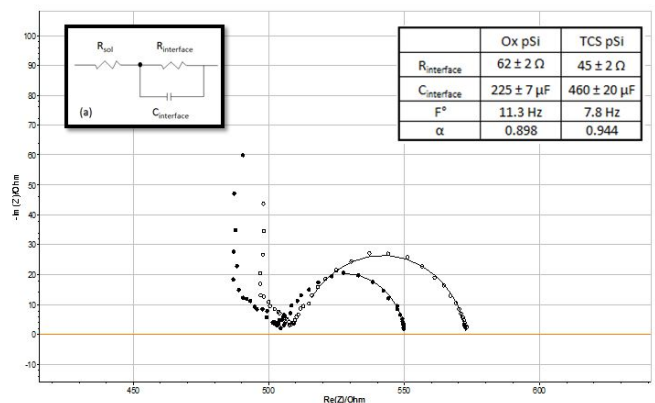


Figure 7: a) Nyquist plot of oxidized (empty circles) and TCS treated membrane (full circles) before PBS incubation. The fitted curves are

showed with lines; b) Nyquist plot of oxidized (empty circles) and TCS treated membrane (full circles) after PBS incubation: 2 days for the oxidized membrane and 30 days for the TCS treated membrane. The fitted curves are showed with lines.

The impedance of a CPE is given by $Z_{CPE} = Q^{-1}(j\omega)^{-\alpha}$ where Q is the amplitude of the CPE, ω is the angular frequency and α is the exponent which is a real number that varies between 0 and 1. When $\alpha = 1$, purely capacitive behaviour is observed (i.e. $Q = C$). The table presented in figure 7a shows values of $R_{interface}$, $C_{interface}$, the frequency at the top of the semicircle f° and the parameter of surface inhomogeneity, α , obtained by the experimental data fitting. The resistances of the interfaces are of the same order of magnitude even if the resistance of the interface with the TCS treated porous membrane was slightly lower. The double layers capacities appear high in comparison to planar interfaces but in view of the porosity of the membrane these values are not aberrant. The parameter α is still high which confirms a high homogeneity of the interface between membrane and solution in the pores. The treatment of the porous membrane has the effect of reducing the resistance of ion transfer, increase the double layer capacitance and decrease the frequency f° . This shows that the pores of the membrane do not have the same electrical and dielectric properties after treatment. After 1 month with a TCS treated porous membrane (or 2 days with an oxidized membrane), the equivalent circuit should be adjusted by adding, in series, a parallel RC due to degradation of the membrane. A loop strongly decentered corresponding to this additional RC is seen, at high frequency, between the beginning of the impedance spectrum and the semicircle corresponding to the membrane/solution interface in figure 7b. Presumably a hydrated silicon oxide layer partially covers the membrane/solution interface in the pores and poor ionic conduction of the hydrated silicon oxide layer brings up an additional loop on the Nyquist plot.

The table presented in figure 7b shows values of the equivalent circuit elements obtained by the experimental data fitting. Here the unity of the additional capacitance is nanofaradic, which confirm the presence of an additional material which could be hydrated silicon oxide. In addition, the electrical and dielectric properties of the membrane solution interface (at low frequency on the Nyquist plot) have been heavily modified over time. The ionic transfer resistance has greatly increased while the double layer capacity and frequency f° have diminished which shows that the ion permeability of the porous membrane is strongly slowed down compared to day zero. The parameter α , is decreased indicating a loss of homogeneity of the interface. The pores are not as much homogeneous. This result demonstrates that the pores have been damaged over time certainly by a hydrated silicon oxide layer but that the TCS treatment slows the development of this layer.

Biological tests of the TCS treated porous membrane

Biomolecules filtration through the pSi membrane

After the stabilization by RCA treatment and TCS silanisation, the porous membrane was used for the filtration of different biomolecules with different sizes. In addition to pSi stabilization, these biological tests highlight the performance of using these membranes in complex mediums without any blocking of pores by biomolecules or nonspecific bonding. Table 1 shows the passage of fluorescein molecules (~ 1 nm diameter) through the pSi membrane. This was confirmed by a presence of a high intensity of fluorescence on the front side of the membrane into the crossed buffed. The same principle of filtration was applied to other biomolecules with other different sizes (Table 1 supplementary).

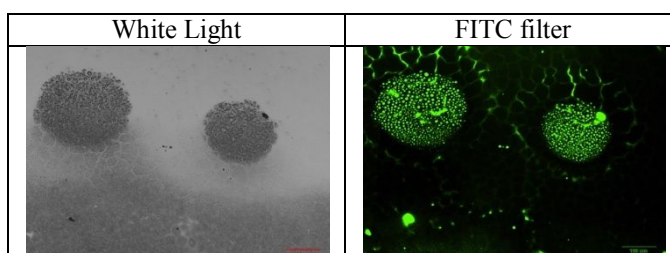


Table 1: Optical fluorescent images of FITC molecules filtered through the pSi membrane.

Table 2 summaries all biomolecules filtered in the present study by the membrane with their molecular weight. The glucose (~ 1 nm diameter) penetrates through the membrane without any problem regarding its small size. Lipidot nanoparticles were not able to penetrate through the membrane and have been blocked at the back side of the membrane. This was confirmed by the absence of fluorescence in the buffer crossing the membrane (Table 1a and b). The same experience was applied to these membranes using a yellow fluorescent protein YFP which has a cylindrical shape of 4.2 nm long \times 2.4 nm diameter. This biomolecules was also filtered by the membrane since no fluorescence was observed on the front side into the past buffer (Table 1e and f). Despite the small size of this biomolecules, it cannot cross the membrane given its geometry can change and be blocked in a certain depth of the membrane. This was due to the soft structure of these biomolecules. In addition, the difference of charges of biomolecules and the charges of the treated membrane surface can favorite or prevent the circulation of these biomolecules through the membrane (REF I should find the paper to argue here). For the same reasons of biomolecules size and charge described previously, the protein lysate from an E.Coli culture was not observed in the filtered buffer through the membrane.

Another protein bovine serum albumin (BSA) was also chosen for these tests of filtration due to its important presence in almost all physiological serum. Moreover, this protein is known in the literature for its character to be adsorbed onto several materials and it is difficult to remove it afterward. The filtration of this biomolecule through the TCS treated membrane was successfully carried out without any blocking of the membrane. When compared to the only RCA oxidized membrane, fragments of BSA stick strongly onto the porous surface and block thus the

membrane forming a white blocking film on the membrane surface (Supplementary Figure 5). The chemical surface modification using TCS was widely sufficient to preserve the geometry of the porous silicon membrane and protect it from blocking with physiological serum.

Molecules	Molecular Weight	Molecule sizes	Passage of biomolecules
Lipidot	>50000 kDa	50 nm	✗
Yellow Fluorescent Protein (YFP)	27kDa	4,2 nm × 2,4Ø	✗
Fluorescein isothiocyanate	389,38 g/mol	~ 1 nm	✓
Glucose 5mM	180 g/mol	0.7 nm	✓
Bacterial lysate 5,5mg/mL	Peptides of 1kDa to a large proteins of 250 kDa	~ 1 to 100 nm	✗

Table 2: Summary of biomolecules filtered by TCS treated pSi with their corresponding molecular weight and size. ✓ biomolecule has crossed the membrane, ✗ biomolecule has not crossed the membrane

Passive diffusion of biomolecules:

Diffusion of lysate

The theoretical volume of a globular protein can be calculated from the approximation done by Harpaz et al. :Vol. prot(Å³) = molecular weight (g.mol⁻¹) X 1,21. Assuming that the pores on one side are about 5nm in diameter, it means that peptides more than 2200 Da cannot pass through the membrane.

Bacterial lysate which contains a huge range of protein sizes was used in the present study in order to access the cut off of the membrane. After filtration or passive diffusion, the quantification of the proteins contained in the buffer by BCA protein assay shows the presence of a light purple coloration (see experimental section, protein diffusion analysis for details) This coloration is also present when using pure BSA instead of a bacterial lysate (data not shown or supl data). However, BSA (60kDa protein) is twofold bigger than YFP which is blocked by the membrane. We conclude that this way of analysis was not relevant as single polar amino acids can react with the Cu²⁺ and induce artifacts: Some protein degradation can release amino acids that can pass through the membrane because of their small size and can then be detected by BCA protein assay

The analysis of the SDS-PAGE is more relevant despite the fact that we can be below the detection limit of the Coomassie blue (around 100 ng for 20-30 kDa proteins). Nonetheless, no protein band can be seen after filtration (figure 8a) neither passive diffusion (figure 8b), even if the sample was concentrated 15 fold before putting it on the gel after 5 hours experiment. A control experiment driven with a 6-8 kDa cellulose acetate membrane reveals the same profile.

Diffusion of glucose and fluorescein

Passive diffusion was also applied to glucose and fluorescein as a function of time. The TCS pSi and control (cellulose acetate) membranes has been kept in PBS buffer for two months.

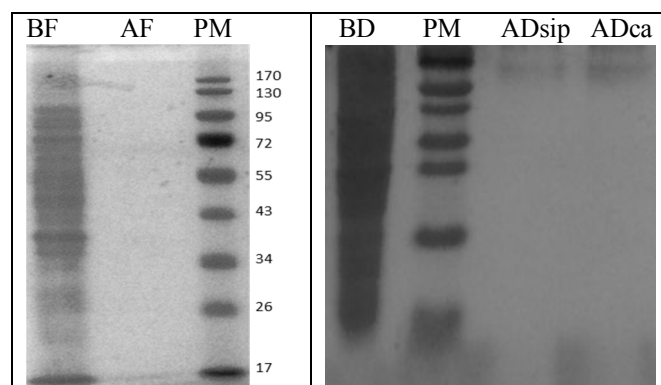


Figure 8: (a) filtration experiment BF: before filtration (20 µl 30 µg), AF after filtration, PM molecular weight ladder (b) diffusion experiment, BD : before diffusion, PM : molecular weight ladder, ADSip : after diffusion 15X concentrated porous silicon, ADca : after diffusion 15X concentrated cellulose acetate.

Diffusion experiment were driven as a function of time in a diffusion cell and the apparent permeability and diffusion coefficient of both glucose and fluorescein were calculated from the measurement of the flux of the probe used according to Fick's law on passive diffusion:

$$P = \frac{V_b}{AC_a} * \left(\frac{dC_b}{dt} \right)$$

Where (V_b) is the volume of the sampling chamber (B) (5 mL) (SFigure 4 supplementary), (A) is the area of the membrane (0.785 cm²) exposed to buffer from both sides of the cell, (C_a) is the concentration (g/L) of the probe in donor chamber (A), and ($(dC_b)/dt$) is the slope of the plot $C_b=f(t)$. SFigure 6a and b (Supplementary) shows that glucose and fluorescein passively diffuse across the tested membranes. A linear fit was applied to access ($(dC_b)/dt$) with a good approximation of the permeability coefficient. The diffusion coefficient (D) for the membranes was calculated from

$$D = Pl$$

Where l is the thickness of the membrane: 50 µm for cellulose acetate membrane and 70 µm for porous silicon membrane and P is the Fick's law. As the question was to demonstrate the long term stability of silanised nanoporous silicon, we started diffusion experiments of both glucose and fluorescein after 2 weeks of incubation of the membrane in PBS. The aging identify 2 periods as seen in figure 9. During the first month, from day 18 to day 33, the diffusion coefficient was twofold greater than cellulose acetate. The diffusion coefficient $D(SiP) = 2 \times 10^{-10}$ cm²/s for fluorescein and 4.3×10^{-9} cm²/s for glucose. Around 2 months, from day 55 to day 63, the diffusion drops by a factor 8 but the TCS treated membrane remains porous with respect to glucose and fluorescein. The diffusion coefficient drops to 15% of the initial value in both cases.

A 1/20 ratio is found between glucose and fluorescein diffusion due to the structural difference in the probes used. The molecular weight of fluorescein is 2 fold bigger than glucose, it's a negatively charged flat molecule, and the presence of aromatic rings makes it hydrophobic

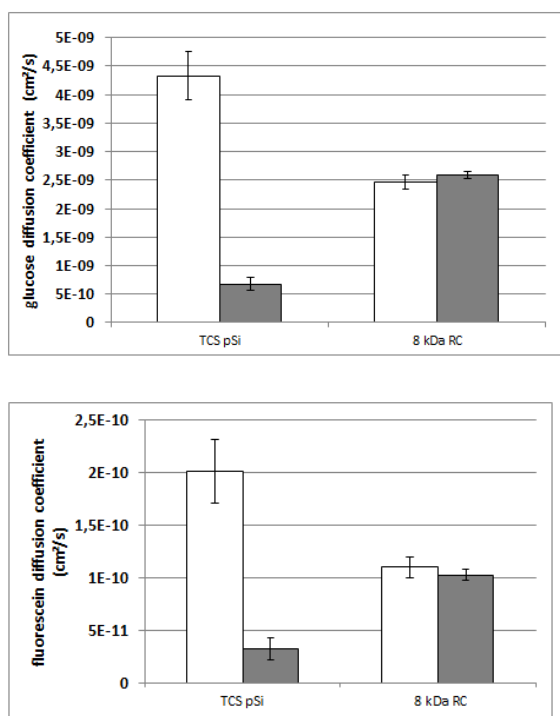


Figure 9: Diffusion coefficients in term of type of membrane and their time stability during aging. TCSpSi refers to silanised nanoporous silicon membrane and 8kDa RC refers to regenerated cellulose with 8kDa cut-off. Two periods are identified by colors: white from day18 to day33 and grey from day55 to day63.

All these differences can explain that diffusion of glucose is more than 20 fold bigger than diffusion of fluorescein. The diffusion coefficient is in the same order than the 6-8 kDa cellulose acetate membrane well characterized as a dialysis membrane. With the latter, a ratio of 1/25 is found between the 2 probes with glucose diffusion coefficient of 2.5×10^{-9} cm²/s for glucose and $1. \times 10^{-10}$ cm²/s for the fluorescein. The control with cellulose acetate membrane shows a smaller diffusion coefficient but remains stable after 2 months.

Diffusion after plasma incubation

To go further in this diffusion experiment and evaluate the stability of porous silicon in the plasma compartment, the effect of plasma incubation instead of PBS has been tested on oxidized and TCS stabilized pSi membranes towards glucose diffusion (figure 10).

Plasma consists in a very complex medium compared to PBS: there is 2 to 3 hundreds of proteins (60 to 80 g/l, approximately half is serum albumin), nutrients (glucose, lipids, and amino acids) and metabolites (urea, bilirubin), great diversity of ions (mono and divalent) in a bicarbonate buffer. Despite this fact, we proved that the TCS membranes remained porous for more than 1 week when

incubated in sheep plasma. This was not the case for the oxidized pSi that became clogged after only two days. After 2 weeks, no more glucose can be detected in the second chamber (SFigure 4 supplementary). At the start of the experiment, the diffusion rate of glucose across TCS treated membrane is twofold less than across a non treated one.

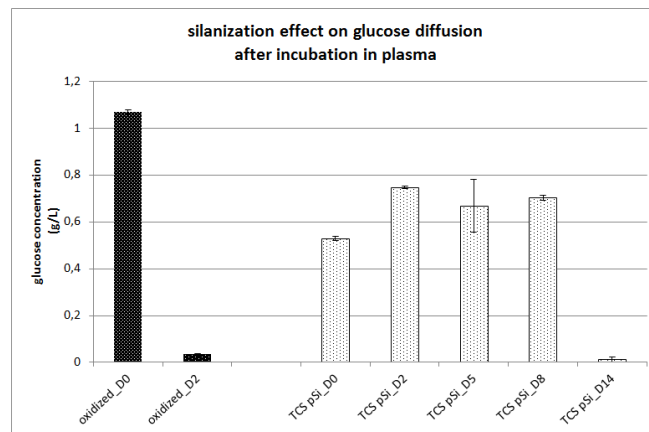


Figure 10: Silanisation effect on glucose diffusion after plasma incubation from day 0 to day 14 with oxidized membranes (oxidized black) and TCS treated membrane (TCS pSi grey)

This result confirms that the structure of the silanised membrane containing PEG affects not only the structure of the membrane, as seen in ionic permeability but also diffusion. Monitoring of the impedance showed that even after 2 weeks of incubation, the membrane is still porous towards ions (figure 11). Several impedance measurements were made between day zero and day 30. Figure 11 represents the low frequency impedance module (0.1 Hz) as a function of time for the TCS treated porous membrane and the oxidized porous membrane. The aging of the membrane is greatly slowed by the chemical surface modification of the pSi membrane using TCS silane reagent. Although the total impedance has been multiplied by 4 in 15 days, the TCS treated porous membrane retains good ion permeability

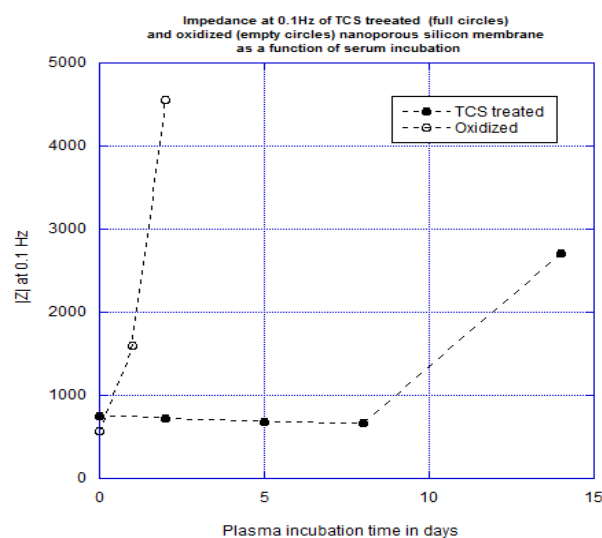


Figure 11 : monitoring of the impedance at 0.1 Hz for a TCS treated membrane (black circles) versus oxidized membrane (white circles) during plasma incubation.

Conclusion

Silicon nanoparticles are well adapted for drug delivery system because of their biocompatibility and biodegradability but it is quite challenging to stabilize a porous silicon membrane for physiological use. To our knowledge, our work shows the first demonstration of the use of nanoporous silicon membrane in physiological environment for a long period of time by studying the aging of the membrane. We have made a quite complete characterization of this membrane by different physical and chemical techniques: wettability, scanning electron microscopy, FTIR, PEIS. We have also used diffusion experiments and electrochemical measurements in physiological media to test its permeability and its stability. By using silanization of the membrane with a PEG silane, we have obtained a good stabilization of porous silicon membrane in physiological buffer for a long period of time. After 2 months in saline buffer and more than one week in a blood plasma, small molecules like glucose or fluorescein can still pass through the membrane.

Acknowledgement

IAB access to Victor .

References

- Gaburro Z, Daldosso N and P. L., 2005, 391–401.
- Canham L and M. D., *Crystal Research and Technology*, 1999, **34**, 948.
- Dhanekar S and J. S., *Biosensors and Bioelectronics*. , 2013 **41**, 54-64.
- Anglin EJ, Cheng L, Freeman WR and S. MJ., *Advanced Drug Delivery Reviews*., 2008, **60**, 1266-1277. .
- Zilony N, Tzur-Balter, S. E. A and S. O., *Scientific Reports* 3, 2013, 2499
- Anderson SHC, Elliott H, Wallis DJ, Canham LT and P. JJ., *physica status solidi (a)*. . , 2003;, **197**, 331-335.
- Xu D, Sun L, Li H, Zhang L, Guo G and Zhao X, *New J Chem.* , 2003, **27**, 300-306.
- Moghaddam S, Pengwang E, Jiang Y-B, Garcia AR, Burnett DJ and Brinker CJ, *Nat Nano.* , 2010 **5**, 230-236.
- Stroeve P and I. N., *Trends in Biotechnology*. , 2011, **6**, 259-266. .
- Riikonen J, Salomäki M, van Wonderen J, Kemell M, Xu W and Korhonen O, *Langmuir.* , 2012, **28**, 10573-10583. .
- Jiang L, Li S, Wang J, Yang L, Sun Q and L. Z., *Journal of Nanomaterials*. , 2014, 2014:2016.
- Cantin J., Schoisswohl M, Grosman A, Lebib S, Ortega C and von Berdeleben H., *Thin Solid Films*. , 1996 **276**, 76-79. .
- Fan HJ, Kuok MH, Ng SC, Lim HS, Liu NN, Boukherroub R and L. D. J., *Journal of Applied Physics*. , 2003, **94**, 1243-1247.
- Kozłowski F, Wagenseil W, Steiner P and L. W., *MRS Online Proceedings Library*. , 1994, 358.
- Leontis I, Othonos A and N. AG., *Nanoscale Res Lett.*, 2013, **8**.
- N. Naveas, V. T. Costa, D. Gallach, J. Hernandez-Montelongo, R. J. M. Palma, J. P. Garcia-Ruiz and M. Manso-Silván., *Science and Technology of Advanced Materials.*, 2012, **13**, 045009. .
- A. Bragaru, M. Simion, M. Miu, T. Ignat, I. Kleps, V. Schiopu, A. Avram and F. Craciunoiu, *International Semiconductor Conference Proceedings*, 2007 **1**, 147-150. .
- M. Baranowska, AJ. Slota, PJ. Eravuchira, M. Alba, P. Formentin, J. Pallarès, J. Ferré-Borrull and L. F. Marsal., *Journal of Colloid and Interface Science* 2015, **452**, 180-189.
- Britcher L, Barnes TJ, Griesser HJ and P. CA., *Langmuir.* , 2008 **24**, 7625–7627.
- L K, A C, P MJ and H. V., 2007.
- Low SP, Williams KA, Canham LT and V. NH., *Biomaterials.* , 2006 **27**, 4538-4546. .
- W. Kern, *Journal of the Electrochemical Society* 1990, **137** 1887-1892.
- Simkin AJ, Gaffe J, Alcaraz J-P, Carde J-P, Bramley PM and Fraser PD, *Phytochemistry.*, 2007 **68**, 1545-1556. .
- Peł'menshchikov AG, Morosi G and G. A., *J Phys Chem.* , 1992 **96**, 7422-7424. .
- M. E., 2006. .

Supplemental data

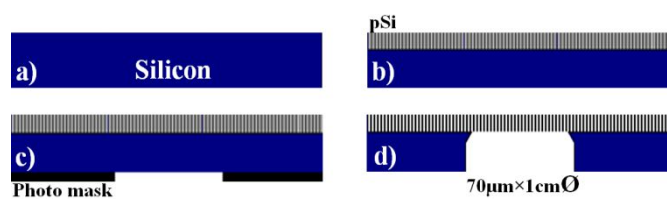


Figure 1: (a) silicon wafer of 700µm thick, (b) porosification of the front side (c) deep reactive ion etching (DRIE) through a Photo mask (d) final individual chip with an open membrane of 1cm diameter and 70µm

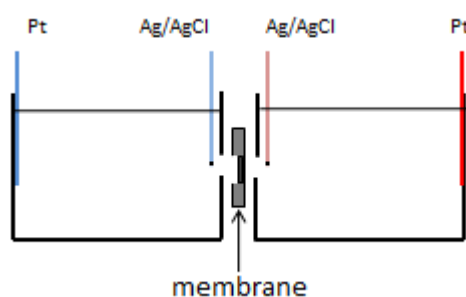


Figure.2 : Schematic of the four electrode measurement cell used for PEIS analysis.

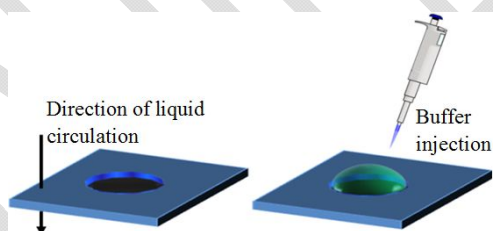


Figure 3: Schematic illustration of direction biomolecules passage through the membrane. A volume of 100µL of buffer was dropped onto the back side of the membrane and the optical observation was made from the other side.

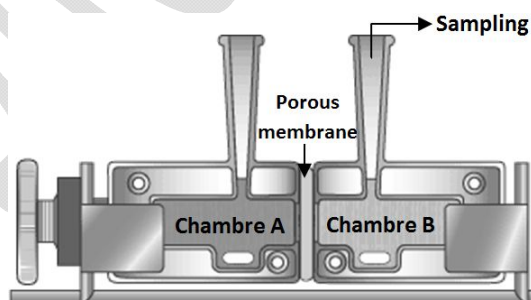


Figure 4 :PermeGear side-by-side cell used for passive diffusion of biomolecules.

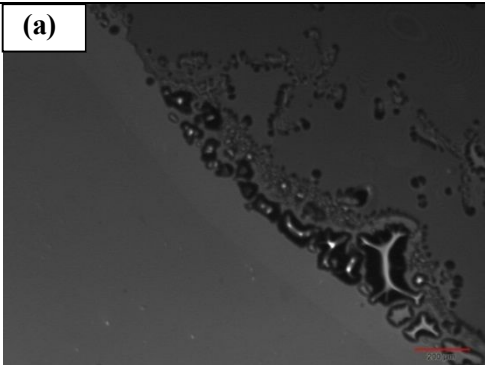

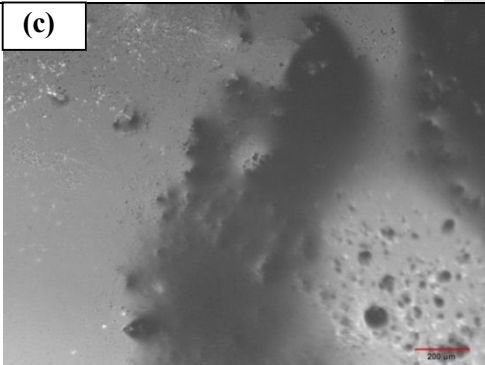
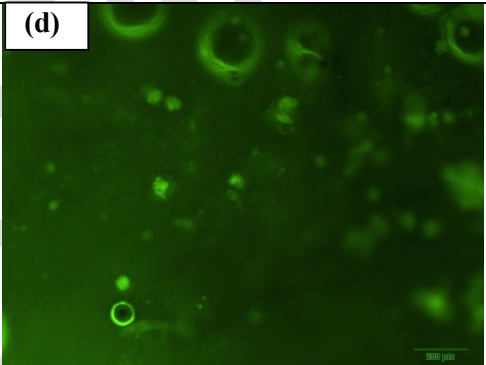
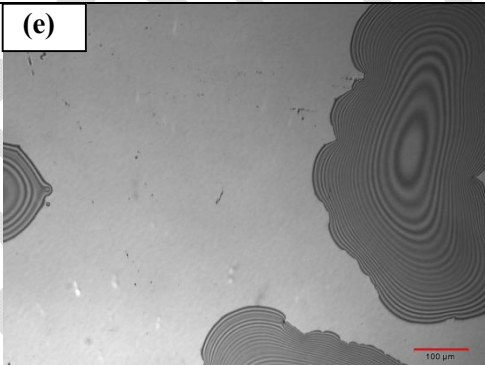
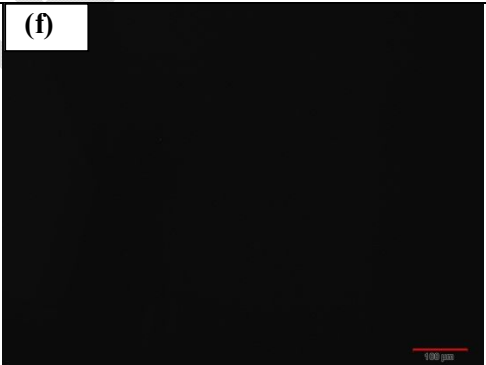
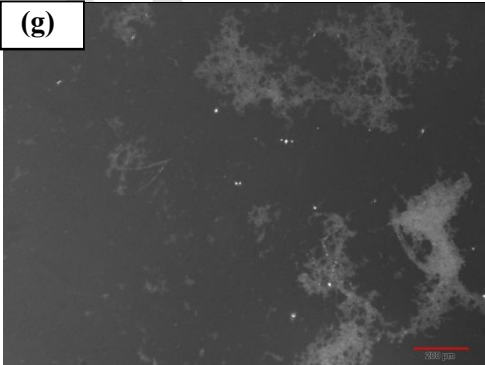
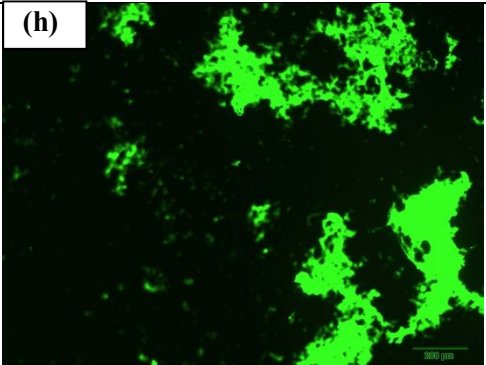
		Wight Light	Green Light
Lipidot 50nm	Front side	(a) 	(b) 
	Back side	(c) 	(d) 
YFP 27kDa	Front side	(e) 	(f) 
	Back side	(g) 	(h) 

Table 1 : Optical fluorescent images of the filtered biomolecules through the pSi.

The table 1 (supplementary file) shows examples of optical fluorescent images after filtering fluorescent biomolecules. The first filtered buffer was made from a mixture of PBS and fluorescein isothiocyanate (FITC) labeled lipid dots of 50 nm (REF from Fabrice Navarro). These weren't able to penetrate through the membrane and have been blocked at the back side of the membrane (Table 1c and d). This was confirmed by the absence of fluorescence in the buffer crossing the membrane (Table 1a and b). The same experience was applied to these membranes using a yellow fluorescent protein YFP which has a cylindrical shape of 4.2 nm long × 2.4 nm diameter. This biomolecules was also filtered by the membrane since no fluorescence was observed on the front side into the past buffer (Table 1e and f). Despite the small size of this biomolecules, it cannot cross the membrane given its geometry can change and be blocked in a certain depth of the membrane. This was due to the soft structure of these biomolecules. In addition, the difference of charges of biomolecules and the charges of the treated membrane surface can promote or prevent the circulation of these biomolecules through the membrane (REF I should find the paper to argue here)

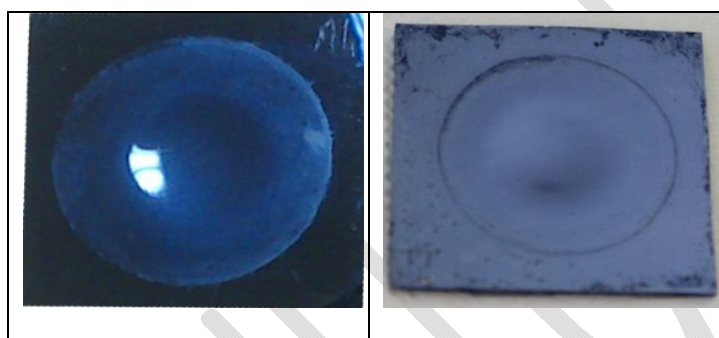
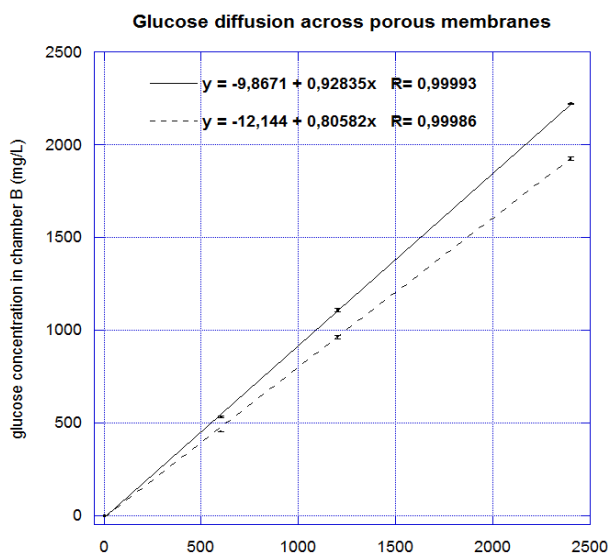


Figure 5: optical images of (a) BSA adsorbed onto RCA oxidized pSi surface, (b) absence of BSA film onto TCS silanised pSi surface.



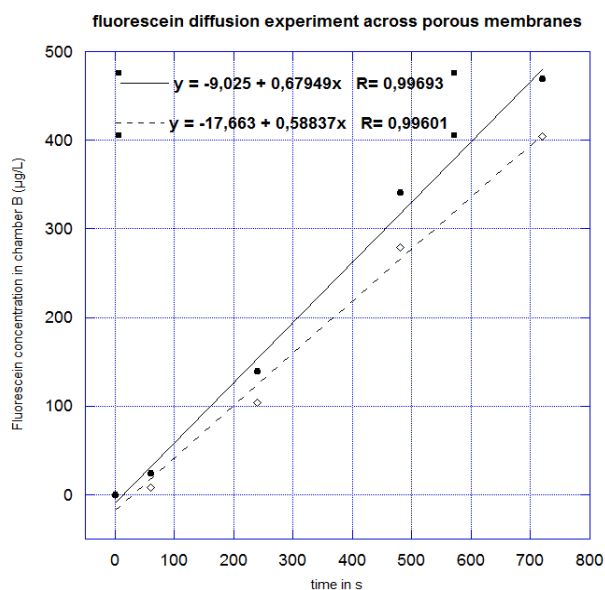


Figure 9 : Glucose (a) and Fluorescein (b) diffusion across TCS treated pSi and 8kDa regenerated cellulose as a function of time. The plain line and dotted lines represent respectively the linear fit of the TCS treated pSi and 8kDa regenerated cellulose.

Present in JP version:

Supplemental data :

BSA:

In the [table 2](#) it is mentioned that this biomolecule penetrates through the membrane. Regarding its size and molecular weight, it is impossible that this molecule penetrates through the membrane when compared to GFP or lysate. In reality, the BSA degrades at room temperature to small fragments of proteins which allows their penetration through a TCS silanised membrane.

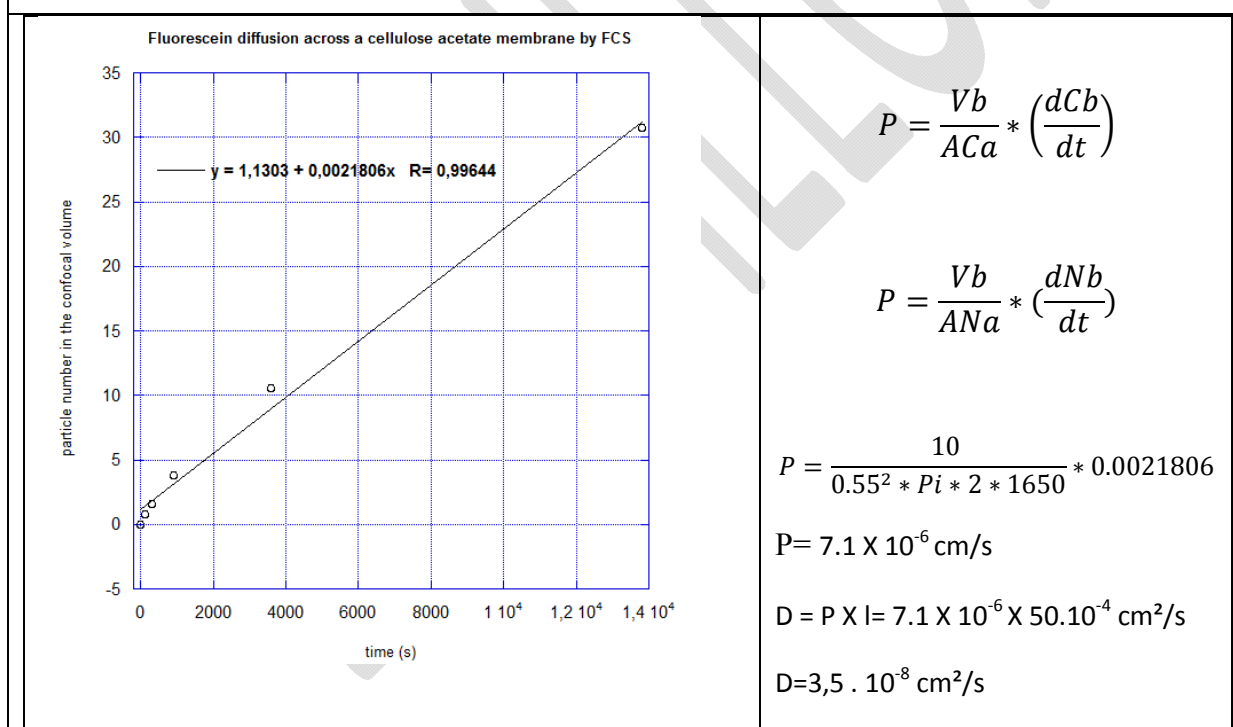
diffusion silicium poreux feuille 948-954-963(prot)					
absorbance@544 (1s) (A)		2h20_25 µl			
0.000					
0,110	0,127	0,144	0,148	0,249	1,199
0,104	0,131	0,149	0,146	0,249	1,077
H20	A4	D9	CA	0.1 g/l	1 g/l
manipe 4					

. For the FITC Dextran, the fluorescence observed on the other side of the membrane is not related to the presence of the dextran, but only for the free fluorescein not attached to dextran. This was confirmed by fluorescence correlation spectroscopy (FCS) made in the second part of the present report.

Diffusion of FITC dextran

An FCS measurement of FITC-Dextran 70S reveals that free FITC was present in the solution. The analysis clearly shows that two types of molecules are present: FITC Dextran 70S (30%) with a characteristic diffusion time of 128 μ s and free FITC (70%) with a characteristic diffusion time of 29 μ s. This clearly shows that the observed fluorescence presented in table 2 is due to free FITC.

Date	Chamber / Position	Time	Number	Count Rate [kHz]	Counts per Molecule [kHz]	Diffusion Time 1 [μ s]	Diffusion Time 2 [μ s]	Particles 1 [%]	Particles 2 [%]	Number Particles	Correlation	Structure Parameter	Triplet Fraction [%]	Triplet Time [μ s]
9/23/2013	A / 2	3:30:35 PM	1	94,841	19,262	29	128	73	27	5,471	1,183	3,8	64	0,79
9/23/2013	A / 2	3:31:06 PM	2	89,351	18,89	29	128	70,2	29,8	5,386	1,186	3,8	60	0,93
9/23/2013	A / 2	3:31:37 PM	3	86,406	18,978	29	128	71,1	28,9	5,191	1,193	3,8	55	1,03
9/23/2013	A / 2	3:32:07 PM	4	83,848	18,969	29	128	68,4	31,6	5,081	1,197	3,8	57	1,02
9/23/2013	A / 2	3:32:37 PM	5	81,365	18,896	29	128	70,8	29,2	4,857	1,206	3,8	62	0,87
	A / 2		6	87,162	19,047	29	128	70,6	29,4	5,189	1,193	3,8	59	0,94



The FCS was also used to find the value of microscopic diffusion coefficient as we directly access the number of particles in the confocal volume of chamber A and B solutions. We found $3.5 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ for diffusion across cellulose acetate membrane. This microscopic diffusion is 2 orders of magnitude higher than the apparent macroscopic diffusion we found with spectrofluorimeter's measurement in the diffusion experiment ($1.07 \times 10^{-10} \pm 0.09 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$).

3.1.3 Membrane de chitosane

3.1.3.1 Biocompatibilité *in vitro*

L'hémodialyse [12] est un bon modèle pour le choix d'un type de membrane filtrante à utiliser dans notre biopile. En effet, ces membranes miment l'action du glomérule du rein et l'hémodialyse demande une qualité de filtration suffisante pour éliminer les petites molécules comme l'urée tout en évitant la fuite des protéines. Le choix d'une membrane d'hémodialyse se fait selon des critères de perméabilité et de biocompatibilité. Les membranes cellulosiques (cuprophane, acétate de cellulose, hémophan, ...) sont petit à petit remplacées par les membranes synthétiques (polyacrylonitrile, AN69, polysulfone, polyamide). Les 2 types de membranes sont cependant utilisés, chaque membrane possédant ses propriétés spécifiques [13]. L'hydrophilie des membranes cellulosiques évite le dépôt des protéines à sa surface, contrairement aux membranes synthétiques hydrophobes qui ont tendance à une forte adsorption de protéines activant les voies de la coagulation. La faible épaisseur des membranes cellulosiques permet d'avoir un fort coefficient de diffusion. L'avantage des membranes synthétiques réside dans le fait qu'elles ont une plus forte perméabilité hydraulique (ce qui diminue le temps de dialyse) et surtout une meilleure compatibilité biologique par des modifications de surface, comme le greffage d'héparine par exemple. Un autre avantage plus spécifique est la fixation de la β -2-microglobuline, une toxine urémique qui avec son poids moléculaire de 12000 Daltons est difficile à filtrer [14].

L'emploi des membranes cellulosiques génère l'activation du complément en induisant la surexpression de molécules d'adhésion à la surface des leucocytes et la production des anaphylatoxines C3a, C4a et C5a, aux effets pro-inflammatoires importants sur toutes les cellules de l'inflammation. Cette activation est moins forte avec l'acétate de cellulose, grâce à la présence des groupements acétyles plus hydrophobes présents sur plusieurs hydroxyles, mais elle existe tout de même et peut être la source de la forte réaction inflammatoire localisée aux alentours de la membrane de dialyse lors de l'autopsie.

Nous avons voulu tester un nouveau type de membrane, issu d'un polymère naturel proche de la cellulose, le chitosane, de plus en plus utilisé dans le domaine biomédical pour ses propriétés physico-chimiques et biologiques. Le chitosane provient de la chitine (constituant principal de la paroi des crustacés) dont il se différencie par son degré de désacétylation (figure 3.8).

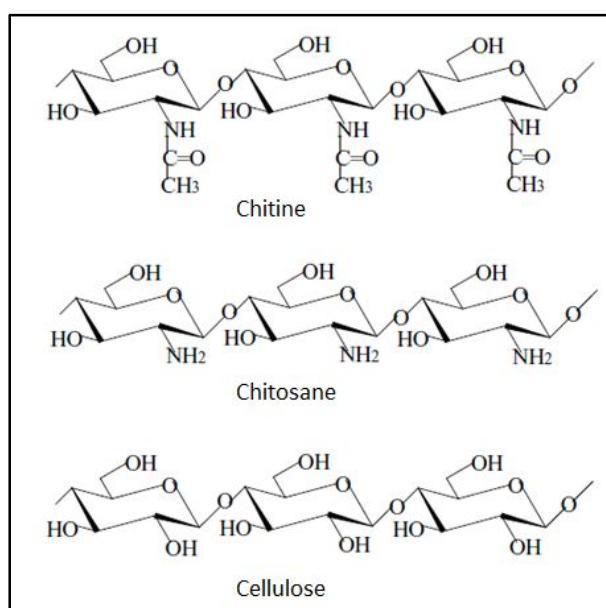


Figure 3.8 : structure de la chitine, du chitosane désacétylé et de la cellulose (d'après [15])

C'est un hétéro-polymère de D-glucosamine et de N-acétyl glucosamine qu'il est facile de modifier pour lui permettre d'acquérir des propriétés nouvelles : on peut par exemple rendre une membrane de chitosane non biodégradable, par réticulation avec de la génipine.

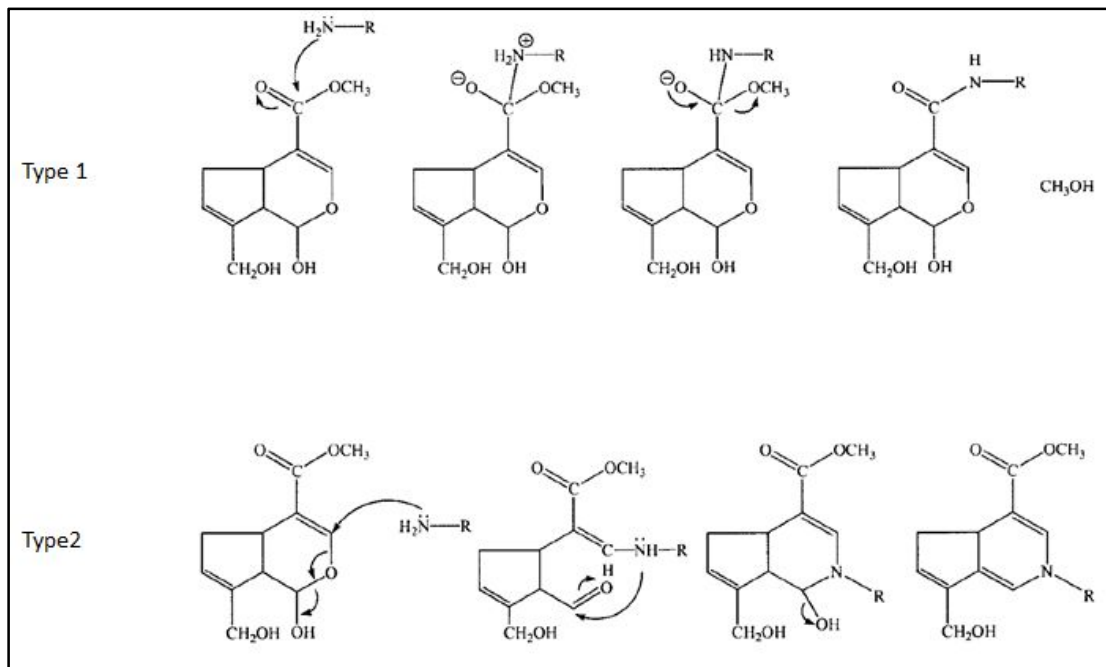


Figure 3.9 : les 2 types de mécanismes de réticulation de la génipine avec les amines primaires du chitosane D'après [16]

Nous avons testé la biocompatibilité de notre membrane face au complément. En effet, Marchand *et al.* ont montré que les protéines plasmatiques venaient adhérer au chitosane par des interactions ioniques via les groupements amines, en particulier C3 et C5, mais sans pour autant déclencher la cascade du complément par clivage de ces facteurs, montrant ainsi que le chitosane n'active pas le complément [17] et qu'il peut être un polymère de choix pour des applications biomédicales.

L'une des techniques de test de la biocompatibilité d'un biomatériau est justement l'utilisation d'un test d'activité du complément [18]–[20]. L'activité du complément est dosée par lyse d'hématies de mouton sensibilisées avec de l'hémolysine, après incubation avec le matériau à tester, dans notre cas différents types de membranes à base de chitosane. Le protocole est décrit en annexe 3.

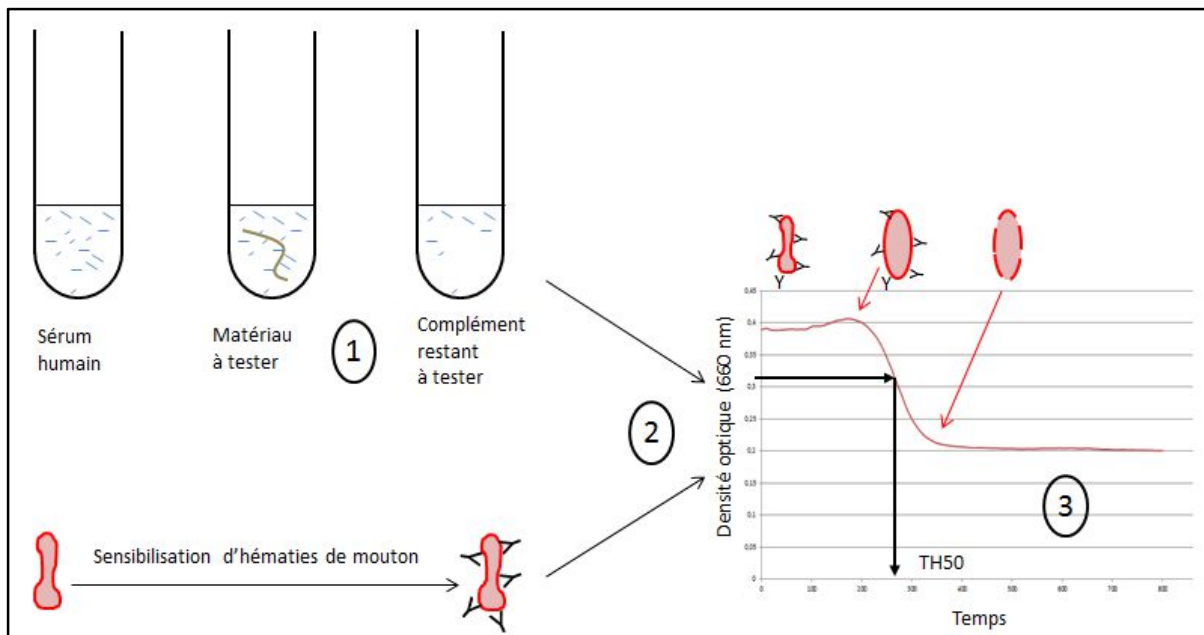


Figure 3.10 : principe du test d'activité du complément.

- 1) Incubation du matériau à tester avec un sérum (qui contient les protéines du complément).
- 2) Mise en contact du sérum avec des hématies sensibilisées.
- 3) Dosage de l'activité restante du complément par turbidimétrie.

Si le matériau est biocompatible, les protéines du complément ne viendront pas s'y fixer et interviendront donc dans la lyse des hématies du test : l'activité résiduelle est alors égale à l'activité totale du complément et aucune diminution de l'activité ne sera observée. La mesure du TH50, correspondant au temps nécessaire pour lyser 50% des érythrocytes sensibilisés, rend compte de cette activité.

En revanche, si le matériau n'est pas biocompatible, les protéines du complément viennent adhérer au matériau, changent de conformation, ce qui initie la cascade d'activation et « consomme » l'activité du complément. Lors du test, la lyse des hématies sera plus faible car des protéines du complément auront déjà réagi et le TH50 sera élevé.

La difficulté de cette technique est la comparaison d'une expérience à l'autre, en raison de la complexité du système mis en jeu (changement d'état physiologique des hématies, la 10^{aine} de protéines impliquées dans le temps de réaction, la variabilité du sérum, ...).

Cependant, la comparaison de l'échantillon avec une gamme étalon réalisée avec des mélanges de complément inactivé par chauffage et de complément actif permet de quantifier la biocompatibilité des membranes. Une courbe d'étalonnage et les courbes caractéristiques de turbidimétrie obtenues dans différentes conditions sont présentées ci-dessous.

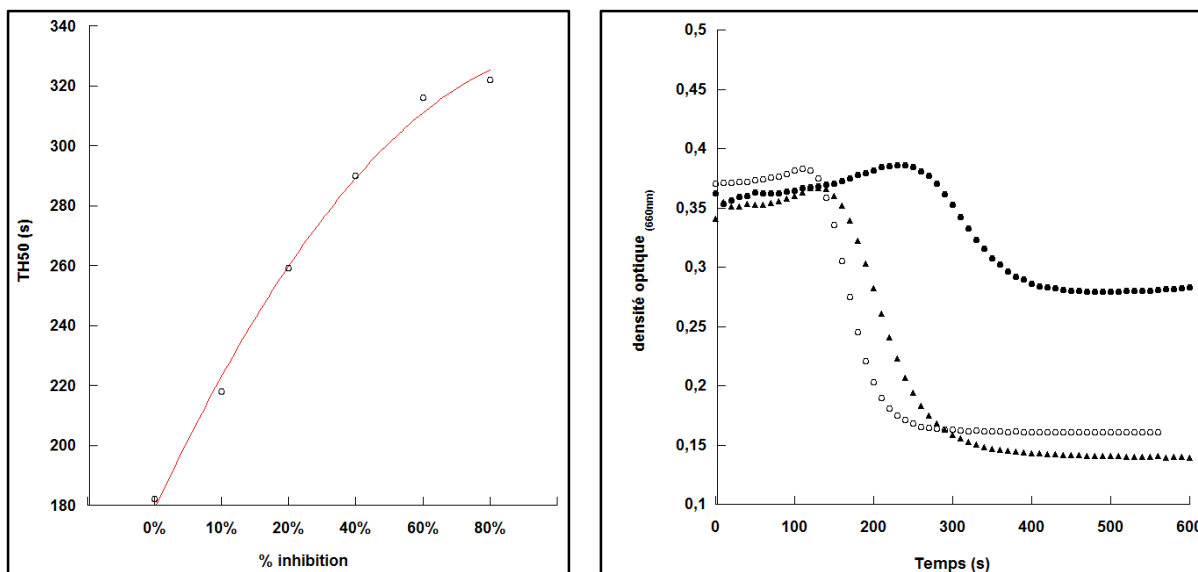


Figure 3.11 : test d'activité du complément avec des membranes de chitosane modifié. A gauche, courbe d'étalonnage (valeur du TH50 en fonction du % d'inhibition du complément). A droite, courbes caractéristiques de lyse des hématies avec du sérum seul (rond vides), du sérum incubé avec une membrane de chitosane réticulé (triangles pleins), avec une membrane de chitosane réticulé contenant de la glucose oxydase.

Des résultats préliminaires *in vitro* montrent peu, voire pas, d'activation du complément sur des membranes de chitosane et des membranes de chitosane réticulées avec de la génipine [16], [21] (moins de 10% avec des expérimentations réalisées au moins en duplicat). Si l'on rajoute, lors de la fabrication de ces membranes, de la glucose oxydase, on déclenche alors une activation importante du complément, équivalente à 80% d'inhibition, montrant que la GOX présente des motifs antigéniques apparents. Cela montre en outre l'importance de la présence d'une membrane biocompatible pour notre biopile et l'intérêt qu'il y aurait à pousser plus loin les investigations dans le cadre d'une expérimentation animale.

Par ailleurs, la littérature décrit le rôle du chitosane dans la stimulation et l'activation des macrophages par les résidus N-acétylés [22] et son effet dans la cicatrisation [23], [24]. L'implantation sous-cutanée de membranes formées de chitosane réticulé avec de la génipine, dont l'effet anti-inflammatoire est connu [25], a montré une parfaite biocompatibilité et la stabilité de telles membranes pendant plus de 20 semaines.

3.1.3.2 Biocompatibilité *in vivo*

Nous avons testé la biocompatibilité ainsi que la biodégradabilité *in vivo* en implantant des films de chitosane réticulé dans 2 treillis en Dacron[®] placés de part et d'autre du quart inférieur de la cavité abdominale d'un rat pendant 100 jours. La fabrication des membranes de chitosane réticulé et leur implantation sont décrits dans la partie matériel et méthode de la publication « Biocompatible Implantable Biofuel Cell » présentée en annexe 4.

Le treillis de Dacron permet une localisation aisée de l'implant lors de l'explantation sans créer de barrière physique importante entre les membranes de chitosane et l'organisme. Les 2 treillis en Dacron se sont bien intégrés : l'implant droit est venu adhérer fortement aux tissus musculaires, l'implant gauche est recouvert de tissu adipeux.

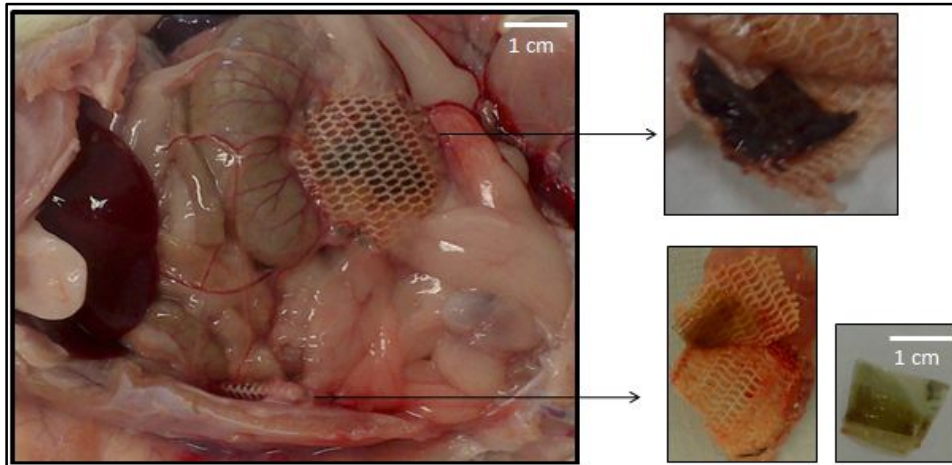


Figure 3.12 : explantation des membranes de chitosane implantées en intra-abdominal chez le rat pendant 100 jours

Au niveau histologique, un tissu mésenchymateux est venu coloniser le treillis avec encore par endroits une réaction inflammatoire histiocytaire. L'un des films était hémorragique et quelques histiocytes sont présents mais aucun des 2 films n'était dégradé. L'histologie des membranes n'a pas montré de cellules adhérentes après 100 jours d'implantation.

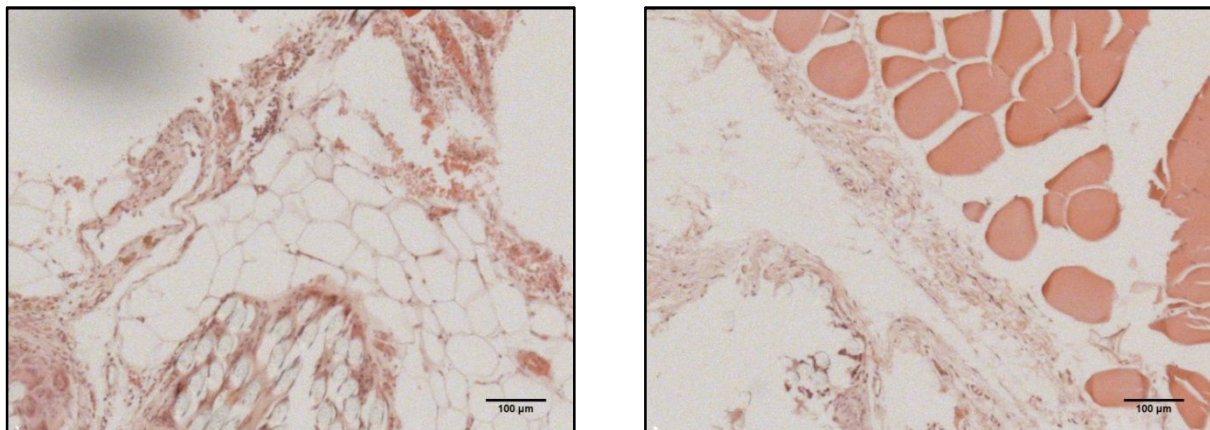


Figure 3.13 : Analyse microscopique des régions adhérentes au Dacron® après 100 jours d'implantation. A gauche, le treillis de l'implant gauche est recouvert de tissu adipeux. A droite, adhérences à la paroi abdominale de l'implant droit.

L'utilisation d'une membrane de chitosane permet de résoudre efficacement les problèmes liés à l'hydratation des bioélectrodes par rapport à l'acétate de cellulose. Sa finesse (10 à 15 μ m) et son hydrophilie permettent un mouillage rapide de la bioélectrode. De plus, sa mise en œuvre est simple comparée au remplissage sous atmosphère stérile de la capsule.

3.2 Stérilisation des implants

3.2.1 Introduction

La stérilisation de l'implant est nécessaire pour éviter une infection qui peut être la source d'une éventration (supuration de la plaie) voire d'une septicémie. Une infection peut interférer avec la production de collagène et la formation de réticulation de lysine et diminue la qualité de la cicatrisation. Un des implants analysés après autopsie a montré une infection bactérienne massive au niveau du sac de dialyse avec la présence sur les frottis analysés de nombreux bacilles au milieu de débris cellulaires et d'histiocytes. L'analyse bactériologique a révélé la présence de *Paenibacillus thiaminolyticus*. L'emploi d'un antibiotique s'est avéré compliqué dans notre cas particulier, car il fallait trouver une compatibilité entre un antibiotique de spectre suffisamment large, utilisable chez le rat, et qui ne nuise pas au bon fonctionnement de la biopile. En effet, la plupart des antibiotiques peuvent être considérés comme des médiateurs électrochimiques et interagissent avec les électrodes en modifiant leur potentiel. De plus, nous n'étions pas à l'abri d'une contamination par un germe sporulant (ce qui était le cas de *P.thiaminolyticus*) ou d'une levure, insensibles aux antibiotiques. Nous avons donc cherché à stériliser la biopile avant son implantation.

Il est toujours difficile de choisir « la » méthode de stérilisation des dispositifs médicaux : chaque méthode a ces avantages et ses inconvénients. Pour notre application, l'autoclavage est proscrit car les enzymes sont dénaturées par la chaleur. Deux types de stérilisation à froid sont disponibles pour les dispositifs médicaux : celle utilisant le peroxyde d'hydrogène sous vide d'air (type V-PRO) et l'ionisation par des faisceaux d'électrons, de rayons X ou gamma. La stérilisation basse température au peroxyde d'hydrogène est un procédé couramment utilisé en stérilisation centrale des hôpitaux pour les dispositifs médicaux implantables. Il remplace petit à petit la stérilisation à l'oxyde d'éthylène dont l'inconvénient majeur est une désorption nécessaire de 4 jours des dispositifs exposés. Ce temps est nécessaire pour éliminer les résidus toxiques générés par l'oxyde d'éthylène et rend difficile la gestion des stocks de dispositifs médicaux stériles. La stérilisation à l' H_2O_2 est particulièrement bien adaptée au système électronique de surveillance de notre biopile. Le cycle de stérilisation est rapide (20 min.) et comprend des phases de vide partiel et d'injection d'un plasma d' H_2O_2 à une température d'environ 50°C. Ce procédé n'est pas, par contre, adapté pour notre biopile. En effet, la tenue mécanique de la pastille souffre du vide partiel et les enzymes sont presque totalement inactivées par la dose d'agent oxydant.

3.2.2 Utilisation des rayonnements ionisants

La stérilisation par rayons ionisants (RI) peut se faire via un faisceau d'électrons d'énergie inférieure à 10 MeV ou de sources radioactives produisant des rayons gamma ou des rayons X d'énergie inférieure à 5 MeV pour proscrire l'activation radioactive du matériel stérilisé. On parle alors d'ionisation.

Les faisceaux d'électrons présentent des avantages comme la facilité d'utilisation dans une ligne de production ou la délivrance de la dose de façon quasi-instantanée. Outre l'ionisation de produits alimentaires, ce procédé est également utilisé pour la stérilisation de certains dispositifs médicaux pour des échantillons fins selon les normes ISO 11137 et EN 552 [27], [28]. L'ionisation n'est pas récente dans le domaine médical car elle a permis la stérilisation des premiers pansements commercialisés par Johnson & Johnson dès 1924, les sutures en 1957, et plus classiquement en laboratoire de nos jours les gants, seringues, boîtes de Pétri et autres tubes.

L'utilisation d'une source radioactive de rayonnement gamma permet de s'affranchir du problème de pénétration du rayonnement dans la matière (pour les matériaux denses ou hétérogènes) et les débits de dose de l'ordre du KGy/h sont plus adaptés à une étude du phénomène. La source que nous avons utilisée au CEA-ARC Nucleart est le ^{60}Co , fabriqué dans un réacteur nucléaire par collision neutronique avec du ^{59}Co . Sa demi-vie est d'environ 5 ans, ce qui permet de gérer relativement facilement les sources. Il émet lors de sa désintégration 2 γ de 1,17 et 1,33 MeV pour donner un noyau stable de ^{60}Ni . Ces photons de haute énergie interagissent avec la matière en ionisant les noyaux des atomes qu'ils rencontrent et en éjectant un électron : c'est le phénomène d'ionisation. Les radicaux formés permettent de casser les liaisons chimiques ou d'en former de nouvelles.

L'unité internationale de mesure de dose absorbée est le Gray (Gy), qui correspond à la quantité d'énergie absorbée par unité de masse (en J/Kg). Les doses appliquées sont variables selon d'effet que l'on veut obtenir : détruire les microorganismes pathogènes, de réduire le nombre de microorganismes totaux, permettre une plus longue conservation d'un produit alimentaire, etc... Il y a encore quelques années, une dose minimale de routine de 25 KGy à 50 kGy était utilisée pour stériliser les dispositifs médicaux. A l'heure actuelle, selon les recommandations de l'organisation internationale pour la standardisation (normes ISO), la dose de radiation est à définir pour chaque type de produit en fonction de sa biomasse naturelle, la valeur de D10 moyenne des différents microorganismes présents (dose en KGy nécessaire pour réduire la quantité d'un microorganisme d'un facteur 10), et le degré de stérilité voulu. Par exemple l'exigence du niveau d'assurance de stérilité (NAS ou SAL en anglais) est moindre pour des gants stériles (NAS : 10^{-3}) que pour un produit pharmaceutique injecté ou un collyre (NAS : 10^{-6}).

3.2.3 Effets des rayonnements ionisants sur la matière

3.2.3.1 Effets des rayonnements ionisants sur les molécules du vivant et les micro-organismes

3.2.3.1.1 Effets sur l'eau

Les micro-organismes sont constitués d'eau (50 à 70%) [29], d'acides nucléiques, de protéines, de lipides et de sucres. Les effets des rayonnements ionisants sur l'eau sont loin d'être négligeables, bien au contraire. Les rayons gamma interagissent avec l'eau et génèrent en quelques nanosecondes des espèces réactives de l'oxygène, le radical hydroxyle $\cdot\text{OH}$, de l'eau ionisée H_2O^+ mais également le radical $\text{H}\cdot$ et des électrons solvatés (e_{aq}^-). Dans un second temps (de l'ordre de 1 ps) [30], sont formés l'ion superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$ et l'eau oxygénée H_2O_2 . Ces radicaux vont pouvoir interagir en cascade (par exemple en activant les espèces réactives de l'azote) sur les différentes macromolécules constituant le vivant. La radiolyse de l'eau amplifie donc localement mais de manière très importante les phénomènes directs des rayonnements ionisants.

3.2.3.1.2 Effets sur les lipides

Les lipides sont les constituants les plus sensibles à l'action des rayonnements ionisants. Les modifications engendrées sont essentiellement la peroxydation des acides gras poly-insaturés et leur fragmentation, ce qui mène à une perméabilité membranaire accrue : la membrane perd sa capacité à réguler l'équilibre osmotique, l'eau entre dans la cellule qui gonfle et éclate.

3.2.3.1.3 Effets sur l'ADN

L'effet sur l'ADN est le plus étudié : quelques Grays suffisent à provoquer directement des délétions de bases, des modifications sur les bases azotées, des ponts intra- ou inter-brins ou des cassures simple brins [31]. L'accumulation de ces lésions radio-induites sur une même

région chromosomique (cluster) mène à des cassures double-brins non réparables et à la mort cellulaire. Les cassures double brins directes sont surtout générées par des particules massives (neutrons ou particules alpha), ce n'est pas notre cas. On estime qu'une irradiation d'1 Gy sur une cellule provoque 1000 coupures simple brin, 40 coupures double brin, 150 liaisons ADN-protéines et 250 oxydations de la thymine [32], [33]. Ces nombres sont à comparer avec les lésions spontanées qui ont lieu au cours de la vie de la cellule :

<i>Dommmage ADN</i>	<i>Lésions spontanées /cellule/jours</i>	<i>Lésions radio-induites /cellules/Gy</i>
Cassures simple brin	10 000 à 55 000	1000
Perte de base	12 600	Non évaluée
Dommmage de base	3 200	2 000
Cassure double brin	8	40
pont ADN-ADN	8	30
pont ADN-protéine	quelques	150
sites multilésés	Non évalué	Quelques

Figure 3.14 : effets des rayonnements ionisants sur l'ADN.

On voit que la somme des lésions radio-induites est en fait assez proche de la quantité de lésions qui arrivent spontanément dans la cellule, qui possède un système de réparation extrêmement efficace. De plus, ces effets tiennent compte de la radiolyse de l'eau et l'ADN sous forme déshydratée est aussi peu sensible que les sucres et les protéines. En effet, on a pu réaliser des études de filiation à partir d'ADN ancien sur des momies inuit ayant subi une dose de 20 à 30 kGy. Les effets des différents accidents générés par les rayonnements ionisants sont alors négligeables par rapport aux effets du temps.

3.2.3.1.4 Effets sur les protéines

Concernant la radiosensibilité des protéines, une expérience menée en 1970 sur la radiosensibilité relative du noyau et du cytoplasme de fibroblastes de Hamster chinois montre qu'une mortalité de 50% est induite par une dose de 1 à 3 Gy sur le noyau contre une dose au moins 100 fois plus forte sur le cytoplasme (de 200 à 500Gy) [34]. Cependant, les dommages causés par les RI à faible dose sont bien réels [35]: ils modifient le protéome cellulaire et la transduction du signal par des protéines est affectée pour des doses inférieures à 1Gy. Autre exemple dans le domaine médical, des doses de 25 à 45 Gy permettent d'inactiver les lymphocytes T d'une poche de sang en évitant ainsi la réaction de GVH (greffon contre l'hôte) lors de certaines transfusions.

Les principaux effets sur les acides aminés sont les réactions d'oxydation et de carbonylation d'acides aminés, typiquement la cystéine et la méthionine, la fixation de lipides peroxydés, et la fragmentation des chaînes polypeptidiques au niveau des liaisons amide, mais la plupart des études sur la qualité des denrées alimentaires irradiées ne montrent que peu d'effets sur les acides aminés à des doses jusqu'à 70kGy. En fait, les principales modifications concernent la structure tertiaire et quaternaire des protéines car c'est la fonctionnalité des protéines qui est mise à mal, surtout en solution. Les liaisons de tout type (ioniques, hydrophobes, hydrogène ou de Van der Waals) sont déstabilisées, voire rompues.

On trouve dans la littérature récente peu d'exemples sur le comportement des enzymes vis-à-vis des rayonnements ionisants. La catalase, que l'on utilise à l'anode, a fait l'objet de recherches concernant la cinétique de décomposition du peroxyde d'hydrogène et l'influence de la dose et du flux de rayons gamma sur des solutions diluées [36]. La raison de l'étude de cette protéine est liée à sa participation à la résistance au stress oxydant, notamment en cas d'irradiation. Cette enzyme a en effet une très faible affinité pour son substrat (K_m de 93mM), par contre la vitesse de réaction est souvent exceptionnelle ($V_{max} = 200 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \mu\text{mol.heme}^{-1}.\text{s}^{-1}$). Une étude très complète publiée en 1987 [37] a montré que l'activité catalasique décroît de façon exponentielle ou non avec la dose en absence ou en présence d'oxygène. L'oxygène joue en effet un double rôle : il protège l'enzyme en captant les e_{aq}^- et les H^\bullet , responsable de la destruction du tétramère, mais l'attaque en générant des $^\bullet\text{OH}$, qui n'inactivent que partiellement l'enzyme. Ce comportement explique également le phénomène de « récupération » de l'activité lorsque l'enzyme est placée à 4 °C après son ionisation.

Pour connaître le comportement des enzymes utilisées dans la biopile et tester leur résistance au rayonnement gamma, nous avons ionisé des solutions de glucose oxydase, de laccase et de catalase et nous avons testé leur activité résiduelle.

Nous avons pu confirmer que la concentration de l'enzyme était un facteur important de résistance aux rayonnements en comparant nos résultats présentés figure 3.15 avec ceux de Gebicka *et al.* A forte concentration, on arrive à conserver plus de 50 % de l'activité de la catalase.

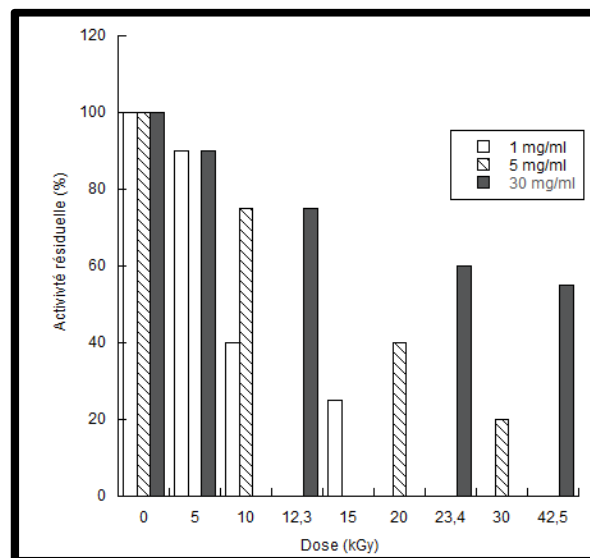


Figure 3.15 : influence de la concentration en catalase sur son activité résiduelle suite à son irradiation γ . Nos résultats (30 mg/mL, gris foncé) sont comparés aux résultats obtenus par Geblicka et al (1 mg/mL blanc et 5 mg/mL hachuré).

L'ionisation des enzymes utilisées dans la biopile a également été testée. Les résultats sont présentés figure 3.16. On peut voir que la glucose oxydase et la laccase sont beaucoup plus sensibles aux radiations que la catalase. Pour une même concentration, la perte d'activité est de plus de 50 % dès 5 kGy. Les différences d'activité à faible concentration ne sont pas forcément liées à l'activité spécifique des enzymes. En effet, même si la catalase est 100 fois plus active que la glucose oxydase et montre une meilleure résistance, le phénomène inverse est observé à 23 kGy : alors que la glucose oxydase est 10 fois plus active que la laccase, elle est cependant plus sensible à l'ionisation. A forte dose, l'activité résiduelle est presque nulle pour la glucose oxydase (0,1%) et la laccase (1%).

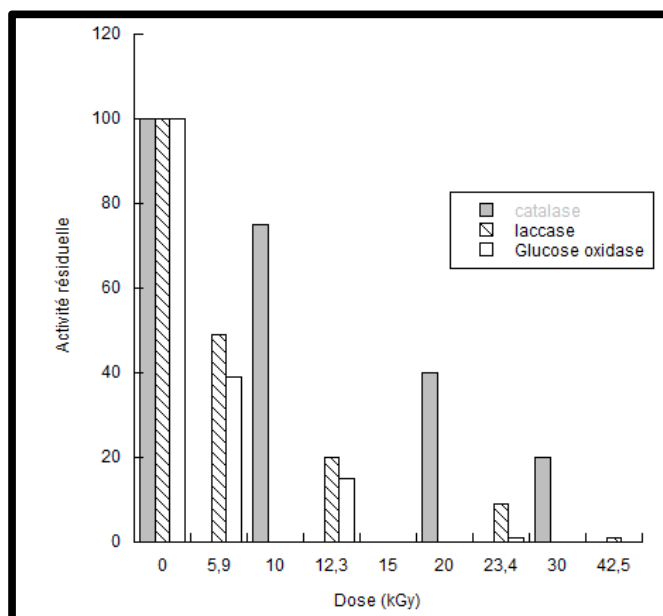


Figure 3.16 : effets de la dose de rayons γ sur l'activité résiduelle des 3 enzymes (5mg/mL) de notre biopile. Glucose oxydase et laccase sont comparés aux résultats obtenus par Gebicka et al pour la catalase.

Cette perte d'activité est corrélée avec un changement conformationnel de ces 2 enzymes que l'on peut suivre par spectrofluorimétrie. En effet, un dépliement ou un remaniement au sein de la protéine se traduit par une modification de l'environnement des tryptophanes que l'on peut suivre par un déplacement des longueurs d'onde d'excitation et d'émission de fluorescence.

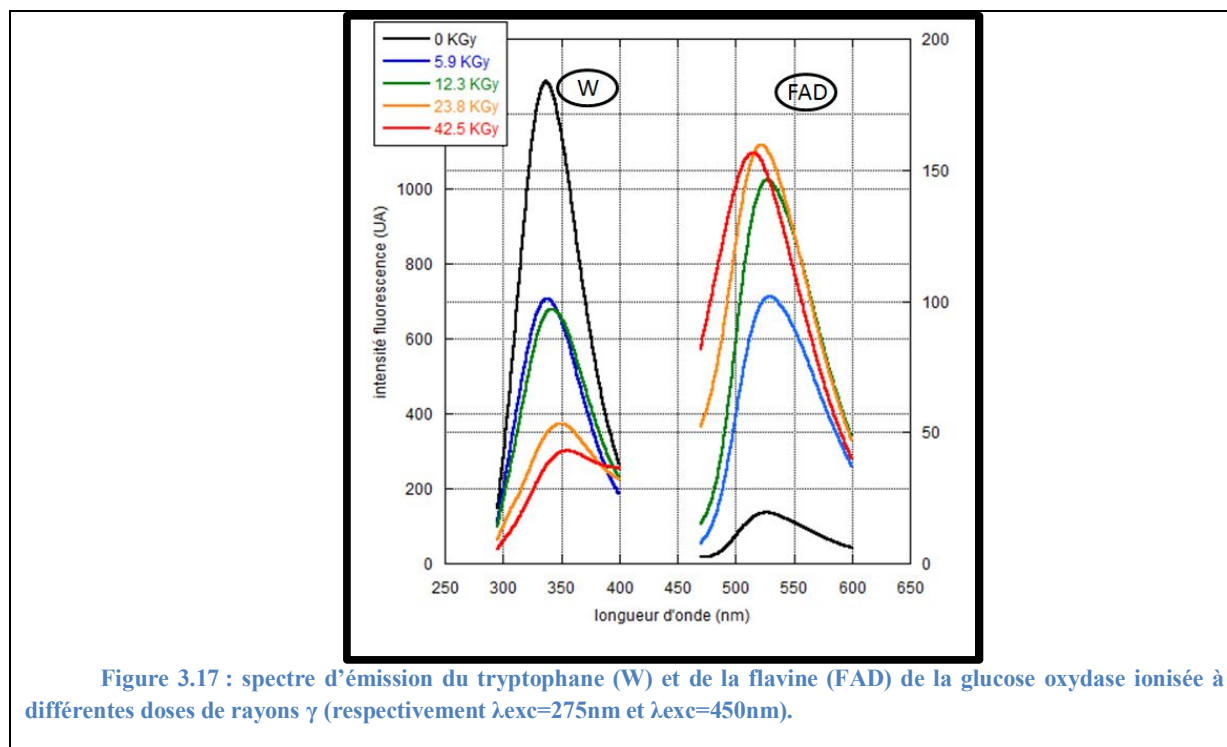


Figure 3.17 : spectre d'émission du tryptophane (W) et de la flavine (FAD) de la glucose oxydase ionisée à différentes doses de rayons γ (respectivement $\lambda_{exc}=275nm$ et $\lambda_{exc}=450nm$).

Ce phénomène est illustré sur la figure 3.17 par les spectres de fluorescence du noyau indole du tryptophane : lorsque la dose de RI augmente, on voit nettement une diminution de

la fluorescence du tryptophane [38] ainsi qu'un déplacement du maximum de fluorescence vers les grandes longueurs d'onde sur le spectre d'émission [39]. Ceci montre que la polarité du solvant entourant les résidus tryptophane augmente : les tryptophanes enfouis au cœur de l'enzyme deviennent exposés au solvant donc plus hydrophiles. Ce phénomène est également visible en observant la fluorescence du cofacteur FAD de l'enzyme [40] : le changement de conformation de l'enzyme modifie le microenvironnement du FAD que l'on observe sur le spectre par un déplacement de longueur d'onde et une intensité de fluorescence plus importante. Nous n'avons pas poussé plus loin les investigations pour savoir si le FAD était totalement libéré du site actif de l'enzyme.

Le même résultat est obtenu avec la laccase ionisée : le changement de fluorescence du tryptophane est visible à la fois en émission et sur l'harmonique d'excitation apparaissant à 550 nm, comme illustré dans les courbes de la figure 3.18 :

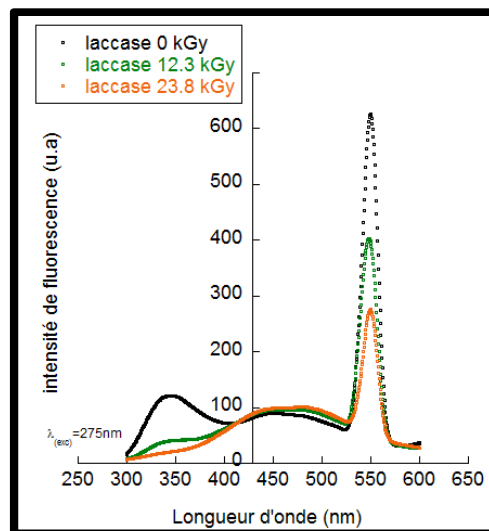


Figure 3.18 : émission de fluorescence des résidus tryptophane de l'enzyme laccase en fonction de la dose d'ionisation de la protéine en solution.

L'effet indirect de la radiolyse de l'eau lors de l'irradiation de protéines n'est pas toujours néfaste dans les applications biomédicales. A titre d'exemple, l'irradiation du collagène dans un état sec favorise les cassures des chaînes polypeptidiques par une action directe des rayons ionisants. En revanche, lorsqu'il est dans un état hydraté sous forme d'hydrogel, les fibres du collagène [41] subissent des réactions de réticulation qui lui donnent des propriétés intéressantes pour son utilisation comme biomatériau stable et biocompatible. La radio-stérilisation de protéines est également utilisée pour stériliser la salive [42] sans plus de dégradation que la filtration, ou de l'insuline en solution [43] en utilisant la congélation et des radioprotectants.

3.2.3.1.5 Effets sur les sucres complexes

En ce qui concerne les sucres, le rayonnement ionisant est connu pour dépolymériser les chaînes polysaccharidiques des sucres complexes comme l'amidon, la cellulose ou les β -glucanes de paroi de micro-champignons à des doses supérieures à 10kGy. L'acétate de cellulose, contrairement à la cellulose, supporte des doses de radiations fortes jusqu'à 20 kGy. Le phénomène de dégradation entre également en ligne de compte pour le chitosane utilisé dans la composition des électrodes. Des études menées sur la dépolymérisation radio-induite du chitosane ont montré que parmi les facteurs influençant la dégradation, le poids moléculaire initial, et l'état d'hydratation étaient les plus importants à considérer. Plus le poids moléculaire est important, plus le chitosane est résistant à la dégradation par les

rayonnements ionisants à des doses très fortes de 250 kGy [26]. En milieu aqueux, pour un chitosane de haut poids moléculaire (moyenne de 471 g/mol) et le moins acétylé (DD 70%), une dose de 2 kGy suffit à la dépolymérisation de la moitié des chaînes alors qu'une dose de 150 kGy est nécessaire pour obtenir le même résultat avec du chitosane à l'état solide.

3.2.3.1.6 Effets sur les micro-organismes

Ainsi, les effets directs et indirects sur les différentes classes de macromolécules constituant le vivant vont agir de concert pour induire la mort cellulaire des micro-organismes. Il faut également tenir compte de différents paramètres influant la radiosensibilité : nature des micro-organismes à détruire, température, humidité, présence d'oxygène,... En règle générale, plus l'organisme est « primaire », plus il est résistant aux rayonnements ionisants : Alors qu'il suffit de 3 à 10 Gy pour tuer des fibroblastes, la dose létale est de 5 à 10 kGy [27] pour la majorité des bactéries et microchampignons. Certains organismes, comme *Deinococcus radiodurans*, résistent même à des doses de 8 kGy en phase exponentielle et jusqu'à 12 kGy en phase stationnaire, grâce à des mécanismes très efficaces de réparation de l'ADN et une tolérance accrue au stress oxydant.

Nous avons réalisé un test de stérilisation de nos bioélectrodes en utilisant des spores de *Geobacillus stearothermophilus* pour déterminer la dose à laquelle on élimine un inoculum d'un million de spores. Sans vouloir réaliser une étude exhaustive pour le développement d'une application directement commercialisable, qui devrait prendre en compte toute une série de mesures décrites dans la norme 11137, l'utilisation d'un germe sporulant permet de se placer dans des conditions relativement strictes. En effet, les spores de bactéries contiennent moins d'eau (10-15%) que les formes végétatives (80%), on diminue donc les effets indirects des radiations et ce type de bactéries a toutes les chances de mieux résister aux rayonnements ionisants, en particulier les bactéries à Gram positif.

Les résultats obtenus nous montrent que 12,3 kGy sont suffisants pour réduire de 5 log la quantité de spores de *Geobacillus stearothermophilus* ensemencés sur le dispositif médical. La valeur de la D10 est de 2,4 kGy, en accord avec les valeurs trouvées dans la littérature [44] pour d'autres bacilles gram positif.

Dose (kGy)	nb de colonies
0	$2 * 10^5$
6	600 +/- 80
12	0
24	0
42	0

Figure 3.19 : test de stérilisation de pastilles inoculées avec *Geobacillus stearothermophilus*

La qualité de la stérilisation va donc dépendre de nombreux facteurs et un compromis doit être trouvé pour répondre au mieux non seulement aux exigences de stérilité mais également aux exigences de fonctionnement des bioélectrodes, comme nous l'avons vu pour les enzymes et le chitosane.

3.2.3.2 Effets des rayonnements ionisants sur les polymères et dispositifs électroniques

La tolérance aux rayonnements ionisants des matériaux synthétiques utilisés dans la fabrication de la biopile est aussi à prendre en compte. En effet, les matériaux plastiques

utilisés dans les applications médicales ne sont pas tous compatibles avec ce type de stérilisation [27], [28].

La présence de cycles ou de structures en anneau dans les polymères a tendance à les rendre neutres vis-à-vis des rayonnements ionisants, car les radiations sont en quelque sorte absorbées et résonnent avec la structure du cycle lui-même. C'est le cas du polystyrène, du polyéther téréphtalate (PET) et du silicone.

Certains polymères sont dégradés par coupure des chaînes à plus ou moins fortes doses : le polycarbonate est d'ailleurs utilisé dans la fabrication des dosimètres car l'ionisation produit un changement de couleur du matériau [45]. On peut jouer sur l'environnement lors de l'ionisation pour diminuer ces effets. Par exemple, pour le polyéthylène haute densité (PEHD) ou le polypropylène (PP), l'absence d'oxygène le rend résistant aux rayonnements ionisants. De nouvelles liaisons apparaissent et le matériau est plus réticulé. C'est aussi le cas des colles à base d'acrylique ou des hydrogels de PVA ou de PEG recouvrant du polyéthylène pour des applications de type pansements [46], [47]. Ces réticulations sont préférentielles avec des doses faibles. Généralement scissions et réticulations de chaîne sont deux phénomènes qui apparaissent conjointement lors de l'ionisation et modifient les propriétés du polymère.

Les rayonnements ionisants n'ont pas d'effets délétères sur les métaux mais ils interagissent en revanche avec les dispositifs électroniques, notamment les semi-conducteurs, par passage d'électrons dans la bande de conduction. Ceci perturbe le réseau cristallin du matériau, génère du bruit électronique, peut provoquer des erreurs et même détériorer physiquement le matériau si la dose est suffisante [48], aussi basse que 50 à 100 Gy. On comprend aisément qu'un système électronique de monitoring ayant une multitude de transistors, et d'autres composants en silicium pourrait cesser de fonctionner rapidement s'il était soumis à ce type de stérilisation. Des techniques de durcissement [49] sont appliquées pour augmenter la résistance des composants classiques utilisés dans le domaine spatial mais restent spécifiques et onéreux.

La complexité de la nature des différents composants de notre biopile (métaux, silicone, liants, nanotubes de carbone, enzymes, médiateurs chimiques et membrane filtrante) et sa structure en pastille ont plaidé pour l'utilisation des rayonnements ionisants pour sa stérilisation.

3.2.4. Effets des rayonnements ionisants sur la biopile enzymatique

Pour notre biopile, autant l'effet des rayonnements ionisants sur l'activité des enzymes en solution est dramatique, autant cet effet est moindre sur les enzymes immobilisées. Une étude comparative de différentes méthodes de stérilisation de glucose oxydase immobilisée sur une aiguille et protégée par une membrane de polyuréthane constituant un biocapteur implantable montre que l'ionisation est la méthode la moins destructive [50] : l'enzyme conserve son activité à une dose de 25 kGy. La perte d'activité atteint 30% à 30 kGy, et les auteurs relient plus cette perte à une perméabilisation des couches de polyuréthane protégeant l'électrode.

La mesure du courant de biocathodes ionisées ou non a été réalisée par chronoampérométrie. L'application d'un potentiel entre la bioélectrode et une électrode de platine permet à la laccase immobilisée au sein de la bioélectrode de réduire l'oxygène en eau, générant ainsi un courant négatif. Cette mesure peut donc être assimilée à une activité. Sur le graphique présenté figure 3.20, on peut constater une baisse de l'activité résiduelle de biocathodes ionisées. Cette baisse est de l'ordre de 30% pour une dose moyenne (12 kGy) ou

forte (42 kGy). Plusieurs hypothèses se cumulent pour expliquer ce résultat : l'hypothèse la plus probable est que la pastille est sèche. En effet, l'ionisation de la pastille en milieu aqueux montre une baisse d'activité de 80%, laissant une activité résiduelle de 20 % lors d'une ionisation à 42 kGy. Or, à cette dose, la laccase en solution n'a plus que 1% de son activité. Tout se passe comme si le microenvironnement de l'enzyme la protégeait du stress oxydatif généré par le rayonnement gamma. Ce phénomène peut être lié à l'action anti-radicalaire des nanotubes de carbone. En effet, il est maintenant connu qu'ils peuvent jouer le rôle de piège à radicaux libres et diminuer les effets des rayonnements ionisants de façon importante [51]–[53].

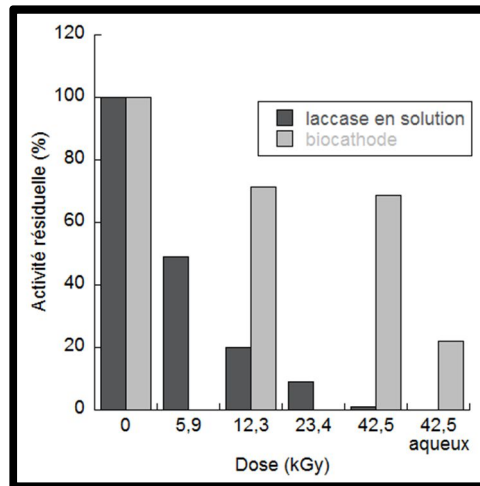


Figure 3.20 : activité résiduelle de la laccase en solution ou immobilisée dans la biocathode en fonction de la dose de rayonnements ionisants.

Nous avons considéré que cette baisse d'activité de 30% était toutefois raisonnable pour envisager la stérilisation par rayonnement ionisant comme une méthode de choix.

3.3 Conclusion du chapitre 3

Dans ce chapitre, nous avons cherché des alternatives au sac de dialyse utilisé comme membrane filtrante. Nous avons réalisé la conception d'une capsule polyamide/acétate de cellulose implantable et testé son efficacité *in vitro* et *in vivo*. Nous nous sommes intéressés à deux nouveaux types de membrane :

- nous avons caractérisé la diffusion au travers une membrane en silicium nanoporeux dont la silanisation a permis la stabilisation dans un tampon physiologique sur une longue période de temps.
- nous avons testé la biocompatibilité *in vitro* et *in vivo* d'une membrane de chitosane réticulé avec de la génipine.

Au vu des résultats obtenus, nous avons poussé nos investigations vers le remplacement du sac de dialyse par une membrane de chitosane.

Enfin, nous avons élaboré une méthode de stérilisation des biopiles par rayonnement γ . Ces résultats ont été publiés dans la revue médecine/sciences. La publication « la biopile enzymatique à glucose/oxygène : quelques nuances de grays... » se trouve en annexe 4.

Cet ensemble de résultats a permis l'implantation d'une troisième génération de biopile chez le rat.

3.4 Références du chapitre 3

- [1] H. Wang, Y. Li, Y. Zuo, J. Li, S. Ma, & L. Cheng, « Biocompatibility and osteogenesis of biomimetic nano-hydroxyapatite/polyamide composite scaffolds for bone tissue engineering », *Biomaterials*, vol. 28, n° 22, p. 3338–3348, 2007.
- [2] C. Marotta, M. Williams, N. Laput, « [Hard_to_Bond_Plastics756739.pdf](#) », Henkel Adhesives, 2000.
- [3] E. J. Anglin, L. Cheng, W. R. Freeman, & M. J. Sailor, « Porous silicon in drug delivery devices and materials », *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 60, n° 11, p. 1266–1277, 2008.
- [4] R. Jugdaohsingh, « Silicon and bone health », *J. Nutr. Health Aging*, vol. 11, n° 2, p. 99, 2007.
- [5] S. H. C. Anderson, H. Elliott, D. J. Wallis, L. T. Canham, & J. J. Powell, « Dissolution of different forms of partially porous silicon wafers under simulated physiological conditions », *Phys. Status Solidi A*, vol. 197, n° 2, p. 331–335, 2003.
- [6] L. Canham & D. Ferguson, « Porous silicon in brachytherapy », in *Handbook of Porous Silicon*, Springer ISBN 978-3-319-05744-6, 2014, p. 901–907.
- [7] L. Cheng, E. Anglin, F. Cunin, D. Kim, M. J. Sailor, I. Falkenstein, A. Tammewar, & W. R. Freeman, « Intravitreal properties of porous silicon photonic crystals: a potential self-reporting intraocular drug-delivery vehicle », *Br. J. Ophthalmol.*, vol. 92, n° 5, p. 705–711, 2008.
- [8] P. Harder, M. Grunze, R. Dahint, G. M. Whitesides, & P. E. Laibinis, « Molecular conformation in oligo (ethylene glycol)-terminated self-assembled monolayers on gold and silver surfaces determines their ability to resist protein adsorption », *J. Phys. Chem. B*, vol. 102, n° 2, p. 426–436, 1998.
- [9] M. Morra, « On the molecular basis of fouling resistance », *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 11, n° 6, p. 547–569, 2000.
- [10] P.R. Garay, R. El-Gewely, J.K. Armstrong, G. Garratty, & P. Richette, « Antibodies against polyethylene glycol in healthy subjects and in patients treated with PEG-conjugated agents. » *Expert opinion on drug delivery*, vol. 9, n° 11, p.1319-1323, 2012.
- [11] C. Lubich, P. Allacher, M. de la Rosa, A. Bauer, T. Prenninger, F.M. Horling, ... & B.M. Reipert, « The Mystery of Antibodies Against Polyethylene Glycol (PEG)-What do we Know? » *Pharmaceutical research*, vol 33, n° 9, p 2239-2249, 2016.
- [12] J. Chanard, « Biocompatibilité des membranes de dialyse: le rôle de l'adsorption », *Nephrologie*, vol. 24, n° 7, p. 359–366, 2003.
- [13] J. F. Maher, Éd., *Replacement of renal function by dialysis: a textbook of dialysis*, 3rd ed., ISBN : 978-0-89838-414-7 ; Boston: Kluwer Academic Publishers, 1989.
- [14] N. Moachon, C. Boullanger, S. Fraud, E. Vial, M. Thomas, & G. Quash, « Influence of the charge of low molecular weight proteins on their efficacy of filtration and/or adsorption on dialysis membranes with different intrinsic properties », *Biomaterials*, vol. 23, n° 3, p. 651–658, 2002.
- [15] B. Krajewska, « Application of chitin and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review », *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 35, n° 2, p. 126–139, 2004.
- [16] M. F. Butler, Y.-F. Ng, & P. D. Pudney, « Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin », *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.*, vol. 41, n° 24, p. 3941–3953, 2003.
- [17] C. Marchand, J. Bachand, J. Perinet, E. Baraghis, M. Lamarre, G. E. Rivard, G. De Crescenzo, & C. D. Hoemann, « C3, C5, and factor B bind to chitosan without complement activation », *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 93, n° 4, p. 1429–1441, 2010.
- [18] C. Salvador-Morales, E. Flahaut, E. Sim, J. Sloan, M. L. Green, & R. B. Sim, « Complement activation and protein adsorption by carbon nanotubes », *Mol. Immunol.*, vol. 43, n° 3, p. 193–201, 2006.
- [19] P. P. Wibroe, S. V. Petersen, N. Bovet, B. W. Laursen, & S. M. Moghimi, « Soluble and immobilized graphene oxide activates complement system differently dependent on surface oxidation state », *Biomaterials*, vol. 78, p. 20–26, 2016.
- [20] W. A. Li, B. Y. Lu, L. Gu, Y. Choi, J. Kim, & D. J. Mooney, « The effect of surface modification of mesoporous silica micro-rod scaffold on immune cell activation and infiltration », *Biomaterials*, vol. 83, p. 249–256, 2016.
- [21] K. Yao, Éd., *Chitosan-based hydrogels: functions and applications*. Boca Raton, FL: CRC Press, 2012.
- [22] G. Peluso, O. Petillo, M. Ranieri, M. Santin, L. Ambrosic, D. Calabró, B. Avallone, & G. Balsamo, « Chitosan-mediated stimulation of macrophage function », *Biomaterials*, vol. 15, n° 15, p. 1215–1220, 1994.
- [23] H. Ueno, T. Mori, et T. Fujinaga, « Topical formulations and wound healing applications of chitosan », *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 52, n° 2, p. 105–115, 2001.
- [24] T. Minagawa, Y. Okamura, Y. Shigemasa, S. Minami, & Y. Okamoto, « Effects of molecular weight and deacetylation degree of chitin/chitosan on wound healing », *Carbohydr. Polym.*, vol. 67, n° 4, p. 640–644, 2007.
- [25] H.-J. Koo, Y. S. Song, H.-J. Kim, Y.-H. Lee, S.-M. Hong, S.-J. Kim, B.-C. Kim, C. Jin, C.-J. Lim, & E.-H. Park, « Antiinflammatory effects of genipin, an active principle of gardenia », *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 495, n° 2, p. 201–208, 2004.
- [26] D. Tahtat, M. Mahlous, S. Benamer, A.N. Khodja, & S.L. Youcef, S. L. , « Effect of molecular weight on radiation chemical degradation yield of chain scission of γ -irradiated chitosan in solid state and in aqueous solution. » *Radiation Physics and Chemistry*, vol 81, n°6, 659-665, 2012.
- [27] International Atomic Energy Agency, *Trends in radiation sterilization of health care products*. Vienna, Austria: ISBN 978-92-0-111007-7, International Atomic Energy Agency, 2008.

- [28] K.A. da Silva Aquino, « Sterilization by gamma irradiation. », F. Adrovic, *Gamma radiation*. ISBN : 978-953-51-0316-5: Intech, 2012.
- [29] R. Milo, P. Jorgensen, U. Moran, G. Weber, & M. Springer, « BioNumbers—the database of key numbers in molecular and cell biology », *Nucleic Acids Res.*, vol. 38, n° suppl 1, p. D750–D753, 2010.
- [30] A. Singh & H. Singh, « Time-scale and nature of radiation-biological damage: approaches to radiation protection and post-irradiation therapy », *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, vol. 39, p. 69–107, 1982.
- [31] J. Simons, « How do low-energy (0.1-2 eV) electrons cause DNA-strand breaks? », *Acc. Chem. Res.*, vol. 39, n° 10, p. 772–779, 2006.
- [32] B. Tilquin, « Actions biologique et chimique des rayonnements ionisants. » ISBN : 9782803800605; Frison-Roche, 2001.
- [33] S. I. Borrelly, A. C. Cruz, N. L. Del Mastro, M. H. O. Sampa, & E. S. Somessari, « Radiation processing of sewage and sludge. A review », *Prog. Nucl. Energy*, vol. 33, n° 1, p. 3–21, 1998.
- [34] T. R. Munro, « The relative radiosensitivity of the nucleus and cytoplasm of Chinese hamster fibroblasts », *Radiat. Res.*, vol. 42, n° 3, p. 451–470, 1970.
- [35] F. Yang, K. M. Waters, J. H. Miller, M. A. Gritsenko, R. Zhao, X. Du, E. A. Livesay, S. O. Purvine, M. E. Monroe, Y. Wang, & others, « Phosphoproteomics profiling of human skin fibroblast cells reveals pathways and proteins affected by low doses of ionizing radiation », *PLoS One*, vol. 5, n° 11, p. e14152, 2010.
- [36] V. Čuba, T. Pavelková, & V. Můčka, « Effect of dose and dose rate of gamma radiation on catalytic activity of catalase », *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, vol. 286, n° 3, p. 619–624, 2010.
- [37] L. Gebicka, D. Metodieva, & S. Bachman, « The catalytic and peroxidatic activity of irradiated dilute aqueous solutions of catalase », *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, vol. 116, n° 1, p. 77–86, 1987.
- [38] M. Möller & A. Denicola, « Protein tryptophan accessibility studied by fluorescence quenching », *Biochem. Mol. Biol. Educ.*, vol. 30, n° 3, p. 175–178, 2002.
- [39] J. T. Vivian & P. R. Callis, « Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins », *Biophys. J.*, vol. 80, n° 5, p. 2093–2109, 2001.
- [40] A. Aliverti, B. Curti, & M. A. Vanoni, « Identifying and quantitating FAD and FMN in simple and in iron-sulfur-containing flavoproteins », *Methods Mol. Biol.*, vol. 131, p. 9–24, 1999.
- [41] X. Zhang, L. Xu, X. Huang, S. Wei, & M. Zhai, « Structural study and preliminary biological evaluation on the collagen hydrogel crosslinked by γ -irradiation », *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 100, n° 11, p. 2960–2969, 2012.
- [42] S. Ruhl, P. Berlenbach, S. Langenfelder, D. Hörl, N. Lehn, K.-A. Hiller, G. Schmalz, & H. Durchschlag, « Integrity of proteins in human saliva after sterilization by gamma irradiation », *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 77, n° 3, p. 749–755, 2011.
- [43] H. Terryn, A. Maquille, C. Houée-Levin, & B. Tilquin, « Irradiation of human insulin in aqueous solution, first step towards radiosterilization », *Int. J. Pharm.*, vol. 343, n° 1, p. 4–11, 2007.
- [44] J. De Lara, P. S. Fernández, P. M. Periago, & A. Palop, « Irradiation of spores of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* with electron beams », *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, vol. 3, n° 4, p. 379–384, 2002.
- [45] A. M. S. Galante & L. L. Campos, « The Radiation Effect of 60 Co Gamma Rays on Polycarbonate detector. », *Radiat Phys Chem*, vol. 71, p. 391–394, 2004.
- [46] S.-J. Zhang & H.-Q. Yu, « Radiation-induced degradation of polyvinyl alcohol in aqueous solutions », *Water Res.*, vol. 38, n° 2, p. 309–316, 2004.
- [47] N. V. Bhat, M. M. Nate, M. B. Kurup, V. A. Bambole, & S. Sabharwal, « Effect of γ -radiation on the structure and morphology of polyvinyl alcohol films », *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. Mater. At.*, vol. 237, n° 3, p. 585–592, 2005.
- [48] R. N. Nowlin, E. W. Enlow, R. D. Schrimpf, & W. E. Combs, « Trends in the total-dose response of modern bipolar transistors », *Nucl. Sci. IEEE Trans. On*, vol. 39, n° 6, p. 2026–2035, 1992.
- [49] I. Fetahović, M. Pejović, et M. Vujisić, « Radiation Damage in Electronic Memory Devices », *Int. J. Photoenergy*, vol. 2013, 2013.
- [50] S. Ahmed, G. P. Rigby, P. Crump, & P. M. Vadgama, « Comparative assessment of chemical and γ -irradiation procedures for implantable glucose enzyme electrodes », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 15, n° 3, p. 159–165, 2000.
- [51] S. K. Ghosh, T. K. Chaki, D. Khastgir, et R. Pinto, « γ Irradiation effects on optical, thermal, and mechanical properties of polysulfone/MWCNT nanocomposites in argon atmosphere », *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 132, n° 22, 2015.
- [52] P. O. Muisener, L. Clayton, J. D'Angelo, J. P. Harmon, A. K. Sikder, A. Kumar, A. M. Cassell, & M. Meyyappan, « Effects of gamma radiation on poly (methyl methacrylate)/single-wall nanotube composites », *J. Mater. Res.*, vol. 17, n° 10, p. 2507–2513, 2002.
- [53] M. Miao, S. C. Hawkins, J. Y. Cai, T. R. Gengenbach, R. Knott, & C. P. Huynh, « Effect of gamma-irradiation on the mechanical properties of carbon nanotube yarns », *Carbon*, vol. 49, n° 14, p. 4940–4947, 2011.

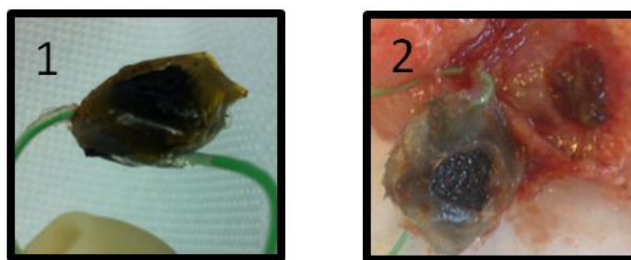
Chapitre 4 : Conception et mise en œuvre *in vivo* d'une biopile enzymatique au chitosane

Le chapitre 2 nous a permis de montrer que la performance de nos biopiles de 2^{ème} génération était satisfaisante, mais que des points de blocage subsistaient, notamment en termes de stabilité et de biocompatibilité à long terme. Le chapitre 3 a permis de résoudre deux points essentiels pour concevoir des biopiles plus biocompatibles : l'utilisation d'une membrane filtrante à base de chitosane et la radio-stérilisation de la biopile. Ce chapitre est consacré à la conception et la mise en œuvre d'une méthode d'étude *in vivo* de la biocompatibilité, dont les premiers résultats d'implantation chez de gros animaux seront présentés.

4.1 Biocompatibilité *in vivo* de bioélectrodes de 3^{ème} génération

4.1.1 Etude de la biocompatibilité d'une anode GOX/naphtoquinone 1-4/CNT

Comme nous l'avons décrit dans les 2 premiers chapitres de cette thèse, le transfert direct d'électrons (DET) de la Glucose oxydase à l'électrode permet de bénéficier d'un potentiel élevé. Cependant, la faible proportion d'enzymes connectées, même si elle permet d'obtenir un courant satisfaisant, mérite une optimisation et la connexion électrique par transfert médiaté (MET) peut alors être un choix judicieux. Nous avons mis au point une méthode d'étude de la biocompatibilité d'une première série de nouvelles anodes élaborées au Département de Chimie Moléculaire [1]. On utilise de la 1-4 naphtoquinone comme médiateur, en profitant de son potentiel rédox compatible avec celui du FAD de la GOX et de sa faible solubilité dans les tampons aqueux. Pour conférer une bonne tenue mécanique à l'électrode et éviter un gonflement excessif, du polypyrrole et du polystyrène sulfonate ont été électro-polymérisés à la surface des anodes. Les anodes sont ensuite placées dans un tampon pour permettre le relargage du médiateur en excès. En effet, malgré sa faible solubilité dans les tampons aqueux, cette molécule est toxique pour l'organisme en induisant la production d'espèces réactives de l'oxygène, ou en se liant aux protéines contenant des thiols qu'il inactive. La DL 50 est de 5,5mg/kg en intrapéritonéal chez la souris[2]. Une concentration de 30 μ M de 1-4 naphtoquinone induit une mortalité de 50% sur des hépatocytes en culture [3], [4]. Pour assurer la biocompatibilité de ces anodes, nous avons conçu un enrobage en chitosane modifié comme précédemment décrit au chapitre 3. Ces bioanodes sont ensuite été radio-stérilisées et implantées dans la cavité abdominale de 4 rats pendant des durées variables. L'explantation de ces anodes a montré un début de dégradation du film de chitosane à partir de 3 mois d'implantation en intra-abdominale chez le rat.



	rat 1	rat 2	rat 3	rat 4
durée d'implantation	15 jours	90 jours	90 jours	5 mois
film chitosane intact	oui	non	oui	non

Figure 4.1 : explantation de bioanodes médiatées implantées chez le rat. Présence (1) ou absence (2) de la membrane de chitosane.

4.1.2 Etude de la biocompatibilité et de la performance d'une cathode laccase/chitosan/CNT

Le chitosane utilisé comme membrane filtrante et décrit dans le chapitre 3 nous a également servi pour la fabrication de la biocathode. En effet, la laccase est une enzyme dont la connexion électrique aux nanotubes de carbone s'établit de façon plus efficace que pour la GOX. En revanche, il convient de la maintenir dans un environnement propice à son activité à long terme. Ceci a été rendu possible par l'utilisation, dans la composition de laccase et de nanotubes de carbone, d'un liant à base de nanosphères de chitosane [5]–[8] permettant de compacter l'électrode en conservant une surface active importante (figure 4.2).

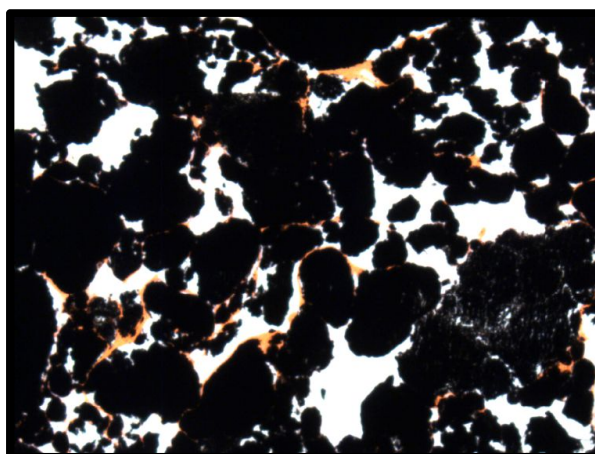


Figure 4.2 : coupe transversale d'une biocathode après implantation. L'ensemble (CNT + nanosphères + enzymes) apparaît sous forme d'agglomérats noirs. Du chitosane (en orange) enrobe partiellement ces grains de nanotubes de carbone (coloration HES).

Cet enrobage permet le fonctionnement de la cathode par transfert direct en stabilisant la connexion de l'enzyme pendant plus de 6 mois *in vivo*. Les résultats d'implantation de cette biocathode ont été publiés et sont présentés ci-après avec la permission de l'éditeur. Mes contributions concernent la conception de la méthode de stérilisation des électrodes, l'implantation et la caractérisation histologique des biocathodes.

CrossMark
click for updates

Cite this: DOI: 10.1039/c4ee03430a

Bioelectrodes modified with chitosan for long-term energy supply from the body

S. El Ichi,^a A. Zebda,^a J.-P. Alcaraz,^a A. Laaroussi,^b F. Boucher,^a J. Boutonnat,^c N. Reverdy-Bruas,^b D. Chaussy,^b M. N. Belgacem,^b P. Cinquin^a and D. K. Martin^{*a}

A 3D nanofibrous network of compressed chitosan in the presence of genipin as the cross-linker, carbon nanotubes and laccase constitutes a new design to enhance the stability and the biocompatibility of biocathodes. The *in vitro* delivered current was around -0.3 mA mL^{-1} for 20 days under continuous discharge. A thin film made of chitosan cross-linked with genipin was synthesized and optimized for oxygen and glucose diffusion. This film was used as a biocompatible barrier on the surface of biocathodes implanted in rats. The biocathodes remained operational after 167 days *in vivo*. This biocathode design minimised the inflammatory response in the first two weeks after implantation. After several months, the growth of macrophages was observed. The electrical connection and the catalytic activity of the enzyme entrapped into the biocathode were demonstrated after almost 6 months of implantation by the *ex vivo* measurement of the OCP (0.45 V to 0.48 V) and the delivered current (-0.6 mA mL^{-1}) under optimal conditions.

Received 30th October 2014

Accepted 7th January 2015

DOI: 10.1039/c4ee03430a

www.rsc.org/ees

Broader context

The next generation of implantable medical devices require sustainable ways to provide their energy. For an implanted energy supply, sustainability means that the device needs to be compatible with the environment inside the body, it should not cause any inflammation and should be able to utilise biomolecules inside the body as a fuel to produce energy. Also, importantly, the implanted power supply should have a very long life-time to continue to produce energy inside the body for other implanted medical devices. In this article we describe a 3D bioelectrode that continued to produce energy electrochemically for around 6 months when implanted inside a freely moving animal. This advance is based on improving the biocompatibility with an innovative design and use of biomaterials. Providing energy for such a long period of implantation, especially in a freely moving animal, is a novel result that addresses the existing issues in this field for the future of implantable energy supplies, namely that is necessary to improve their stability and efficiency. Our results augur well for continuing improvements in the implanted lifetimes of biofuel cells, so as to enable these implantable biofuel cells to become viable and sustainable energy supplies for medical devices.

1. Introduction

The search to provide stable and long-lasting power supplies for implanted medical devices has turned to seek novel ways to utilize biomolecules, which are available in the extracellular fluid, as the fuel for biofuel cells. A Glucose Biofuel Cell (GBFC) provides a promising solution for that search because it utilizes enzymes to oxidize glucose and reduce dioxygen in order to generate electrical power. Both glucose and oxygen are freely available in the extracellular fluid, theoretically allowing such a biofuel cell to function indefinitely by relying on the advantageous aspects of enzymatic catalysis which can occur at body temperature and neutral pH. The longevity of such a GBFC relies upon incorporating appropriately stable enzymes in

sufficient quantities in bioelectrodes, which would potentially allow this system to provide a more biologically compatible replacement for the traditional electrocatalysis reactions of conventional fuel cells that are used currently to power medical devices.

Ensuring sustained availability of biomolecules requires controlled exchanges between the implanted GBFC and body fluids. Recently, several teams have reported systems that achieve such exchanges to produce useful levels of electrical energy inside the body. Cinquin and coworkers¹ implanted a GBFC in the retroperitoneal space of freely moving rats. The implanted GBFC was based on composite graphite discs containing glucose oxidase and ubiquinone at the anode, and polyphenol oxidase (PPO) and quinone at the cathode. They demonstrated that the implanted GBFC was able to produce $10 \mu\text{W}$ using extracellular glucose and dioxygen. The GBFC was also able to power a light-emitting diode (LED) and a digital thermometer.² Sales and coworkers³ developed an implantable glucose/dioxygen hybrid enzyme-Pt micro-biofuel cell, and demonstrated that this GBFC implanted in the jugular vein of a rat was

^aUniv. Grenoble 1 – Joseph Fourier/CNRS/INSERM/TIMC-IMAG UMR 5525, Grenoble, F-38041, France. E-mail: don.martin@imag.fr

^bUniversity of Grenoble Alpes/CNRS/LGP2 UMR 5518, F-38000, France

^cLaboratory of Cytology, Biochemistry and Cytopathology, Centre Hospitalo-Universitaire Albert Michallon, B.P. 217X Cédex 9, 38043 La Tronche Cedex, France

capable of producing $200 \mu\text{W cm}^{-2}$. Katz and coworkers demonstrated that GBFCs connected in series or in parallel deliver enough power to supply an electric motor⁴ and a cardiac pacemaker.⁵ Andoralov and coworkers⁶ succeeded in producing $2 \mu\text{W cm}^{-2}$ using a GBFC implanted in the cerebrospinal fluid and in the brain of a rat.

These results constitute a considerable advance in the development of implantable glucose biofuels. Nonetheless, the major challenge with any of these GBFCs continues to be the short life-time, poor stability and poor biocompatibility during implantation so that GBFCs published to date have been unable to supply power continuously for long periods of time when implanted. Biofouling of the semi-permeable membranes, filtration capacities and general biocompatibility issues of the materials used for the bioelectrodes remain hurdles that diminish the power output, for even short-term implantation.

The bioelectrodes necessary for the power output from a GBFC include a bioanode to oxidize glucose and a biocathode to reduce dioxygen. The existing research indicates that either glucose oxidase (GOD) or glucose dehydrogenase is an appropriate enzyme for the bioanode and that laccase or bilirubin oxidase (BOD) is an appropriate enzyme for the biocathode.^{7,8} When implanted, some components of the extracellular fluids affect GBFC function, particularly in the case of the biocathode. Indeed, BOD activity is irreversibly and rapidly damaged by urate in the presence of dioxygen,⁹ and laccase activity is affected by the high concentration of chloride anions.¹⁰ However, some authors observed that in the case of direct electron transfer (DET) between laccase and the electrode, without any chemical mediator, laccase preserves its activity.^{11–13} This resistance to chloride was attributed to the fact that chloride is a competitive inhibitor of laccase.¹¹ In the case of a compressed laccase–carbon nanotube (MWCNT) pellet, laccase remains active for several weeks at neutral pH.^{12,13} However, the activity of laccase decreases substantially at physiological pH, since laccase has an acidic optimal pH. To solve this problem, it was proposed to use at the cathode the enzyme PPO which is capable of working in physiological serum without any inhibition.¹ The disadvantage of PPO is its low redox potential of 250 mV vs. Ag/AgCl, which is 150 mV lower than that of BOD and half the redox potential of laccase.

Recently, we have developed means to improve the stability of the biocathode. We demonstrated that the encapsulation of laccase in a composite of Chit–MWCNT fibres provides the capability for the biocathode to work in physiological pH, for two months in a continuous mode, and be stable for several months when stored at neutral pH and periodically tested.¹⁴ Chitosan is a natural semi-crystalline polysaccharide derived from chitin, which is the second most abundant biopolymer after cellulose. It can be extracted from different sources (crustacean shells, insect cuticles, mushroom envelopes, green algae cell walls, and yeasts).^{15,16} Chitosan is biocompatible and especially useful for many applications in the biomedical field.^{17–19} The ratio of D-glucosamine to the sum of D-glucosamine and N-acetyl D-glucosamine gives the number of amino groups along the chains, which then determines the deacetylation degree of chitosan. The degree of deacetylation is

important, since the amino groups can react with different molecules such as proteins²⁰ and cross-linkers (glutaraldehyde, etc.).

In this paper, we report the novel use of chitosan cross-linked with genipin to enhance the stability and the biocompatibility of the biocathode when implanted for long periods in an animal. Genipin is obtained from geniposide which is isolated from the fruits of *Gardenia jasminoides* Ellis. It is very attractive for improving the performance of the biocathode, since it is a natural cross-linker which reacts with amine groups of polymers and is 10 000 times less toxic than glutaraldehyde.^{21,22} Moreover, genipin is an anti-inflammatory and anti-angiogenesis agent.

2. Experimental section

2.1. Enzyme and chemicals

Laccase from *Trametes versicolor* and high viscosity chitosan were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Phosphate Buffer Saline (PBS) tablets (0.01 mol L^{-1} , 0.14 mol L^{-1} NaCl, $0.0027 \text{ mol L}^{-1}$ KCl, pH 7.4) were purchased from Euromedex (Souffelweyersheim, France). Silicone (AS310) was purchased from SILICOMET. All aqueous solutions were prepared using ultrapure water from Millipore system. Multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) were purchased from Nanocyl (>95% purity, 9.5 nm diameter). The Dacron vascular graft was supplied by P. Porcu, Service de chirurgie vasculaire, CHU Grenoble. Wistar Han IGS male rats were purchased from Charles River.

2.2. Chitosan film synthesis

Viscous chitosan (1% (m/v) solubilized in 0.5% (v/v) acetic acid at 50 °C) was obtained after 2 h stirring at ambient temperature. A genipin solution (6 mg mL^{-1}) was prepared by solubilizing the genipin powder in 12% (v/v) DMSO, 88% (v/v) H₂O. A volume of 150 μL of this solution was added to 20 mL of chitosan. The final concentration of genipin was 4.5% (m/v) in 1% (m/v) chitosan. The mixture was stirred for 30 min.

For film casting, a volume of about 3 g of viscous chitosan was deposited on a non-adhesive circular surface (28 cm²). For this purpose, a ROTH-disposable weighing tray (PS natural coloured L 89 × W 89 × H 25 mm) was used. Then, it was dried at ambient temperature for a minimum of 72 hours to obtain a dry plastic film.

2.3. Thickness measurement

The thickness of the chitosan plastic membranes was measured using a digimatic indicator (0.0001–1.2'') from Mitutoyo (Roissy CDG, France). The device was used to measure the thickness at 10 locations, chosen at random, across the surface of the membrane. The value of the thickness of the membrane was reported as the mean of 10 measurements.

2.4. FTIR analysis

Fourier Transform Infrared (FTIR) spectra of chitosan films were obtained using a PERKIN ELMER PARAGON 1000

spectrometer. A total of 16 scans were performed at 4 cm^{-1} resolution. Measurements were recorded between 4000 and 600 cm^{-1} . Each FTIR spectrum was obtained in transmittance mode.

2.5. Atomic Force Microscopy (AFM)

In order to determine the surface roughness of chitosan films, AFM experiments in a tapping mode were conducted on an SPI 3800N probe station (Seiko Instruments Inc., Japan). A resonance frequency of 10 kHz was used for all experiments with a 1 μm scanner. All AFM experiments were performed in air.

2.6. Biocathode preparation

The viscous chitosan–genipin solution was prepared as described previously. For the fabrication of the biocathode that included chitosan, a mixture of laccase from *Trametes versicolor* (100 mg), MWCNTs (100 mg) and viscous chitosan–genipin (200 μL) was used. The resulting mixture was divided into 5 equal quantities in order to prepare 5 disks compacted using a manual press. In order to set up the electrical connection, a wire was embedded in carbon paste covering one side of each disk (surface: 0.5 cm^2 , thickness: 1 mm). The perimeter and the covered side of the disc were isolated with silicone. The cathodes were dried at ambient temperature and then stored at $4\text{ }^\circ\text{C}$ until use.

2.7. Scanning Electron Microscopy (SEM)

The structure of the film and the biocathodes before and after implantation in rats was characterized by SEM using an ULTRA 55 FESEM based on the GEMINI FESEM column (Nanotechnology Systems Division, Carl Zeiss NTS GmbH). Samples were sputter-coated with 1 nm gold–palladium using a precision etching coating system (PECS 682-Gatan, Inc., CA).

2.8. Sterilisation by gamma radiation

The irradiator uses sources of ^{60}Co (ARC-nucleart CEA gre-noble). Three gamma doses were tested for the sample irradiation: 6, 12 and 42 kGy. The effect of the gamma radiation on the free and immobilized enzyme in the cathodes was studied and compared with non-irradiated samples. The optimal gamma dose to sterilize the cathode was determined to be 12 kGy.

2.9. Implantation of bioelectrodes in the body of rats

Four rats were used for the *in vivo* study, which was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the Grenoble University (ComEth, number: 243 LER-UMR7525-JPA-01). The care of the rats was approved by the European Communities Council Directive Animal Care and Use Committee, and the experiments were performed in accordance with their guiding principles (European Communities Council Directive L358-86/609/EEC) and also under license from the French Ministry of Agriculture (numbers 38018 and 381141).

Four implants were prepared (one biocathode for each rat). Two implants were used for the histological characterization

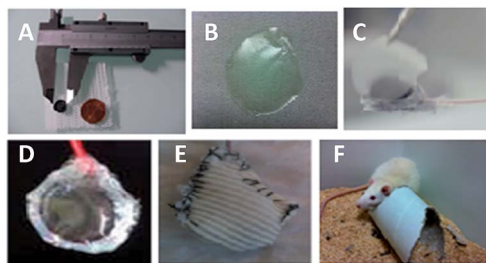


Fig. 1 (A) Chit–MWCNT–laccase electrode, (B) plastic chitosan-based film, (C) film coating of the surface of the electrode, (D) Chit–MWCNT–laccase electrode coated with the chitosan film, (E) implantable electrode inside a Dacron bag, (F) rat with implanted biocathode.

while the other two were used for the electrochemical tests. The copper wire connected to the biocathode was isolated with a catheter. The biocathode was enclosed within a Dacron bag (Fig. 1) and sterilized by gamma radiation, as described above. The rat was anesthetized, a median laparotomy performed, and the cathode inserted into the retroperitoneal space in the left lateral position. The muscular abdominal wall and the skin were separately sutured and the animal was allowed to recover from anesthesia.

For the post-operative period up to 167 days the rats were fed with a standard diet and water *ad libitum* in a room with a 12 h light/dark cycle at a temperature of $22 \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$. The weight and food consumption of the rats were measured regularly. The rats gained weight during the post-operative period, from the average weight of $457 \pm 41\text{ g}$ on the first post-operative day, to an average weight of $531 \pm 34\text{ g}$ after 90 days. After 167 days the weight of the rats was 572 g. The rats maintained their consumption of food during the period of implantation, at $21 \pm 8\text{ g}$ (first post-operative day) to $24 \pm 3\text{ g}$ (after 90 days) and 26 g (after 167 days).

After the period of implantation, two biocathodes were analyzed *ex vivo*. The implant (Fig. 7A) was removed. The Dacron bag covered with growing tissues was opened carefully (Fig. 7C) to take out the biocathode which was immersed in PBS pH 7.4 and analyzed in the electrochemical cell as described in Section 2.11.

2.10. Histological characterization of implanted biocathodes

Immediately after their extraction from the rat body, the samples were immersed for 24 h in 4% formaldehyde solution. The processing of cassettes containing those tissue samples was performed automatically in a Semi-Enclosed Benchtop Tissue Processor Leica TP1020. The embedding in paraffin was carried out using a Heated Paraffin Embedding Module Leica EG1150H. The sectioning into $4\text{ }\mu\text{m}$ slices was carried out using a Semi-Automated Rotary Microtome Leica RM2245. A routine investigation of trichromic HES (Hematoxylin–Eosin–Safran) histological stain was performed. In the images of the histological slices (Fig. 8), the purple color in the presence of hematoxylin corresponds to the nuclei, eosin stains the

cytoplasm in pink and collagen fibres are colored orange by safran. Microscopic observation was done under a Zeiss microscope (SAMBATM 2050) at different magnifications (X10, X20 and X40).

2.11. Electrochemical assays

All electrochemical measurements were performed using an electrochemical potentiostat (Biologic, 300). Measurements were performed using a conventional three-electrode cell (80 cm³). The biocathode was analyzed in 100 mL of a phosphate buffer saline pH 7.4. A saturated calomel electrode (SCE) was used as the reference electrode and a platinum mesh as the counter electrode. The chronoamperometric response of the biocathode was recorded at 0.2 V vs. SCE. Under the same conditions, cyclic voltammetry at different scan rates (0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 mV s⁻¹) was performed to monitor the current in response to variations in potential. All measurements were performed at ambient temperature (20 ± 3 °C).

3. Results and discussion

3.1. Characterization of the chitosan film

As shown in Fig. 1, the chitosan film cross-linked with genipin is bluish green. This colour is due to the reaction between genipin and the amino groups of the chitosan, which is expected to produce a dark blue colour,²³ but in our case the lighter color indicates the low genipin content. The chitosan–genipin cross-linking reaction involves several stages.²⁴ Oxygen-radical induced polymerisation of genipin occurs after the formation of a heterocyclic compound during the reaction steps. The resultant chitosan–genipin polymer is insoluble in acidic and alkaline conditions and its swelling properties depend on the pH and temperature.²⁴

FTIR-ATR analysis of uncross-linked and genipin-cross-linked chitosan films was carried out in order to study the chemical changes of chitosan after cross-linking (Fig. 2A).

Chitosan (curve (a)) exhibits an OH stretching band at 3352 cm⁻¹, C–H stretching peak at 2918 cm⁻¹, C–O–C stretching signal at 1023 cm⁻¹, and C–O–C bridges and glycosidic linkages at 894 cm⁻¹. This is in accordance with IR characteristic bands of chitosan found in the literature.^{25,26} The peak at 1376 cm⁻¹ (curve (a)) is assigned to the methyl group's (–CH₃) symmetric deformation. This peak is broader in the other three curves which correspond to the presence of ring-stretching of the heterocyclic amine after cross-linking with genipin.²⁷

In curve (a), the absorption peaks at 1661 cm⁻¹ (C–O stretching) and 1576 cm⁻¹ (N–H stretching) correspond to the amide I band. The peak observed at 1576 cm⁻¹ is assigned to the vibrational band corresponding to primary amino groups after *N*-acetylation of chitosan. This is characteristic of chitosan with a high deacetylation degree.²⁸ The amide I band shifted to 1541 cm⁻¹ (curve (b)) after genipin cross-linking. This band is retrieved at 1539 cm⁻¹ (curve (c)) and 1545 cm⁻¹ (curve (d)). The cross-linking mechanism involves the reaction of amino groups of chitosan with genipin which results in an amide linkage and a heterocyclic amine. Due to the overlapping of the C=O

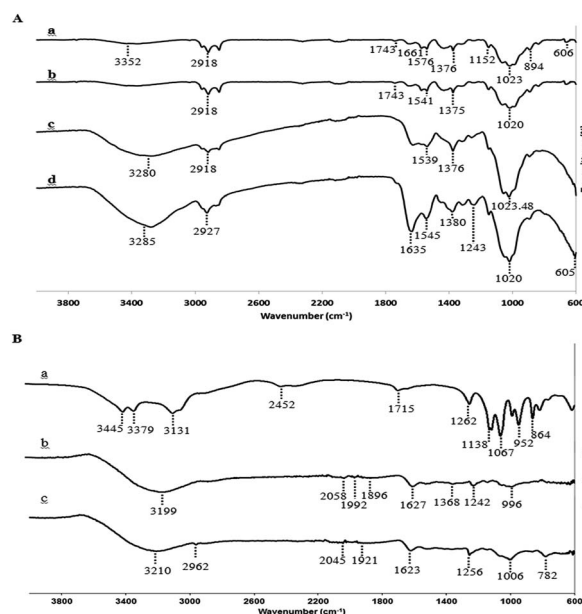


Fig. 2 FTIR analysis of (A) the chitosan films: (a) chitosan, (b) chitosan cross-linked with genipin, (c) after 90 days *in vivo*, (d) after 167 days *in vivo*, (B) Chit–MWCNT–laccase biocathode: (a) stored *in vitro*, (b) after 90 days *in vivo*, (c) after 167 days *in vivo*.

stretching band of chitosan with the C=C stretching in the cyclic structure of genipin, the amide I band becomes slightly broader in curve (b) and this is intensified in curve (c) and (d). This intensification can be due to the reaction of free amino groups with other proteins present in the extracellular fluid. Broad peaks at 1635 cm⁻¹ and 1243 cm⁻¹ (C–N stretching of amide III) were noticed in curve (d) which indicates that new cross-linking reactions have indeed occurred *in vivo*. The peak at 1743 cm⁻¹ corresponds to the carboxylic groups of chitosan.

Fig. 3C and D show the dry chitosan film. Fig. 3E and F show SEM images corresponding to the structure of the wet chitosan film after swelling in the buffer solution. The dry film shows a stratified structure which disappeared after swelling. The difference between the thickness of the dry and wet film does not exceed a few nanometres.

The mean thickness of the chitosan film is about 15 μm. The pore sizes range from 5 to 6 nm. The chitosan film exhibits a smooth surface on the bottom and a rough surface on the upper face (Fig. 3A and B), which is due to only the upper side being in contact with air during the dehydration process. The measurements of the surface arithmetic roughness by AFM (Fig. 4) have shown that the upper face exhibits a mean roughness of 4.39 nm which is almost five times higher than that of the smooth surface (mean roughness of 0.901 nm).

3.2. Characterization of the 3D biocathode structure

SEM images of the cross-section of the cathode (Fig. 5) show that the chitosan matrix is composed of homogeneous nanofibres with an average diameter of 30 nm.

We reported a new procedure to obtain conducting polymer nanofibres by simultaneous compression of viscous chitosan,

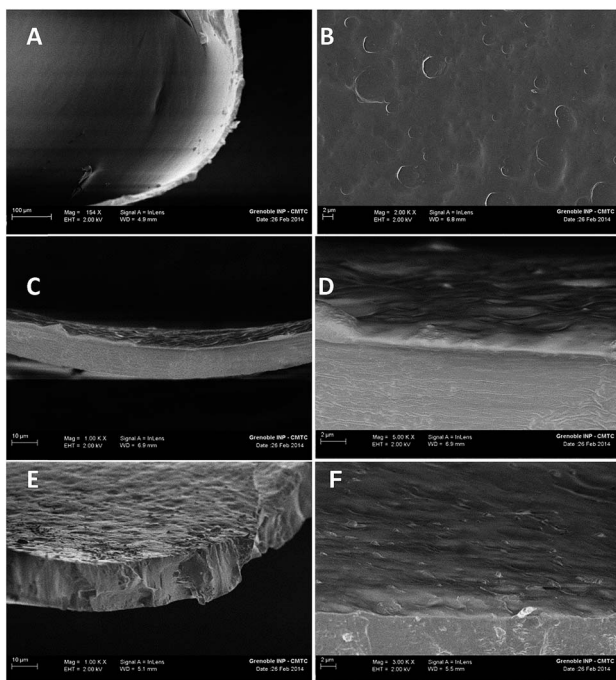


Fig. 3 SEM images of the (A) smooth and (B) rough side of the dry film, (C) cross-section and (D) rough surface of the dry film, (E) cross-section and (F) surface of the hydrated film.

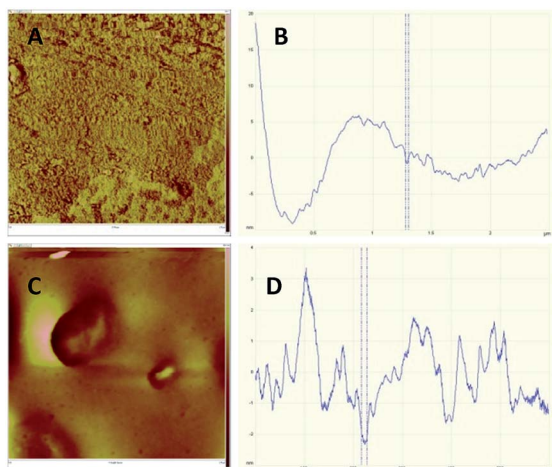


Fig. 4 AFM of the (A) rough side and (B) smooth side of the dry chitosan film.

MWCNTs and laccase.¹⁴ The advance in the present work is the use of genipin as a cross-linker to enhance the properties of the 3D matrix without changing the nanofibrous structure, which is advantageous for enzyme immobilization and substrate diffusion. In fact, the use of a cross-linker prevents the degradation of chitosan in acidic conditions and after a long period especially *in vivo*. In order to demonstrate that the 3D nanofibrous matrix observed by SEM (Fig. 5) is composed of chitosan and study chemical modifications occurring after implantation, FTIR analysis was performed on biocathodes used as the control (stored under *in vitro* conditions) and after the two

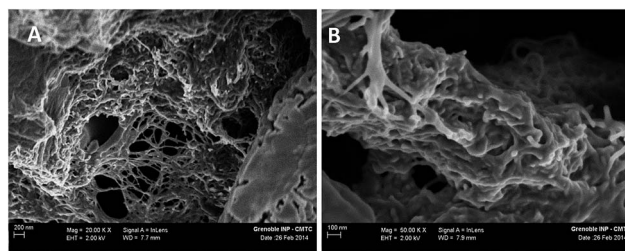


Fig. 5 SEM images of a cross-section of the Chit-MWCNT-laccase biocathode under (A) 20 KX and (B) 50 KX magnification.

periods of implantation (Fig. 2B). The peaks observed in spectrum (a) are characteristic of chitosan and in accordance with our previous study.¹⁴ Both fingerprint signals of MWCNTs and chitosan are present with regard to the intensity of peaks around 3445 cm^{-1} and 1067 cm^{-1} . Compared to our previous FTIR analysis of the Chit-MWCNT-laccase 3D matrix without genipin cross-linking,¹⁴ in spectrum (a), the peak at 1714 cm^{-1} corresponding to an aldehyde II (C=O aldehyde stretching) was present while the peak at 1566 cm^{-1} disappeared. This can be explained by the reaction between the carboxymethyl group of genipin and the amino group of chitosan.²⁴ A broad peak was noticed at 1262 cm^{-1} (C-N stretching of amide III). Cross-linking reactions are expected to occur between chitosan, genipin and laccase molecules during the polymerization of chitosan nanofibres. The conjugation of laccase to chitosan²⁹ and the use of chitosan cross-linked with genipin as the immobilization support for laccase³⁰ and their positive effect on the enzyme stability were reported in the literature. The immobilization procedure is different from what we report here. The simultaneous compression of viscous genipin/chitosan with MWCNTs and laccase powder resulted in a nanofibrous 3D arrangement after solvent (acetic acid) evaporation. Thus, laccase molecules could react with all free amino groups of chitosan, covalently cross-linked with genipin or simply adsorbed on the fibres. Similar peaks as in spectrum (a) were observed but these peaks shifted to 1627 cm^{-1} and 1242 cm^{-1} (C-N stretching of amide III) in spectrum (b) and to 1623 cm^{-1} and 1256 cm^{-1} in spectrum (c). The similar intensity of the peak at 1627 cm^{-1} (spectrum (b)) and 1623 cm^{-1} (spectrum (c)) suggests that no new cross-linking reactions occurred after 167 days *in vivo*. The absorption band in the region $3500\text{--}3350\text{ cm}^{-1}$ corresponds to the amino group of chitosan. The intensity of the absorption band in the region $3500\text{--}3350\text{ cm}^{-1}$ did not decrease in spectra (b) and (c) which indicates that the amino groups of chitosan remained linked to laccase molecules.

3.3. *In vitro* electrochemical characterization

We investigated the possible direct electrical connection of laccase to the chitosan conducting nanofibres by Open Circuit Potential (OCP) and cyclic voltammetry measurements.

Fig. 6A shows the evolution of OCP with time for the biocathode. We observe that the OCP increases and tends to stabilize at around 0.53 V vs. SCE which corresponds to the laccase redox potential and is in agreement with the reported

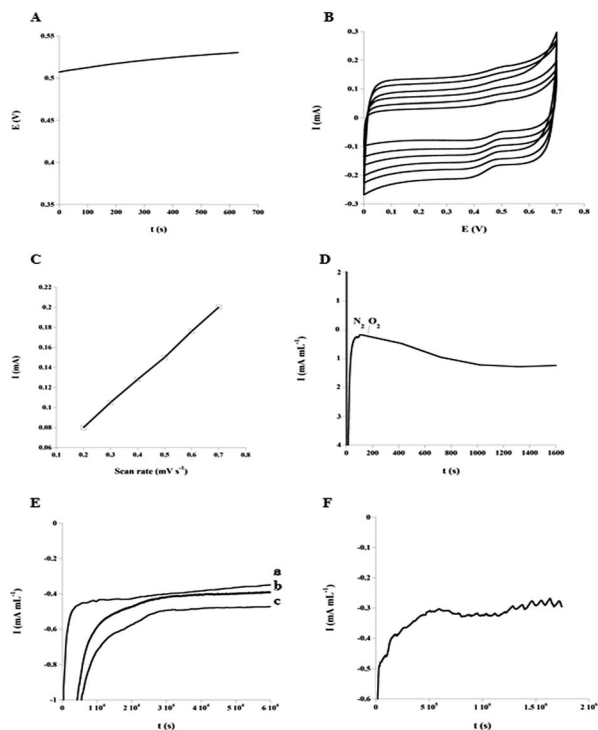


Fig. 6 (A) OCP, (B) cyclic voltammety analysis of the Chit-MWCNT-laccase biocathode at scan rates 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 and 0.7 mV s^{-1} (from up to down on the graph), (C) plot of I as a function of the scan rate, (D) chronoamperometric response under O_2 saturation, (E) comparison of the chronoamperometric responses of the biocathodes under continuous discharge: (a) without genipin cross-linking, (b) electrode based on chitosan cross-linked with genipin and (c) sterilized with gamma radiation, (F) Chit-MWCNT-laccase electrode.

OCP value of laccase directly connected to MWCNTs.^{12,14} The cyclic voltammety (CV) measurements were recorded at low scan rates (from 0.2 to 0.7 mV s^{-1}) to subtract the important contribution of capacitive current induced by the large electroactive area of the Chit-MWCNT-laccase network. In Fig. 6B, CV shows the presence of an oxidation peak at 0.52 V and a reduction peak at 0.4 V. The intensities of the oxidation peak and reduction peaks increase linearly with the scan rate (Fig. 6C), which indicates that laccase is adsorbed on the surface of the electrode, and only the adsorbed laccase is electrically connected to the Chit-MWCNT matrix. To check if the connected laccase exhibits direct electrocatalytic activity on O_2 reduction, chronoamperometry measurements were recorded at 0.2 V vs. SCE with and without saturation by O_2 . Fig. 6D shows that bubbling oxygen into the solution triggers the occurrence of a negative current corresponding to the bioelectrocatalytic reduction of O_2 that rapidly stabilizes at 1 mA cm^{-2} , which corresponds to 10 mA mL^{-1} if we consider the volume of the biocathode. Moreover, the magnitude of this current is two times higher than that obtained in the case of Chit-MWCNT-laccase without using genipin as the cross-linker,¹⁴ which indicates that the cross-linking has a positive effect on the biocathode performance.

In order to evaluate the stability of the laccase-based biocathode, chronoamperometry was used to assess the delivered current density. The measured OCP was 0.5 V vs. SCE under continuous discharge, at physiological pH, ambient temperature and without O_2 saturation. As shown in Fig. 6E, the cross-linking of chitosan using genipin (curve (b)) seems to have a positive effect on the current response of the electrode which remained stable as compared to that based on conducting chitosan fibres (curve (a)). The positive effect was accentuated when the electrodes were sterilized by gamma radiation (curve (c)). Although such an investigation of the effect of the sterilization procedure is necessary for long-term implantation, few studies reported the effect of gamma radiation on chitosan preparation.^{31,32} Khan and co-workers³² demonstrated that chitosan solutions exposed to low gamma radiation doses (0.1–0.3 kGy) resulted in a positive effect on the mechanical and barrier properties of HEMA grafted chitosan-based films compared to control chitosan films. In our case, chitosan films were polymerized before being exposed to gamma radiation. The used dose (12 kGy) was 40 times higher than the maximal dose described in the study. It was reported that in its film form and exposed to doses from 5 to 100 kGy, the molecular weight of chitosan was not affected and not subject to radio-degradation.³¹ The continuous chronoamperometric measurement showed a stable current response (I around -0.3 mA mL^{-1}) for 20 days under continuous discharge (Fig. 6F). This is in accordance with our previous results obtained with the Chit-MWCNT-laccase nanofibrous 3D biocathode without cross-linking.¹⁴

3.4. *In vivo* biocompatibility and biodegradability testing

Fig. 7 shows the biocathodes that were recovered after periods of 90 and 167 days *in vivo*. The chitosan film on the surface of the cathodes does not show any visible degradation. A thin tissue membrane has grown on the surface of the cathodes without strong adhesion to the film since it can be easily removed.

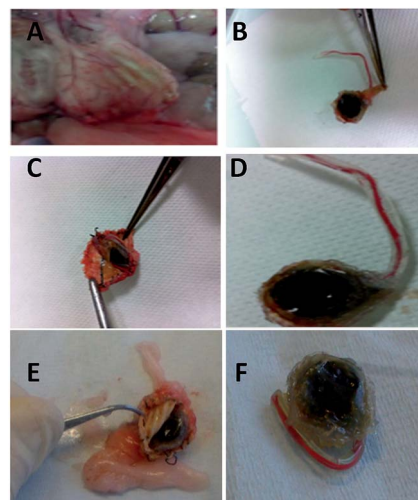


Fig. 7 Images of (A) vascularized implant, (B) connective tissue on the cathode, (C) interior of Dacron and (D) film surface after 90 days *in vivo*, (E) interior of Dacron and (F) film surface after 167 days *in vivo*.

In order to assess the biocompatibility of the implant, the membrane grown on the surface as well as samples of the tissues and organs surrounding the Dacron was histologically characterized (Fig. 8).

A slight inflammatory reaction occurred in the 14 days after implantation, as indicated by the presence of fat necrosis, fibrin and neutrophils. After 90 days, new tissues and fat layers had grown on the external side of Dacron (Fig. 8C) and a thin layer of mesenchymal tissues had grown on the internal side. After 167 days, the mesenchymal tissue growth was more pronounced on the two sides of Dacron accompanied by the presence of collagen (Fig. 8E and F). The presence of blood vessels between the tissues indicates that a new vascularized matrix grew around the implant, which is very important for the O₂ supply of the biocathode and also for the glucose supply to a bioanode. As shown in Fig. 8D, the thin tissue membrane which was present on the electrode surface was comprised mainly of a connective tissue.

The absence of inflammatory cells and the growth of new vascularized tissues after 90 and 167 days suggest that the implant was successfully integrated in the rat body. The vascularization is very important to ensure that the surrounding tissues do not form an avascular "scar" which is usually the marker of the formation of a foreign body capsule, a process to encapsulate an implant. Usually, if there is such an absence of blood supply and inhibition of integration, there will be rejection of an implant.³³ In the literature, the biocompatibility of genipin and chitosan has been reported.²¹ Kawadkar and Chauhan³⁴ demonstrated the absence of inflammatory

infiltrates after injection of a suspension in the saline of genipin cross-linked chitosan microspheres in rat knee. Bavariya and co-workers³⁵ evaluated the biocompatibility of a chitosan membrane cross-linked with genipin. This membrane exhibits a nanofiber structure and was obtained by electrospinning. The membranes were implanted subcutaneously in the back of rats. They demonstrated the absence of inflammatory cells after 2, 4 and 6 weeks. Their results showed that significant fragmentation of electrospun chitosan membranes did not occur until 20 weeks.

The SEM images of the film structure and the 3D cathode after 90 and 167 days *in vivo* are shown in Fig. 9. Despite the formation of a continuous membrane made of connective tissues on the surface of the electrode, the SEM analysis of the chitosan film shows that only few fibroblasts are present (Fig. 9B). The majority of the chitosan film surface is clean which suggests that the connective tissue adhesion was inhibited in the presence of the polymer. This can be confirmed by the absence of new cross-linking reactions with chitosan as we reported above (Fig. 2A). After 167 days *in vivo*, macrophages are present on the surface (Fig. 9B) but not across the chitosan film (Fig. 9C). This demonstrates that the chitosan film formed a successful filtration barrier. The presence of macrophages on the surface may explain the difference between the amide band in spectrum (c) and (d) (Fig. 2A). The role of chitosan in immuno-stimulation and activation of macrophages has been reported in the

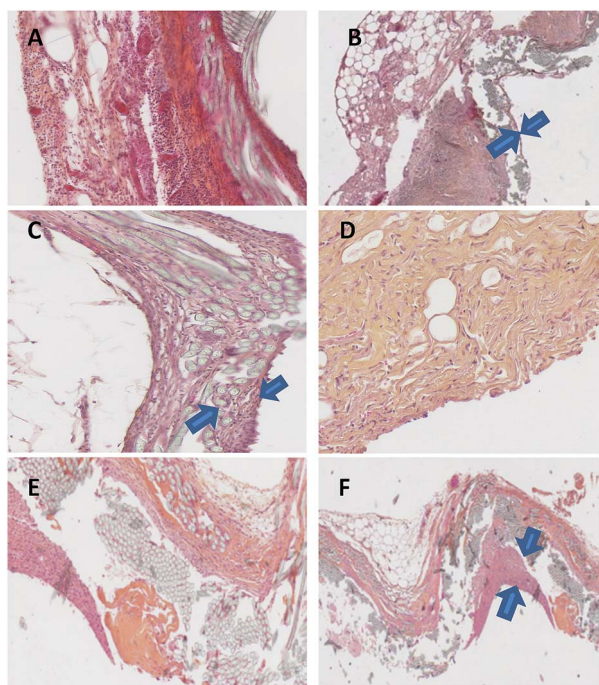


Fig. 8 Histological characterization of the implant, (A) and (B) after the period of 14 days, (C) and (D) connective tissue after the period of 90 days, (E) and (F) after the period of 167 days, the blue arrows show the tissue growth at the internal side of Dacron.

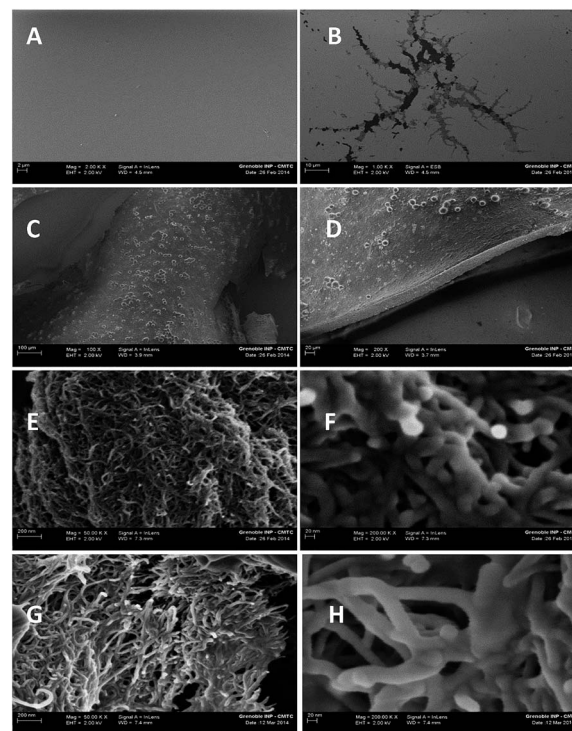


Fig. 9 SEM images of (A) and (B) the chitosan film after 90 days *in vivo*, (C) surface and (D) cross-section of the film after 167 days *in vivo*; the cross-section of the biocathode is illustrated in (E) and (F) after the period of 90 days, and in (G) and (H) after the period of 167 days.

literature.³⁴ The degree of acetylation of chitosan has an effect on the macrophage polarization. In fact, when the deacetylation degree (DA) increases, the percentage of *N*-acetyl-*D*-glucosamine units decreases. These units are recognized by the macrophage mannose receptor which is involved in the immune response.³⁷ In response to chitosan stimulation, macrophages polarize into an anti-inflammatory M2c-like phenotype.³⁶ Vasconcelos and collaborators³⁸ have studied *in vivo* the macrophage response to 3D chitosan scaffolds. They demonstrated that a macrophage M2 reparative response with lower levels of pro-inflammatory cytokines and higher levels of anti-inflammatory cytokines is induced by a lower DA. In our biocathode, we used highly viscous chitosan that had a degree of DA greater than 80%. Such a high degree of DA could potentially induce a high amount of M1 pro-inflammatory macrophages due to the immune response in the early stages after implantation. Greater numbers of M1 macrophages are indicative of higher levels of pro-inflammatory cytokines. However, the presence of genipin most likely inhibited this response due to the strong anti-inflammatory effect of genipin. Genipin inhibits the production of nitric oxide (NO), blocks cyclooxygenase-2 expression and consequently inhibits acute inflammation.³⁹ In fact, when an inflammatory event takes place, the production of NO increases. This is due to the activity of an inducible nitric oxide synthase (iNOS) which results in cell damages. Cyclooxygenase-2 plays an important role in inflammation since it is involved in the production of prostanoid-like prostaglandins. In a later stage, chitosan stimulates the polarization of anti-inflammatory macrophages. This can explain our observation of macrophages after a longer period of implantation. The fibrous structure of the chitosan matrix does not show any degradation after 90 (Fig. 9E) and 167 days (Fig. 9G). The laccase remains adsorbed on the chitosan fibres after both periods (Fig. 9F and H), which confirms the electrical connection of the enzyme and explains the catalytic current that we measured as above. This is further supported by the FTIR results (Fig. 2B) since no significant difference was noticed between spectrum (b) and (c). The absence of both new molecules inside the 3D matrix (Fig. 9E and G) and new cross-linking reactions (spectrum (b) and (c) in Fig. 2B) demonstrates that the observed macrophages were retained by the chitosan film and thus, did not reach the nanofibres.

3.5. *Ex-vivo* electrochemical characterization of the biocathode

In order to check if laccase retains its electrocatalytic activity after implantation, two implanted biocathodes were analyzed. The first one was implanted for 90 days, whereas the second was left for 167 days. For the two cathodes, the OCP at pH 7.4 was between 0.45 V and 0.48 V *vs.* SCE which is only 20 to 50 mV lower than the biocathode OCP measured before implantation. Fig. 10A and B show the chronoamperometry responses of the two biocathodes at pH 7.4 and without oxygen saturation.

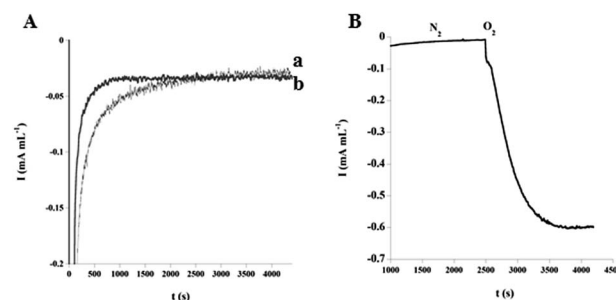


Fig. 10 (A) Chronoamperometric response of the Chit-MWCNT-laccase biocathode in air and pH 7.4, (a) after 90 days *in vivo*, (b) after 167 days *in vivo*, (B) chronoamperometric response of the Chit-MWCNT-laccase biocathode under oxygen saturation.

The measured current density is around -0.03 mA mL^{-1} (Fig. 10A), which represents about 7.5% of the measured current *in vitro* at pH 7.4. Nonetheless, these results do not allow a complete estimation of the remaining electroactive laccase available in the bioelectrode. In fact, it is possible that inside the polymer matrix, more laccase molecules remain active since the pH is different from the physiological pH of the biocathode environment. Thus, it is likely that the internal pH is more acidic, since the measured output of the enzyme was quite stable. In order to estimate the remaining laccase activity inside the biocathode, we analyzed the current output in solution near the optimum pH of laccase (pH 5) with and without O_2 saturation (Fig. 10B). Indeed, the chronoamperometric response of the bio-cathode implanted during the 167 days was recorded at 0.2 V *vs.* SCE with and without O_2 . Fig. 10B shows the appearance of a cathodic current (-0.6 mA mL^{-1}) after O_2 saturation. This response to oxygen saturation corresponds to the catalytic reduction of dioxygen by laccase. These results indicate the continued presence of immobilized enzymes which retained their activity after 167 days of implantation. The measured catalytic current density is 50% lower than that measured before implantation under oxygen saturation (Fig. 6D). Unlike the results obtained at pH 7.4, these results show that the biocathode preserves half of its electrocatalytic activity after more than five months of implantation.

From these results, we believe that the large loss of the electrocatalytic activity of the biocathode at pH 7.4 is not related to inhibition or disconnection of the majority of laccase present in the biocathode. Indeed, if laccase molecules were inhibited or disconnected we would not have observed their catalytic activity at pH 5. Consequently, the large decrease of the performance of the biocathode at physiological pH can be attributed to a modification of the microenvironment around the laccase inside the biocathode. Although a MWCNT-laccase biocathode was not stable for more than one month during *in vitro* conditions,¹² the Chit-MWCNT matrix that we prepared and reported here was able to protect the laccase during the implantation period. These results are very important for the development of an implantable glucose biofuel cell capable of operating for a long period and to the best of our knowledge, we report the first study of the lifetime of an implantable biocathode.

Table 1 Comparison of the lifetimes reported for different implanted biocathodes

Animal/location	Catalyst used in the biocathode	Operational lifetime	Reference
Rat/retroperitoneal space	Polyphenol oxidase	11 days	1
Rat/retroperitoneal space	Laccase	9 days	2
Rat/brain	Bilirubin oxidase	Several hours	6
Clams/dorso-posterior part	Laccase	Less than a week	5
Snail/between the body wall and internal organs	Laccase	2 weeks	40
Rat/jugular vein	Platinum	24 hours	3

4. Conclusions

We demonstrate that the use of a Chit-MWCNT matrix, fabricated by mechanical compression, allows construction of a biocompatible enzymatic biocathode which remains operational after more than five months implanted *in vivo* (retaining 50% of its initial electrocatalytic activity). To the best of our knowledge, this is the best performance obtained with an implanted enzymatic bioelectrode for a long period *in vivo* implanted in a freely moving animal. For comparison, the previous longest duration of performance *in vivo* was for a biocathode implanted in a snail for two weeks (Table 1).

Also, MacVittie and coworkers⁵ demonstrated that, when implanted in animals other than mammals, a GBFC with a laccase-based biocathode was operational for few days inside clams and two weeks inside a snail. No previous reports describe *ex vivo* measurements of the current response of the bioelectrodes after implantation and particularly which bioelectrode is responsible for the degradation of the output of an implanted GBFC.

In our previous work,² we demonstrated that an implantable GBFC using laccase at the biocathode was operational for 9 days inside a rat. The short lifetime of that GBFC was attributed to the loss of electrical connection of the GBFC which precluded any subsequent *ex vivo* measurements. In this study, we focussed on the biocathode since its limited stability over time usually affects the overall stability of the GBFC. The stability of the bioelectrode *in vivo* may vary depending on whether a continuous or a discontinuous discharge is applied, but those measurements require an implanted device that can report in real-time the performance of the implanted biocathode during a long period.

We report the longest *in vivo* duration for a Chit-MWCNT-laccase biocathode to maintain stable electrical output (almost 6 months). The enhanced longevity is due to a new design that resists degradation of the biocathode by the body fluids and improves the biocompatibility. Furthermore, the 3D matrix of nanofibrous chitosan cross-linked with genipin provided an efficient protective environment for laccase molecules since they retained their electrocatalytic activity in subsequent bench-top measurements after removal of the biocathode at the end of the implantation period. The new strategy reported in the present study ensured both the operational stability over time and also the *in vivo* biocompatibility of the bioelectrode. The

results we report here are important for electrochemical and biomedical communities, since they constitute the first demonstration of the biocompatibility in addition to the role of the bioelectrode design in preventing enzyme activity loss inside the body. This implantation strategy is now being tested for a biofuel cell.

Acknowledgements

We thank the ANR (MGBFC-EMMA-043, 2011–2013) and the Investissements d'Avenir (ANR-10-NANO-03-01, 2012–2016) for financial support. We thank Frédéric Charlot (CMTIC, Grenoble) for producing the SEM images and Cécile Bruzzese Sillard (Grenoble INP-Pagora) for producing the AFM images. We thank Laurent Cortella (CEA, Grenoble) for the gamma sterilization experiments and the Laboratoire des Radiopharmaceutiques Biocliniques (LRB), especially to Audrey Soubies for the care, and handling and establishing an enriching environment for the rats.

Notes and references

- 1 P. Cinquin, C. Gondran, F. Giroud, S. Mazabrard, A. Pellissier, F. Boucher, J.-P. Alcaraz, K. Gorgy, F. Lenouvel, S. Mathé, P. Porcu and S. Cosnier, *PLoS One*, 2010, 5(5), e10476.
- 2 A. Zebda, S. Cosnier, J.-P. Alcaraz, M. Holzinger, A. Le Goff, C. Gondran, F. Boucher, F. Giroud, K. Gorgy, H. Lamraoui and P. Cinquin, *Sci. Rep.*, 2013, 3, 1516.
- 3 F. C. P. F. Sales, R. M. Iost, M. V. A. Martins, M. C. Almeida and F. N. Crespilho, *Lab Chip*, 2013, 13, 468.
- 4 J. A. Castorena-Gonzalez, C. Foote, K. MacVittie, J. Halánek, L. Halámková, L. A. Martinez-Lemus and E. Katz, *Electroanal*, 2013, 25(7), 1579.
- 5 K. MacVittie, J. Halánek, L. Halámková, M. Southcott, W. D. Jemison, R. Lobel and E. Katz, *Energy Environ. Sci.*, 2013, 6, 81.
- 6 V. Andoralov, M. Falk, D. B. Suyatin, M. Granmo, J. Sotres, R. Ludwig, V. O. Popov, J. Schouenborg, Z. Blum and S. Shleev, *Sci. Rep.*, 2013, 3, 3270.
- 7 E. Katz and K. MacVittie, *Energy Environ. Sci.*, 2013, 6, 2791.
- 8 S. Cosnier, A. Le Goff and M. Holzinger, *Electrochem. Commun.*, 2014, 38, 19.
- 9 H. Shin, C. Kang and A. Heller, *Electroanal*, 2007, 19(6), 638.
- 10 F. Xu, *Biochemistry*, 1996, 35, 7608.

- 11 C. Vaz-Dominguez, S. Campuzano, O. Rüdiger, M. Pita, M. Gorbacheva, S. Shleev, V. M. Fernandez and A. L. De Lacey, *Biosens. Bioelectron.*, 2008, **24**(1), 531.
- 12 A. Zebda, C. Gondran, A. Le Goff, M. Holzinger, P. Cinquin and S. Cosnier, *Nat. Commun.*, 2011, **2**, 370.
- 13 B. Reuillard, A. Le Goff, C. Agnès, M. Holzinger, A. Zebda, C. Gondran, K. Elouarzaki and S. Cosnier, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2013, **15**, 4892.
- 14 S. El Ichi, A. Zebda, A. Laaroussi, N. Reverdy-Bruas, D. Chaussy, M. N. Belgacem, P. Cinquin and D. K. Martin, *Chem. Commun.*, 2014, **50**, 14535.
- 15 M. Rinaudo, *Prog. Polym. Sci.*, 2006, **31**, 603.
- 16 C. Peniche, W. Argüelles-Monal and F. M. Goycoolea, in *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*, ed. B. V. Elsevier, 2008, pp. 517–542.
- 17 F. Croisier and C. Jérôme, *Eur. Polym. J.*, 2013, **49**, 780.
- 18 T. Jiang, R. James, S. G. Kumbar and C. T. Laurencin, in *Natural and Synthetic Biomedical Polymers*, Elsevier Inc., 2014, pp. 91–113.
- 19 R. Jayakumar, D. Menon, K. Manzoor, S. V. Nair and H. Tamur, *Carbohydr. Polym.*, 2010, **82**, 227.
- 20 B. Krajewska, *Enzyme Microb. Technol.*, 2004, **35**, 126.
- 21 J. Jin, M. Song and D. J. Hourston, *Biomacromolecules*, 2004, **5**, 162.
- 22 R. A. A. Muzzarelli, *Carbohydr. Polym.*, 2009, **77**, 1–9.
- 23 M. F. Butler, Y. F. Ng and P. D. A. Pudney, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, 2003, **41**, 3941.
- 24 K. Yao, J. Li, F. Yao and Y. Yin, in *Chitosan Based Hydrogels – Functions and Applications*, Taylor & Francis Group, LLC, 2011.
- 25 J. Kumirska, M. Czerwicka, Z. Kaczyński, A. Bychowska, K. Brzozowski, J. Thöming and P. Stepnowski, *Mar. Drugs*, 2010, **8**, 1567.
- 26 S. Kumar, J. Koh, H. Kim, M. K. Gupta and P. K. Dutta, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2012, **50**, 493.
- 27 E. Mirzaei, R. Faridi-Majidi, M. A. Shokrgozar and F. A. Paskiabi, *Nanomed. J.*, 2014, **1**(3), 137.
- 28 Y. Dong, C. Xu, J. Wang, M. Wang, Y. Wu and Y. Ruan, *Sci. China, Ser. B: Chem.*, 2001, **44**, 216.
- 29 G. Delanoy, Q. Li and J. Yu, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2005, **35**, 89.
- 30 S. C. Fernandes, D. M. P. O. Santos and I. C. Vieira, *Electroanalysis*, 2013, **25**(2), 557.
- 31 C. Vanichvattanadecha, P. Supaphol, N. Nagasawa, M. Tamada, S. Tokura, T. Furuike, H. Tamura and R. Rujiravanit, *Polym. Degrad. Stab.*, 2010, **95**, 234.
- 32 A. Khan, T. Huq, R. A. Khan, D. Dussault, S. Salmieri and M. Lacroix, *Radiat. Phys. Chem.*, 2012, **81**, 941.
- 33 E. M. Sussman, M. C. Halpin, J. Muster, R. T. Moon and B. D. Ratner, *Ann. Biomed. Eng.*, 2014, **42**(7), 1508.
- 34 J. Kawadkar and M. K. Chauhan, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2012, **81**, 563.
- 35 A. J. Bavariya, P. A. Norowski, K. M. Anderson, P. C. Adatrow, F. Garcia-Godoy, S. H. Stein and J. D. Bumgardner, *J. Biomed. Mater. Res., Part B*, 2014, **102B**, 1084.
- 36 M. I. Oliveira, S. G. Santos, M. J. Oliveira, A. L. Torres and M. A. Barbosa, *Eur. Cells Mater.*, 2012, **24**, 136.
- 37 Z. Xia and J. T. Triffitt, *Biomed. Mater.*, 2006, **1**(1), R1.
- 38 D. P. Vasconcelos, A. C. Fonseca, M. Costa, I. F. Amaral, M. A. Barbosa, A. P. Águas and J. N. Barbosa, *Biomaterials*, 2013, **34**, 9952.
- 39 H.-J. Koo, K.-H. Lim, H.-J. Jung and E.-H. Park, *J. Ethnopharmacol.*, 2006, **103**, 496.
- 40 L. Halamkova, J. Halamek, V. Bocharova, A. Szczupak, L. Alfonta and E. Katz, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**(11), 5040.

4.1.3 Etude de la biocompatibilité et de la performance d'une biopile de 3^{ème} génération en circuit ouvert

Les résultats de biocompatibilité et de stabilité du film de chitosane lors de l'implantation pendant plus de 3 mois de bioélectrodes nous ont permis d'envisager l'implantation de biopiles complètes.

Dans les versions de biopiles implantés décrites au chapitre 1 et 2, nous avons utilisé une biopile placée dans un tampon ensaché dans un sac de dialyse. Ce tampon salin comporte des électrolytes capables de transporter facilement les protons d'une électrode à une autre. L'utilisation de chitosane facilite l'hydratation des bioélectrodes, ce qui permet de se poser les questions suivantes :

- 1) Peut-on utiliser le milieu extra-cellulaire pour hydrater la biopile ?
- 2) Peut-on considérer le milieu extra-cellulaire comme seule source d'électrolytes entre les 2 électrodes ?

Pour répondre à ces questions, nous avons implanté des biopiles en circuit ouvert dans la cavité abdominale de rats. Pour cette expérience, la mesure en temps réel de la performance de la biopile n'était pas nécessaire, car nous nous sommes intéressés en tout premier lieu à la stabilité dans le temps et à la biocompatibilité du dispositif.

Le treillis de polyester a été conservé pour éviter les phénomènes de frottement pouvant endommager le film de chitosane lors des mouvements de la biopile dans la cavité et pour ancrer rapidement l'implant. Les fils électriques reliés à la biopile ont été isolés par un vernis recouvert de silicone biocompatible. Le dispositif entier (biopile + fils) a été radio-stérilisé à 12 kGy et implanté dans la cavité abdominale de 3 rats.

Les tests de fonctionnement *in vivo* de la biopile ont été réalisés après 15 jours d'implantation. Après avoir placé les rats sous anesthésie gazeuse, les fils ont été externalisés et la biopile maintenue en intra-abdominal par suture de la paroi abdominale. Les mesures électrochimiques ont ensuite été réalisées avec un potentiostat sur l'animal endormi.

In vitro, dans un tampon PBS glucosé, le potentiel de l'anode médiatée avec de la 1-4 naphtoquinone oscille entre -0,2V et 0V suivant l'état d'oxydation du médiateur. Le potentiel de la cathode oscille entre 0,3 et 0,5V. Donc, le potentiel théorique que l'on peut obtenir en fabriquant une biopile avec ces 2 électrodes oscille entre 0,3 et 0,7V.

In vivo, nous avons obtenu un potentiel de 0,36V pour la biopile implantée chez le rat, démontrant que le milieu extra-cellulaire est suffisant pour hydrater la biopile et suffisant pour alimenter la biocathode en protons.

Les mesures de la performance de la biopile sont évaluées en traçant une courbe de puissance (P) en fonction du potentiel imposé entre les 2 électrodes (E). Cette courbe en forme de cloche permet de connaître le point de fonctionnement optimal de la biopile (Figure 4.4.1).

La courbe de puissance montre une puissance maximale aux alentours de 20 μ W/cm² pour un potentiel de 0,15 V. Après les mesures de décharge de 2 min et une chronoampérométrie durant 8 min, on peut observer une remontée du potentiel de la biopile prouvant qu'elle est toujours fonctionnelle (figure 4.4.2).

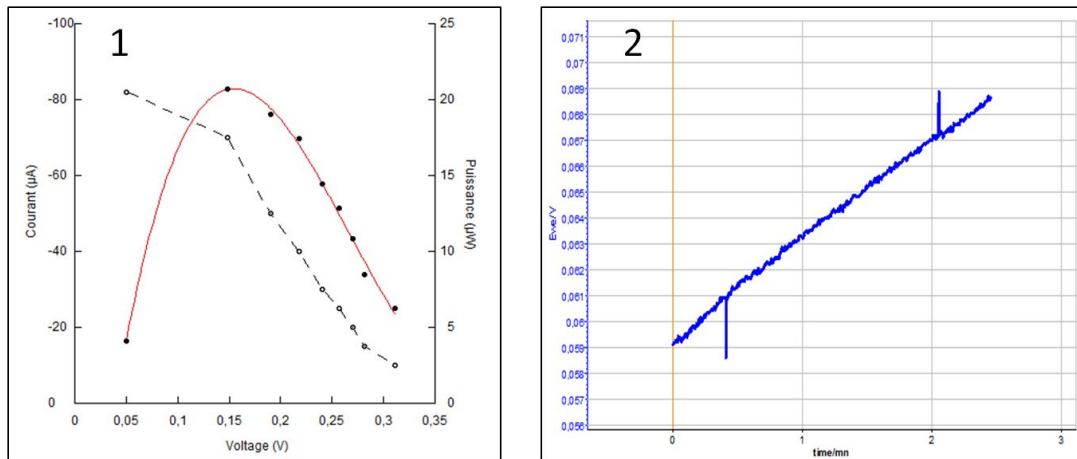


Figure 4.4 : analyse de la performance d'une biopile de 3^{ème} génération.

- 1) Courbes de puissance obtenues *in vivo* avec une biopile GOX médiatée/ laccase implantée 15 jours : puissance (ronds noirs) et courant (ronds blancs) en fonction de la différence de potentiel appliquée.
- 2) Potentiel à l'abandon après chronoampérométrie *in vivo*.

Cette étude nous a confortés dans l'idée que le milieu extra-cellulaire seul pouvait servir de source d'électrolytes entre les 2 bioélectrodes.

En revanche, l'étude macro et microscopique des implants a montré que l'inflammation pouvait gagner l'intérieur de la pastille, très certainement à cause d'une dégradation localisée de la membrane de chitosane ou des zones de contact entre chitosane et silicone.

Au niveau macroscopique, l'analyse des implants a montré une colonisation importante du treillis de Dacron par des tissus adipo-fibreux après seulement 15 jours d'implantation (Figure 4.5.1). A l'intérieur du sac de Dacron, les électrodes sont très partiellement recouvertes de fibrine et la membrane de chitosane n'apparaît pas nettement.

Au niveau microscopique, un conjonctif mésenchymateux plus ou moins organisé sépare 2 zones inflammatoires : d'un côté les fibres de Dacron[®] et de l'autre la biopile.

La zone de contact avec la membrane de chitosane est inflammatoire avec la présence de très nombreux histiocytes entourant des fragments de chitosane (Figure 4.5.2). On constate l'existence au sein des électrodes de polynucléaires neutrophiles (Figure 4.5.3).

Vers l'extérieur, on observe un tissu adipeux très richement vascularisé (Figure 4.5.4). Par endroits, un tissu fibrineux dépourvu de cellule a poussé entre le film de chitosane et la biopile.

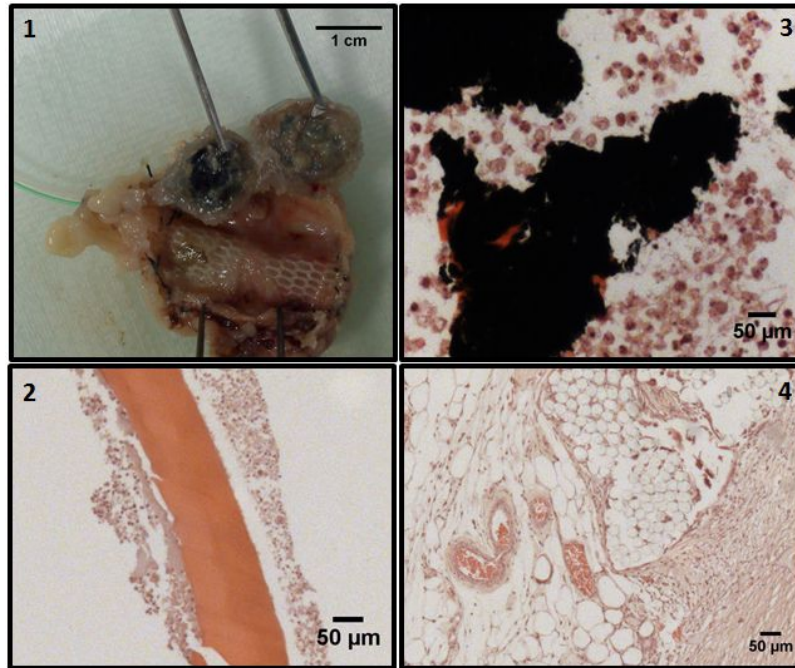


Figure 4.5 : analyse anatomopathologique de la biopile de 3^{ème} génération après 15 jours d'implantation. 1) Biopile dans l'enrobage de Dacron®. 2) Membrane de chitosane. 3) Intérieur de l'électrode. 4) réaction inflammatoire à proximité du Dacron®.

Il semble que le film de chitosane n'ait pas permis d'isoler les cellules de l'inflammation qui ont pénétré au cœur de la biopile. Les hypothèses probables sont une biodégradabilité des films préparés ou un collage de mauvaise qualité entre le film de chitosane et le silicone permettant le passage des cellules.

Quatre implantations intra-abdominales d'électrodes témoin contenant des nanotubes de carbones compressés sans enzyme pendant des périodes de 15 jours et 2 mois chez 2 rats et 2 lapins ne montrent pas ce phénomène : le film de chitosane est intact, même après 2 mois d'implantation (Figure 4.6). Il en est de même avec les biocathodes implantées décrites au paragraphe 4.1.2, ce qui tend à montrer que la présence de la laccase et son activité ne sont pas mis en cause.

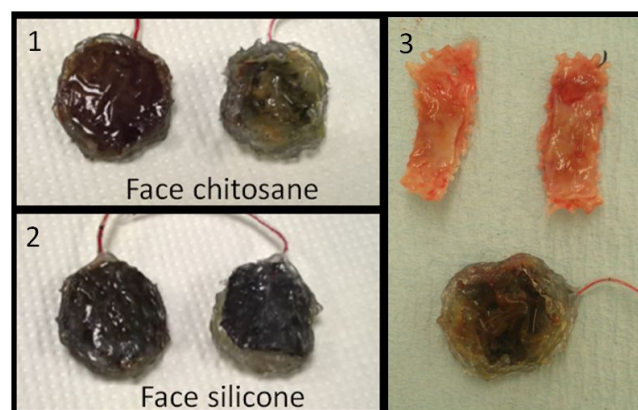


Figure 4.6 : Electrodes sans enzyme implantées 2 mois dans la cavité abdominale de rats. 1) Face chitosane. 2) Face silicone. 3) Electrode et treillis de Dacron après explantation à J60

Ces travaux ont été présentés à la conférence IEEE Biomedical Engineering Science. La publication « biocompatible implantable biofuel cell » se trouve en annexe 4.

4.2 Nouvelles techniques de mesure par télémétrie

Pour poursuivre l'optimisation, un dispositif télémétrique implantable pouvant communiquer sans fil avec un collecteur externe a été développé. Les sociétés Sorin et Biopic ont apporté cette compétence en nous livrant des capsules électroniques capable de monitorer la biopile en temps réel.

Les dispositifs implantés sont reliés par un système bluetooth low energy (BLE) à un collecteur de données externe. Une gamme de fréquence proche du GHz favorise une faible longueur d'antenne sans desservir sa portée. Pa exemple, la fréquence utilisée par Sorin est de 2,4 GHz, ce qui correspond à une antenne de 3 cm compatible avec un dispositif miniaturisé. Avec ce saut technologique, on peut suivre le potentiel de la biopile *in vivo* au cours du temps. Il devient également possible de décharger la biopile dans des résistances variables pendant des temps déterminés.

4.2.1 Dispositif télémétrique développé par Sorin Group

Le dispositif télémétrique développé par Sorin Group sera désigné sous le terme « capsule ». Cette capsule implantable (Figure 4.7 et 4.11.3) est constituée de 4 parties distinctes :

-Une antenne enrobée dans une résine epoxy (EPO-TEK). L'ensemble est réalisé en impression 3D.

-Un corps principal en alliage de titane biocompatible (Ti6Al7Nb) contenant l'électronique (modules de monitoring et de communication) et l'alimentation.

-2 zones de jonction en polymère proche de l'acrylonitrile butadiène styrène (ABS), un polymère thermoplastique.

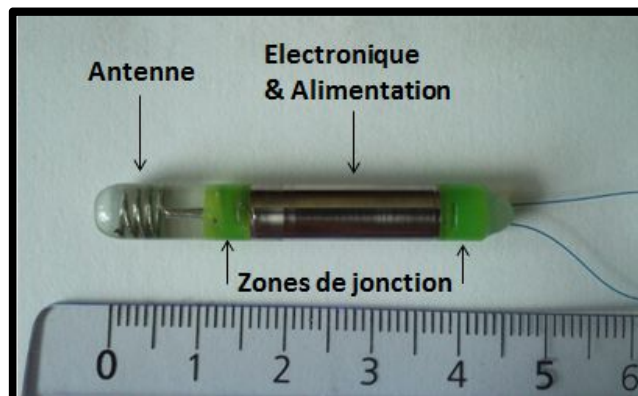


Figure 4.7 : Capsule implantable développée par Sorin Group

Des mesures de radiofréquences effectuées *in vitro* ont montré une portée de 2 m entre la base collectrice et la capsule placée à 1cm de profondeur dans un liquide simulant le muscle. Cette base relaie ensuite les données par un système filaire sur un ordinateur pilotant la capsule avec un logiciel dédié (Figure 4.8).

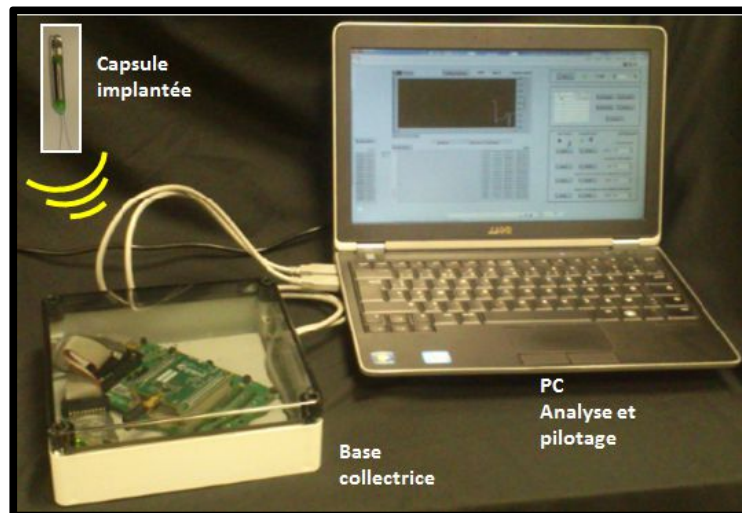


Figure 4.8 : Dispositif télémétrique développé par Sorin Group.

4.2.2 Dispositif télémétrique développé par Biopic

Le dispositif télémétrique utilisé dans les expérimentations sur brebis a été développé par la société Biopic. Cette « biopuce », implantée à vie en sous-cutané dans les animaux, permet de suivre les paramètres physiologiques des animaux pour détecter les événements de reproduction (chaleurs, mise bas) ou de pathologies en temps réel. L'électronique embarquée et son alimentation est encapsulée dans une coque étanche en polyéthylène haute densité réalisée par usinage dont le premier prototype est un cylindre en polyéthylène haute densité de 15 mm de diamètre et de 8 cm de long (Figure 4.11.3). Elle communique sans fil vers un collecteur transmettant les données à un serveur auquel on accède via une interface Web.

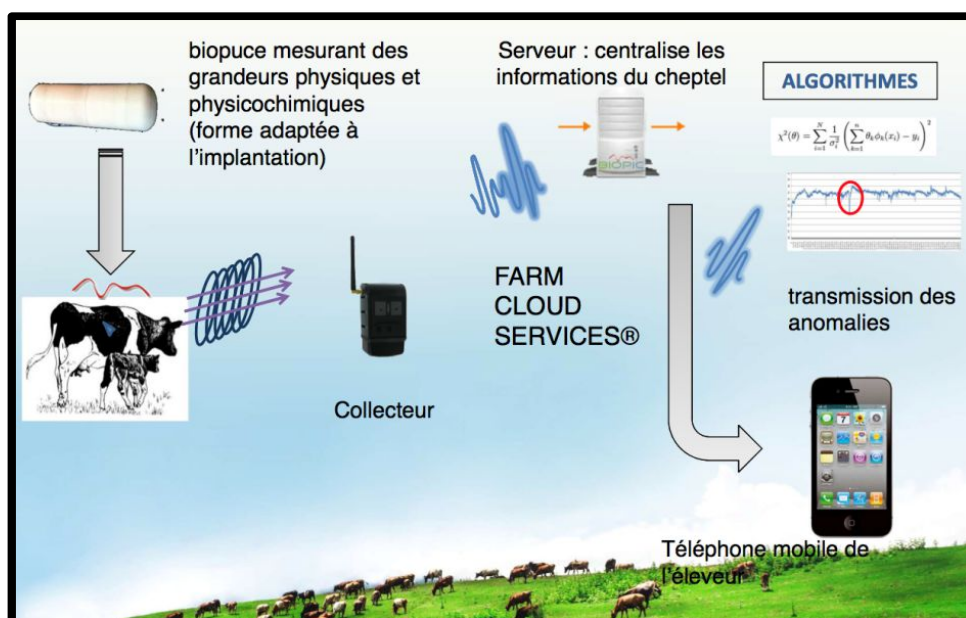


Figure 4.9 : dispositif télémétrique développé par Biopic.

Le but ultime de de cette collaboration est de pouvoir alimenter la biopuce avec une biopile. Dans un premier temps, la biopuce a été adaptée pour monitorer notre biopile. Via l'interface Web, on peut suivre son potentiel mais également piloter à longue distance et en temps réel le système pour décharger la biopile dans des résistances.

4.2.3 Raccordement électrique de la biopile aux dispositifs de télémétrie

4.2.3.1 Connectique côté biopile :

Les bioélectrodes, préparées par compression sous forme de pastille, sont connectées à un fil commercialisé par la société DSI. Ce câble est utilisé pour des implantations permettant la surveillance télémétrique de plusieurs paramètres comme la pression, l'activité, la température chez le rongeur. Il présente plusieurs avantages : il est d'un faible diamètre et sa forme spiralée lui confère une extrême flexibilité. De plus, il est revêtu d'une gaine isolante en silicone.

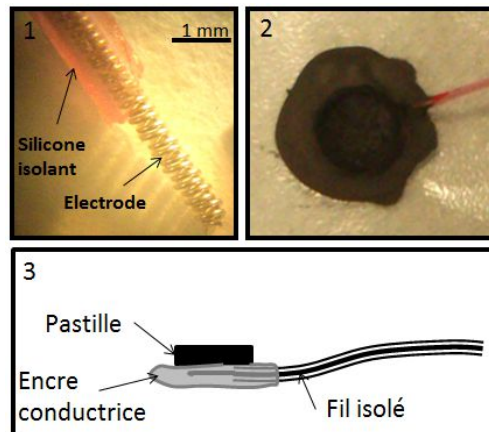


Figure 4.10 : connectique côté bioélectrode. 1) Fil spiralé isolé. 2) Bioélectrode nue pendant le collage le fil (vue de dessus). 3) Schéma du collage du fil vue de profil.

4.2.3.1 Connectique côté capsule et biopuce:

Un premier prototype de connexion a été réalisé à partir de tubes inox provenant d'aiguilles hypodermiques dont les diamètres coïncident parfaitement pour permettre un sertissage efficace. Il a été remplacé par le connecteur vendu avec les câbles, qui consiste en un tube en acier inox contenant une tige métallique de $2/10^{\text{ème}}$ de mm serti en plusieurs points pour y maintenir la tige. La connexion avec le fil spiralé est facilitée par la présence de cette tige, qui permet un guidage efficace et garantit un sertissage de bonne qualité sans court-circuit. Pour réaliser la connectique côté capsule, le micro-câble a été soudé au connecteur DSI grâce à un laser pour garantir le contact électrique et un bon positionnement (Figure 4.11.1). Il est aussi possible de sertir le fil dans le connecteur (Figure 4.11.2). La zone de transition entre le câble et le manchon connecteur est recouverte de colle silicone pour un rattrapage de niveau permettant l'isolation par les gaines thermo-rétractables, mais aussi pour garantir la flexibilité et réduire le risque de coupure du câble par cisaillement. La stérilisation des dispositifs électroniques est réalisée au V-PRO (plasma de peroxyde d'hydrogène).

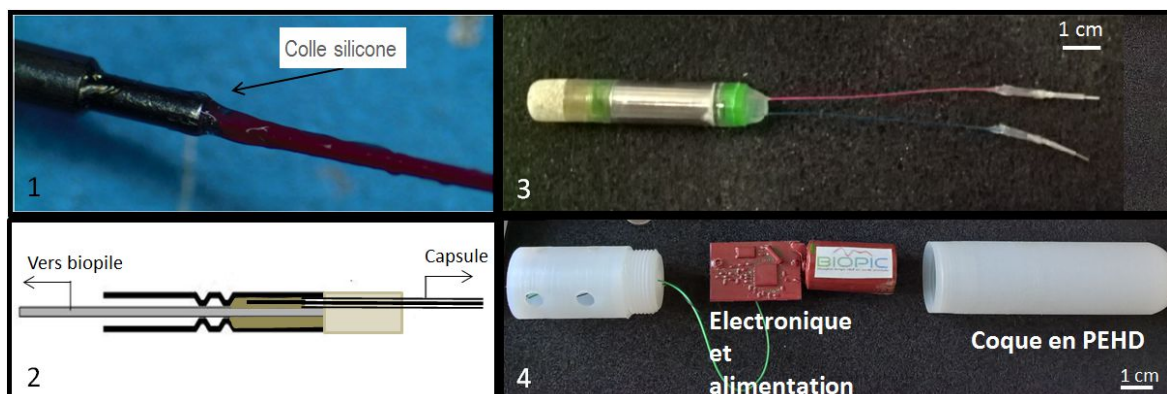


Figure 4.11 : connectique côté dispositif télémétrique. 1) Photo de la zone de transition câble/connecteur de la capsule. 2) Schéma de la fixation du connecteur côté capsule. 3) Capsule Sorin avec la connectique. 4) Dispositif ouvert de la biopuce développée par Biopic.

4.2.3.1 Assemblage

A cause de l'incompatibilité dans les méthodes de stérilisation de la biopile et du dispositif électronique de télémétrie, la connexion électrique entre ces 2 éléments a été réalisée en 2 étapes sous environnement stérile :

-Un sertissage mécanique permet de raccorder les fils provenant de la biopile et ceux de la capsule télémétrique. Cette technique offre de nombreux avantages : bon marché, elle ne nécessite que peu d'appareillage, ce qui facilite l'opération sous hotte stérile. De plus, les fils utilisés sont peu propices à la soudure.

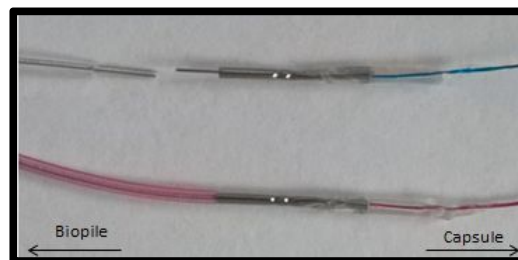


Figure 4.12 : mise en place de la connexion dispositif télémétrique-biopile. En haut, le fil face au connecteur. En bas, le fil mis en place sur le connecteur

- L'isolation électrique est réalisée avec des gaines thermo-rétractables en PET et un manchon de silicone. Cette triple couche d'isolation a montré son efficacité en évitant à la fois les blessures grâce à la souplesse du silicone et l'entrée de fluides.

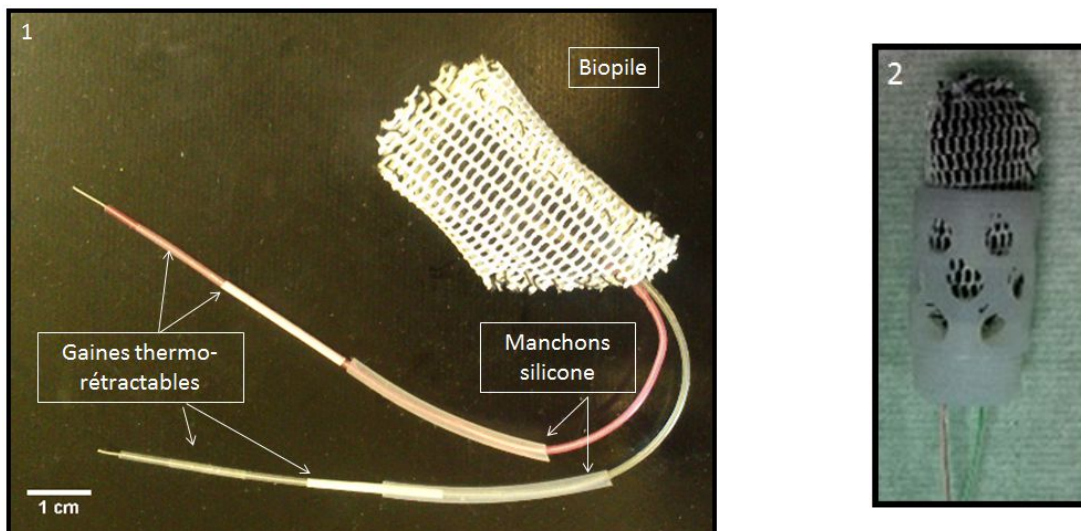


Figure 4.13 : préparation de la connectique de la biopile avant stérilisation. 1) Mise en place des différentes gaines de protection électrique pour le système Sorin. 2) Préparation du 1er prototype implantable Biopic.

Pour le système implantable Biopic, les fils de la biopile traversent le bouchon dans leur gaine silicone où ils sont collés avec de la cyanolite. Le raccordement des fils s'effectue dans la coque avec un sertissage ou une soudure. La connexion est noyée dans une résine polyuréthane à prise rapide (Odi'thane D4560). Un 2^{ème} design a été utilisé par la suite en laissant la biopile libre de mouvement au lieu de la contraindre dans le bouchon.

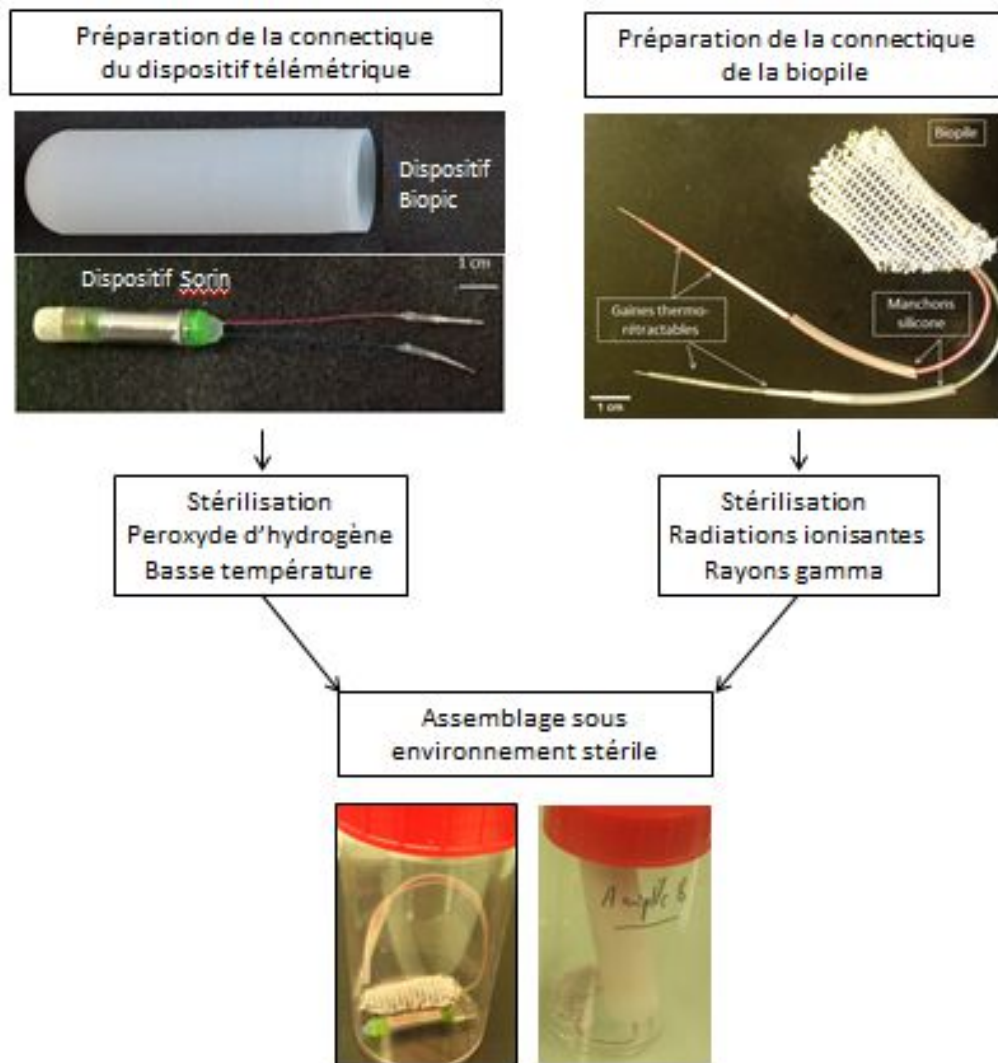


Figure 4.14 : procédure de préparation de l'implant

4.3 Implantation chez le lapin

Le passage à de plus gros animaux est une nécessité par rapport au volume du dispositif à implanter. Ce passage représente en outre un saut qualitatif d'importance. En effet, ces implantations présentent plusieurs avantages :

- Confirmer ou infirmer les résultats obtenus chez le rat concernant l'intégration du dispositif,
- Accéder à des puissances de biopile plus importantes : la puissance de la biopile est directement proportionnelle à son volume, donc l'implantation d'électrodes de plus grand volume devrait fournir plus de courant,
- Eviter une miniaturisation poussée du dispositif qui entraîne d'autres difficultés,
- Se rapprocher d'une implantation chez l'homme : le test de la biopile dans différents modèles animaux permet de mieux appréhender ce qui pourra se passer chez l'homme, lorsque la biopile alimentera des dispositifs implantés. Le rat, particulièrement résistant, est moins représentatif que le lapin ou la brebis de la manière dont la biopile sera tolérée chez l'homme.

4.3.1 Opération chirurgicale

La procédure d'opération chirurgicale mise en place est détaillée dans le protocole soumis à autorisation. Le dispositif est inséré après laparotomie sur la ligne blanche.

La ligne blanche est constituée de nombreuses couches aponévrotiques qui se croisent en passant du côté hétérolatéral. Les aponévroses constituent un feuillet de tissu fibreux reliant le muscle à son point d'attachement. Une laparotomie médiane est à la source de plusieurs inconvénients :

- La désorganisation structurale est importante
- La cicatrisation est moins rapide
- Une éventration est possible, surtout chez les gros animaux du fait du poids des viscères et de la pression intra-abdominale.

L'incision sur la ligne blanche a cependant été retenue pour plusieurs raisons :

- C'est une région peu vascularisée, ce qui évite les saignements.
- La section n'induit de lésion musculaire ni par section transversale, ni par dilacération.
- La douleur post-opératoire est donc diminuée.
- Un soin particulier a été apporté à la suture pour éviter l'éventration [9]. Le surjet simple continu pratiqué de manière extramusculaire dans les aponévroses permet de diminuer les zones d'ischémie et de nécrose. La peau est suturée point à point pour des raisons de solidité et pour prévenir l'ouverture de totale de la plaie au cas où l'animal y aurait accès.

Le lapin étant un animal d'une taille plus importante que le rat, sa cavité abdominale est soumise à une plus grande tension par le volume des organes. L'implantation d'un dispositif plus volumineux nécessite une ouverture plus large, donc plus difficile à gérer au niveau de la suture comme du suivi post-opératoire. De plus, elle peut également provoquer des complications post-opératoires sous forme d'atteintes pulmonaires avec apparition d'un syndrome restrictif dû à une limitation de l'expansion thoraco-pulmonaire. Or le lapin est un animal plus fragile que le rat, notamment en ce qui concerne l'appareil respiratoire et digestif. Il cicatrise également moins rapidement. La qualité de l'observation et les précautions prises pour l'anesthésie, l'opération (risque d'éventration plus prononcé) la gestion de la douleur et de la cicatrisation en suivi post-opératoire ont été primordiales pour s'adapter à ce modèle animal et obtenir de bons résultats. De plus, la stérilisation de l'implant a réduit le risque d'infection et donc permis de s'affranchir d'une antibiothérapie auquel le lapin est très sensible.

Dans notre cas, il s'agit d'une chirurgie propre de classe 1 d'Altemeier [10]: la laparotomie n'est pas suivie d'une intervention sur les organes, l'implant stérile est juste placé dans le quart inférieur gauche de la cavité abdominale. Le dispositif n'est pas ancré, il bouge librement dans la cavité abdominale : il trouve sa place entre les organes mais est aussi soumis à la gravité. La présence du dispositif à proximité immédiate de la cicatrice peut provoquer un phénomène d'éventration, d'une part par la pression exercée par l'implant mais également par le risque d'infection de la cicatrice. Le suivi post-opératoire et les soins apportés ont évité ce problème.

4.3.2 Suivi post-opératoire

Afin de pouvoir protéger la cicatrice, nous avons pour les premiers lapins opérés utilisé une collerette permettant d'éviter au lapin de manger les fils de la suture. Ce système a été abandonné car il complique la gestion de l'alimentation du lapin. En effet, l'apprentissage de la prise d'eau et de d'alimentation peut être fait facilement quelques jours avant l'opération mais le phénomène de cæcotrophie est plus compliqué à gérer : le lapin ne peut pas accéder à son train arrière et doit déposer ses cæcotrophes sur le fond de la cage puis les manger. Les cages ne sont cependant pas adaptées car elles sont trouées pour permettre l'évacuation des excréments.

Une solution a été trouvée avec la pose d'un pansement abdominal maintenu avec des velcros. Ce pansement a une forme de gilet entourant le cou et les pattes avant et arrière en laissant l'animal libre de ses mouvements et en lui laissant aussi la possibilité de manger ses cæcotrophes. Même si le gilet n'est pas resté intact, la pose de ce dispositif a permis d'obtenir une cicatrisation en quelques jours en évitant au lapin de toucher à sa cicatrice.

Le suivi physiologique a été réalisé par l'appréciation du comportement de l'animal implanté et par l'observation de sa courbe de poids.

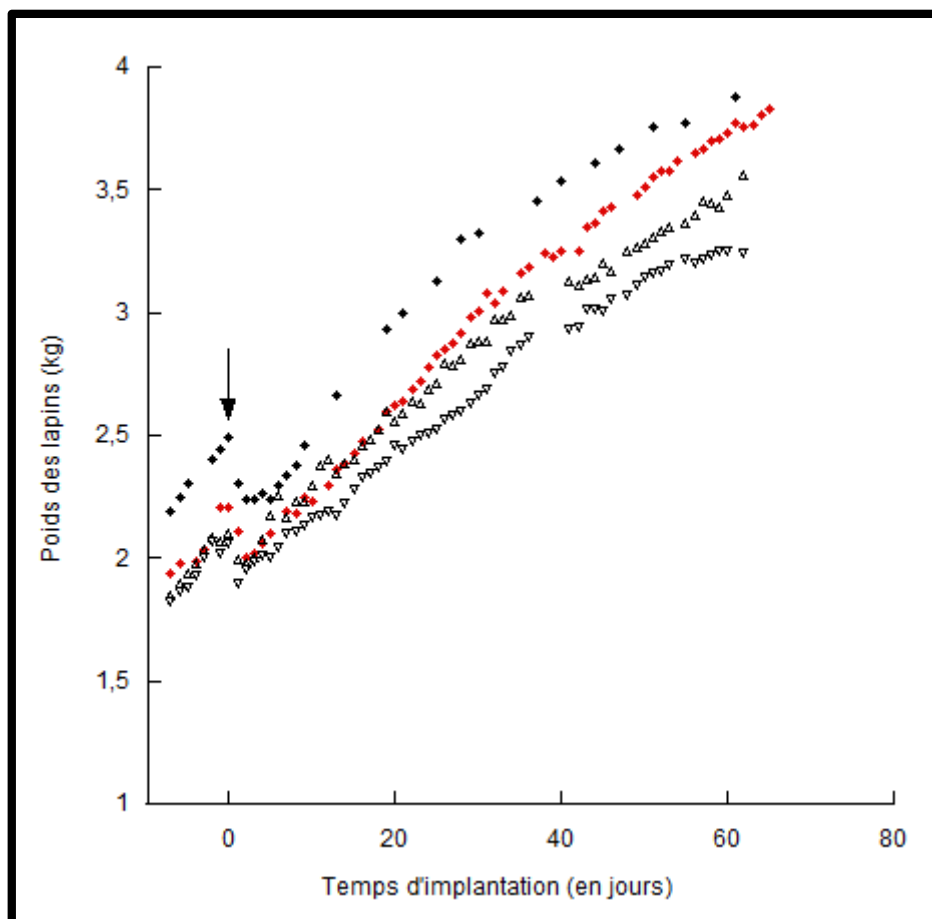


Figure 4.17 : courbes de poids des lapins implantés avec : des électrodes sans enzymes (triangles vides), une biopile en circuit ouvert (losanges noirs) et la biopile fonctionnelle suivie en télémétrie (losanges rouges).

La courbe de poids montre un léger infléchissement suite à l'opération puis l'animal reprend rapidement du poids et la courbe est régulière, signe de la bonne santé de l'animal.

L'enrichissement du milieu [11], [12] a été réalisé avec des rondins végétaux et la pesée quotidienne a favorisé une bonne acclimatation et rendu les animaux plus sociables. Même si la mesure des paramètres électriques de la biopile grâce à la mise en place du suivi télémétrique évite la manipulation des animaux, ce rapport avec l'expérimentateur a augmenté la qualité du suivi post-opératoire et très certainement la qualité des résultats obtenus.

4.3.3 Résultats de performance, de stabilité et de biocompatibilité de l'implantation d'une biopile au chitosane

Les résultats obtenus sont décrits dans l'article en préparation « Enzymatic biofuel cell with wireless external control implanted in a rabbit » présenté ci-dessous.

Enzymatic biofuel cell with wireless external control functioning for 2 months implanted in a rabbit

S. El Ichi-Ribault^{‡a}, J.-P. Alcaraz^{‡a}, F. Boucher^a, B. Boutaud^b, R. Dalmolin^b, J. Boutonnat^c, A. Zebda^{a*}, P. Cinquin^a and D.K. Martin^{a*}

^a*University of Grenoble Alpes / CNRS / INSERM / TIMC-IMAG UMR 5525, Grenoble, 38000, France*

^b*SORIN, Parc d'affaires NOVEOS 4 avenue Réaumur 92140 CLAMART CEDEX, France*

^c*Laboratory of Cytology, Biochemistry and Cytopathology, Centre Hospitalo-Universitaire Albert Michallon, B.P. 217X Cédex 9, 38043 La Tronche Cedex, France*

‡ : the authors contributed equally to first authorship of this manuscript

Broader context

Each year millions of patients improve their quality of life through surgically implanted medical devices. Recent studies report that 6% of the population of industrialized countries have used an implantable medical device [1]. The first well-known example of such a device is the heart pacemaker, but a large number of other devices exist, including artificial kidneys, artificial sphincters, drug pumps and other electrical stimulators. Moreover, the development of wireless transmission technology has opened up new prospects for monitoring and treating patients [2]. To provide the electrical power for such implanted devices the existing technology is focussed around lithium batteries. However, despite the continuous improvements in lithium battery capacity, the larger power requirement of the new generations of medical devices fails to be met [3]. Moreover, a lithium battery of sufficiently small size is not capable to supply the appropriate levels of power for implanted medical devices that are being miniaturized (e.g. leadless pacemakers that are implanted directly into the ventricle). Thus, it is clear that there is a pressing need to develop alternative energy sources that can function without the need for external charging and are capable of being miniaturized [4].

Alternative sources can provide energy scavenged from the human body through different chemical and physical processes. Physical systems utilise thermoelectric effects, piezoelectric effects, body movements, or environmental conditions but are limited to about 100 μW in the best cases due to constraints of human physiology [5]. The chemical process of enzymatic catalysis provides a promising system, since glucose is available ubiquitously as a fuel in body fluids at the reasonably constant level of 5 mmol/L in the Extra-Cellular Fluid (ECF) and appropriate enzymes for a glucose biofuel cell (GBFC) are capable to operate in physiological conditions. The Cinquin and Cosnier teams were the first to demonstrate that an enzymatic GBFC implanted in retroperitoneal space of a rat is capable to deliver electrical power from glucose and oxygen present in its body [5]. Sales and coworkers developed an implantable glucose/dioxygen hybrid enzyme–Pt micro-biofuel cell, and demonstrate that this GBFC implanted in the jugular vein of a rat, is capable to produce 200 $\mu\text{W cm}^{-2}$ [6]. Katz and coworkers demonstrated that GBFCs connected in series or in parallel deliver enough power to supply an electric motor [7] and a cardiac pacemaker [8]. Shleev *et al* [9] succeeded to produce 2 $\mu\text{W cm}^{-2}$ using a GBFC which was tested in cerebrospinal fluid and implanted in a rat's brain. Recently, Morishima *et al* [10] developed an enzymatic GBFC for cockroaches, which generated a maximum power output of 333 μW from trehalose in insect hemolymph by the trehalase and glucose dehydrogenase (GDH) reaction. Despite those considerable advances in the development of implantable GBFCs there are three major problems that reduce the GBFC performance and limit the capability for their long-term implantation. These problems include (i) the life-time of the enzymes and their low yield, (ii) biocompatibility of their components in the living body, and (iii) bio fouling phenomena of biological molecules on the surface of the implanted biofuel cell. Although much effort have been given to improve the life-time of GBFC enzymes, few studies have addressed the GBFC biocompatibility and the effect of biofouling on the stability of GBFCs. Recently, we reported the longest *in vivo* study (almost 6 months in a rat) of an implanted biocathode based on laccase confinement in chitosan-multiwall carbon nanotubes matrix, and we demonstrated that coating the biocathode with a chitosan film enhanced its biocompatibility and long term stability [11].

We now report here the first, to our knowledge, implantation of an enzymatic GBFC that is coupled to a specially designed Bluetooth wireless transmission system in order to control and monitor the GBFC performance for 2 months during implantation. The size of the complete device was designed to be suitable for implantation in a rabbit. The biocathode and the bioanode pellets (Figure 1A) were fabricated according to procedures described in a previous studies [11,12]. For the biocathode, a mixture of laccase from *Trametes versicolor* (20 mg), MWCNTs (20 mg) and viscous chitosan-genipin (40 μL) was compacted using a hydraulic press to obtain a pellet (0.5 cm^2 , 1 mm thickness). Similarly, the bioanode was fabricated into a pellet (0.5 cm^2 , 1 mm thickness) by the hydraulic compression of a mixture of MWCNTs (30 mg), Glucose oxidase (10mg), catalase (10mg), naphthoquinone (3mg). Catalase was added in the bioanode to catalyze the decomposition of hydrogen

peroxide produced by GOx in the presence of glucose and oxygen. For electrical connection, small-diameter insulated wires were connected to those bioelectrode pellets via a conductive carbon paste. The surface of each bioelectrode was coated with a dry nanoporous cross-linked chitosan film that was prepared from two solutions. The first solution comprised chitosan powder solubilized in 0.5% (v/v) acetic acid at 50°C to obtain a viscous solution of 1% (w/v) chitosan. A second solution contained genipin (6 mg mL⁻¹), 12% (v/v) DMSO and 88 % (v/v) H₂O. The first solution was stirred for 2 hours at ambient temperature, then a volume of the second (genipin) solution was added to obtain a final concentration of 4.5 % (w/v). After a further 30 min stirring at ambient temperature, 3 g of the final viscous solution was deposited on a 28 cm² non-adhesive disposable weighing tray and dried at ambient temperature (25±3°C). The resulting film was immersed in methanol and dried before coating each bioelectrode. To complete the biofuel cell, those bioelectrodes were encapsulated in a Dacron lattice before sterilization with gamma radiation at a dose of 12 kGy [13]. A teletransmission device (Figure 1B) was specially designed to control and monitor the GBFC that was implanted in the rabbit. The electronic components were enclosed within a small biocompatible capsule made from titanium alloy and EPO-TEK epoxy resin. The internal electronics to monitor and control the GBFC comprised an antenna, a battery power supply, a teletransmission module based on low energy Bluetooth.

Three GBFCs were constructed for the experiments, with one GBFC operating *in vitro* (“external GBFC”) at the same time that the other 2 GBFCs were implanted. For the *in vitro* GBFC, after sterilization with gamma radiation, this GBFC was connected to electrical resistance (100 kΩ) and stored in physiological buffer (50mL volume, glucose 5 mM, pH 7.4, 140 mM NaCl) and the voltage was recorded periodically during 3 months. The buffer solution was renewed every two weeks. The *in vivo* GBFCs for implantation, after sterilization with gamma radiation, were connected in a sterile environment to the teletransmission system and incubated in a sterile glucose buffer for 3 days in order to confirm the function of the complete systems prior to implantation. The complete systems were then implanted in the abdominal cavity of a 2 kg NZ white rabbit under gaseous anaesthesia (Figure 1C). The voltage of the GBFC in one of those complete systems (“operational GBFC”) was monitored *in vivo* during 2 months (Figure 1D). The other complete system (“biocompatibility GBFC”) was left passive during implantation and was used to assess the physiological responses after explantation. Details of the ethical statements, surgical and postoperative procedures are described in the Supplementary Information. The weight and the behaviour of the animal were checked each day.

The performance of the external GBFC operating *in vitro* in the physiological buffer is shown in Figure 2. We observed that the voltage decreased from the open circuit voltage (OCV) value of 0.65 V to 0.58 V during the first week. After the first week the voltage decreased to reach a steady-state value

of 0.34 V after two months. This result is in agreement with the previous results reporting the stability during several months of bioelectrodes made either with chitosan-MWCNTs-laccase or MWCNTS-GOX-naphtoquinone [11, 12].

The performance of the operational GBFC *in vivo* during implantation in the rabbit is shown in Figure 3. For the first 18 days of implantation the operation of the implanted GBFC was monitored by the teletransmission system. Then, after a steady-state in the OCV was reached after day 18, the teletransmission system was used to wirelessly charge and discharge the GBFC through a 100k Ω load. During the first week of implantation, the OCV decreased from 0.35 to 0.05 V and then increased in a continuous way to reach a stable value (0.42 V) after 18 days. This behavior is in agreement with our previous results on the evolution of the OCV of a GBFC implanted in rat, where the OCV goes through the two stages of (i) a decrease during few days just after implantation followed by (ii) a continuous increase during several days to reach its maximum final value. This phenomenon was observed previously with the first abiotic implanted biofuel cells in dogs in 1976 and those authors suggested that it is related to the presence of substrates and poisoning substances in the early stage of the inflammatory reaction [14]. Nonetheless, the dynamic process for the operation of the GBFC implanted in the rabbit is influenced by *in vivo* diffusional responses and the inflammatory responses. First, the glucose and dioxygen already present in the core of the GBFC can be consumed over time by unconnected enzymes. Secondly, the hydration state of the implanted GBFC is much less than in a beaker of physiological buffer and the weak diffusion of substrates toward the GBFC in the first days of implantation leads to a longer time to reach study state. Moreover, we implanted an electrochemical system in a complex medium inside the body where many small electroactive molecules can pass through the chitosan membrane to adsorb onto the electrodes and interfere with the enzymatic catalysis. This complexity is also changing with time and is associated with the inflammatory responses, which can also explain the evolution of the GBFC voltage. Nonetheless, the steady-state in the OCV reached after 18 days of implantation confirms the diffusion of the substrate into the GBFC to modify the redox potential of the enzymes that are then able to operate in an efficient manner during the following weeks of implantation. Our continuing studies are directed to distinguish the precise nature of this phenomenon to either the time needed for the establishment of thermodynamic and chemical equilibrium between the rabbit body and the GBFC, or to a physiological response of the animal to the presence of the implanted GBFC.

From the 18th day of implantation, the teletransmission system was used to wirelessly charge and discharge the operational GBFC *in vivo* through a 100k Ω load for 30 minutes each day. We observed that during the first discharges the GBFC voltage decreased by about 40 mV during the discharge and

increased during the charge to a higher value in comparison to the initial OCV value. This may be attributed to the effect of some electroactive interferons were adsorbed on the bioelectrodes surface. During discharge, some of these interferons could have been removed by oxidation (or reduction) from the surface of the bioelectrodes to lead to the increase in the OCV of the GBFC. The concentration of such compounds in blood can be relatively low but very large in ECF. These compounds include ascorbate and other vitamins, ubiquinone, urate (up to 0.4 mM), cysteine, glutathione are just some examples of this complexity in ECF medium [15]. This phenomenon was observed during the three first discharges (three days) and then, the voltage values under charge and discharge cycles were quite stable during one week. From the discharge curve, we estimate that the GBFC delivered $16 \mu\text{W}\cdot\text{mL}^{-1}$ continuously during each 30 minute discharge each day for 16 days. After 34 days, the GBFC voltage decreased considerably and reached 0.18 V at the 60th day. During this period five discharges were performed, after which the GBFC delivered $2 \mu\text{W}\cdot\text{mL}^{-1}$.

After 68 days, the rabbit was sacrificed and both the operational GBFC and the biocompatibility GBFCs were removed (see supplementary data) . The operational GBFC was then used for *ex vivo* testing of its performance. The biocompatibility GBFC was assessed for tissue reactions. Prior to the *ex vivo* performance testing the explanted operational GBFC was rinsed several times in phosphate buffer solution (pH7.4) over the course of one week. Figure S3 a shows the evolution of the OCV values of the bioanode in phosphate buffer (pH 7.4, 5 mM glucose, 140mM NaCl), before and after rinsing. After rinsing, the OCV of the bioanode decreased from -0.075 V to its pre-implantation *in vitro* value of -0.17 V. However, the OCV of the biocathode remained very low (0.1 V) even after rinsing (Figure S3 b). Since the high ionic strength of NaCl in physiological buffer can be unfavorable to the stability of protein adsorption and can also involve protein desorption [17], the biocathode was stored in a low ionic strength 10mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) without additional salt. Figure S3 b shows that the OCV of the biocathode increased to 0.37 V after storage in phosphate buffer (pH 7.4). To check if the biocathode kept its catalytic activity for oxygen reduction, we performed chronoamperometry at 200 mV in the presence and in the absence of dioxygen. Then, after discharge at 200 mV, no current was observed under N_2 saturation but a catalytic reduction current was measured to be around $34 \mu\text{A cm}^{-2}$ when the buffer solution was saturated with oxygen (Figure S4), which is 10 times lower than results observed *in vitro* [16]. Although that catalytic current is low, it is clear that some laccase in the explanted biocathode still remains connected and electroactive. Moreover, we observed that increasing the salt concentration using other salts (NaNO_3 , NaHCO_3) also resulted in a loss of the biocathode catalytic activity, which meant that what the current we observed is not simply due to the reversible inhibition of laccase by chloride. These results indicate that high salt concentration leads to laccase desorption, which is in agreement with results reported in the literature for the effect of ionic strength on the physical adsorption/desorption of proteins that is governed by

electrostatic attractive forces between the protein and the electrode surface [17]. Our ongoing studies are aimed to further investigate the details of this aspect. However, the present results indicate that the effect of NaCl concentration seems to be more pronounced in the case of the GBFC operating in the body. This observation suggests that either the surface of the MWCNTs undergoes some modification or that some molecules in the ECF affect laccase adsorption on MWCNTs. This latter possibility would suggest that some substances in the ECF have an affinity to be adsorbed on MWCNTs surface, which would lead to a competitive adsorption between them and laccase.

Figure 4 shows that, under an applied potential of 200 mV, the explanted operational GBFC was able to deliver *ex vivo* a discharge current of $4 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ during 24h in a phosphate buffer (pH 7.4, glucose 5mM, NaCl 140 mM). Even if the delivered current value is very low, this result is very important since it indicates that even after two months implanted inside an animal the operational GBFC did not lose completely its catalytic activity. That suggested that both enzymes, GOx and laccase, are capable to survive in real *in vivo* operational conditions for an enzymatic biofuel cell.

After explantation, the biocompatibility GBFC was assessed for tissue reactions. Macroscopic analysis of this GBFC shows the growth of tissues adhering to the polyester mesh and forming a thin layer of fibro-adipose tissue around the electrode. The histological analysis (Figure 5a) reveals a moderate granulomatous reaction in contact with the chitosan film, in agreement with our previous experiments [11] with an implanted biocathode enclosed in a knitted polyester prosthesis. The chitosan film is not degraded and only some patches of pus ($< 1\text{mm}$) are distributed across the surface. These observations are similar to the macroscopic and microscopic analysis of an open-circuit GBFC implanted for a similar period of time in a rabbit or in a rat [16], with a moderate granulomatous reaction associated with a more or less dense connective tissue.

Examination of the operational GBFC at autopsy showed a thin and translucent layer of mesothelium on the teletransmission device and adhesion of the Dacron lattice to mesenteric fat tissue. The opening of the polyester mesh of the operating biofuel cell reveals a thick purulent mass of material ($>3 \text{mm}$) onto the electrodes. The chitosan film lay on this cushion and is partially degraded. The microscopic analysis (Figure 5b) revealed neutrophilic polynuclear cells not well defined, undergoing lysis with a large necrotic zone with fibrin accumulation and ghost cells on the top left and a fibrohistiocytic reaction on the bottom right. The presence of inflammatory cells with polynuclei and necrosis (Figure 5b) suggests that there was a reaction of the animal possibly to a component of the device or to reaction products releasing during the operation of the GBFC. At this stage, it is difficult to know the

causes of this degradation. Nonetheless, the degradation of the polymer can be explained either by a mechanical stress generated by the growing tissues or by the products of the chemical reactions released during the operation of the GBFC (see also supplementary data).

Conclusions

We describe here the first report of the wireless monitoring and control of an enzymatic GBFC operating inside the body of a rabbit for more than 2 months. The capability to wirelessly monitor and control an implanted enzymatic GBFC provides a system that allows a deeper understanding of the long-term performance and interactions the GBFC with living tissue. These wireless measurements of the GBFC function suggest that the inflammatory reaction and biofouling of the GBFC are important factors that contribute to the degradation of the GBFC performance.

We report that the charge after discharge takes about 9 hours to recover the OCV starting value, suggesting that the diffusion of substrates is weak even at an early stage of implantation. At later stages, the cellular and additional extracellular tissue accumulation between the 2 electrodes may lead to a decrease of these diffusion processes and thus increase of the internal impedance of the GBFC. Eliminating cell growth between the 2 electrodes may not completely solve the substrate diffusion issues but will increase the performance of the GBFC. Furthermore, the preliminary results we report here suggest that the product reaction on the GBFC electrode may be responsible for an inflammatory reaction. Indeed, a two-month implantation of an open-circuit GBFC produced a moderate granulomatous foreign body inflammatory response near the bioelectrodes. For that implanted open-circuit GBFC, the chitosan films were partially degraded and patches of fibrin appeared at some places, but those responses were far less than we found with the operating GBFC reported here. Since the chitosan membrane was not degraded on a biocathode implanted for longer durations in a rat, we can assume that unconnected enzymes may be responsible for some parasitic reactions such as for the GOx to produce hydrogen peroxide and gluconic acid. Despite the presence of catalase in the anode to reduce H₂O₂ content, the ROS production and the local low pH induced by gluconic acid can lead to an increase of inflammatory reaction if macrophages are present [18,19].

The present results suggest that the next steps required to improve the *in vivo* performance of an implanted GBFC include the development of biocompatible diffusing polymers to act as a buffering diffusion barriers. These polymers need to be micro- or nanostructured so as to also reduce the initial phases of the inflammatory reaction and the biofouling in order to create a biocompatible environment for cell growth without any fibrous encapsulation.

Acknowledgements

We thank the French government program Investissements d'Avenir (ANR-10-NANO-03-01, 2012-2016) for financial support.

References

- [1] Y-H. Joung, *Int Neurorol J* 2013;17:98-106
- [2] A. Ben Amar ,A.B. Kouki and and H. Cao, *Sensors* 2015, 15, 28889-28914
- [3] R.J.M. Vullers , R. van Schaijk, I. Doms , C. Van Hoof, R. Mertens, *Solid-State Electronics* 2009, 53, 684–693
- [4] Andrea Cadei, Alessandro Dionisi, Emilio Sardini and Mauro Serpelloni, *Meas. Sci. Technol.* 2014, 25, 012003 (14pp)
- [5] P. Cinquin, C. Gondran, F. Giroud, S. Mazabrard, A. Pellissier, F. Boucher, J.-P. Alcaraz, K. Gorgy, F. Lenouvel, S. Mathé, P. Porcu and S. Cosnier, *PLoS ONE*, 2010, 5 (5), e10476.
- [6] F. Sales, R. M. Iost, M. A. Martins, M. C. Almeida and F. N. Crespilho, *Lab Chip* 13 (2013) 468
- [7] L. Halámková, J. Halámek, V. Bocharova, A. Szczupak, L. Alfonta, and E. Katz., *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 5040
- [8] K. MacVittie, J. Halamek, L. Halamkova, M. Southcott, W. D. Jemison, R. Lobeld and E. Katz. *Energy Environ. Sci.* 6 (2013) 81
- [9] V. Andoralov, M. Falk, D.B. Suyatin, M. Granmo, J. Sotres, R. Ludwig, V.O. Popov, J. Schouenborg, Z. Blum and S. Shleev, *Sci. Rep.* 2013, 3, 3270
- [10] K. Shoji, , Y. Akiyama, M. Suzukib, N. Nakamura, H. Ohno, K. Morishima., *Biosensors and Bioelectronics* 78 2016, 390–395
- [11] S. El Ichi, A. Zebda, A. J.-P. Alcaraz, Laaroussi, F. Boucher, N. Reverdy-Bruas, D. Chaussy, M.N. Belgacem, P. Cinquin, D.K. Martin. *Energy Environ. Sci.* 2015, 8 , pp. 1017–1026
- [12] B. Reuillard, A. Le Goff, C. Agnès, M. Holzinger, A. Zebda, C. Gondran, K. Elouarzakia and S. Cosnier, *Phys. Chem. Chem. Phys* 2013, 15, 4892-4896
- [13] J-P. Alcaraz, S. El Ichi-Ribault , L. Cortella , C. Guimier-Pingault C,A. Zebda , P. Cinquin, DK. Martin *Médecine/sciences* 2016, 32 (8-9), 771-773
- [14] E. Weidlich, , G. Richter, , F. Von Sturm, , J. R. Rao, A. Thoren, , H. Lagergren, *Blood Substitutes and Biotechnology* 1976 4 (3-4), 277-306.

- [15] J. L. Romette and J. L. Boitieux, *Journal of Biomedical Engineering* 1984, 6(3), 171-174.
- [16] S. El Ichi; A. Zebda, J-P Alcaraz, F. Boucher, J. Boutonnat, P. Cinquin, D. K Martin, *IEEE Conference on Biomedical Engineering and Science* 2014, Miri, Sarawak, Malaysia.
- [17] Gong, I. Szleifer, *J. Colloid Interface Sci* 2004,278, pp. 81–90
- [18] A. Lardner, *Journal of leukocyte biology* 2001, 69 (4), 522-530.
- [19] A. Riemann, H. Wußling, H. Loppnow, H. Fu, S. Reime, and O. Thews, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 2016, 1862(1), 72-81.

BROUILLON

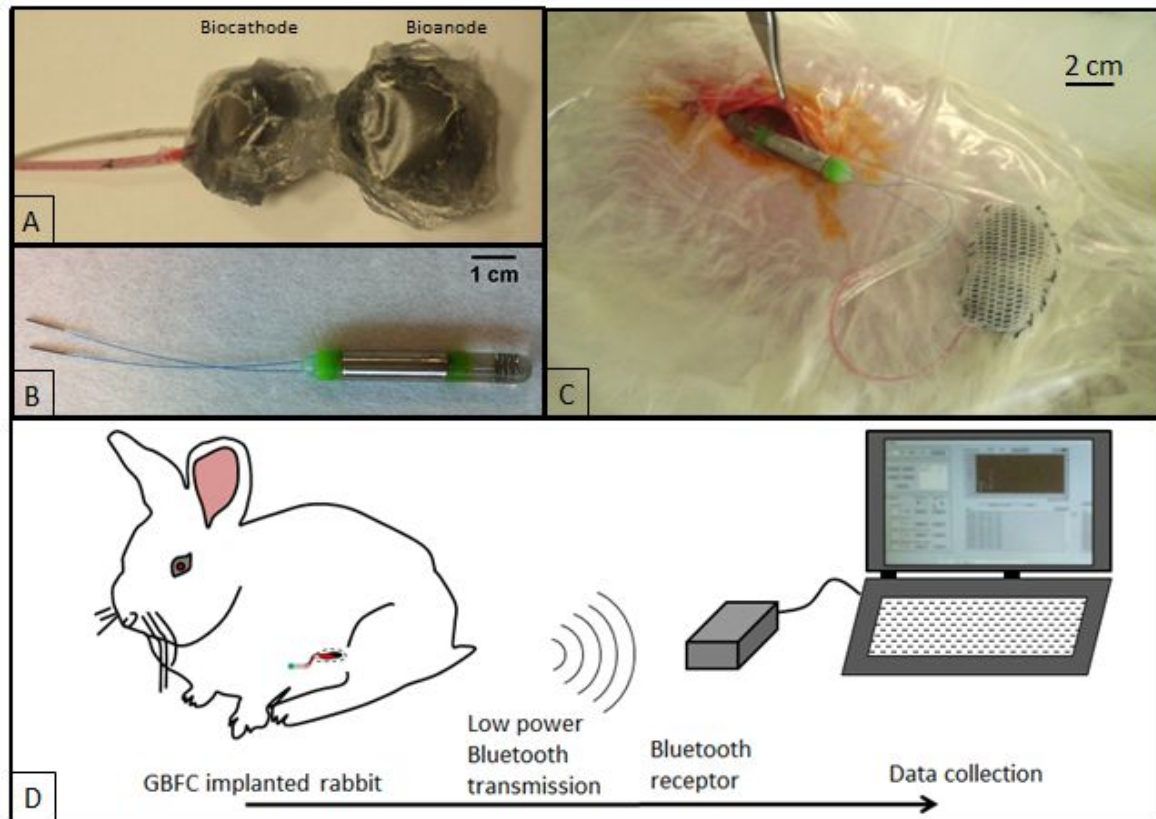


Figure 1: The enzymatic GBFC and wireless teletransmission system that were implanted in the abdomen of a rabbit. **(A)** bioelectrodes coated with the dry chitosan membranes before being encapsulated in a Dacron lattice membrane and prior to implantation, **(B)** the teletransmission system prior to implantation, **(C)** the connected GBFC and teletransmission system during implantation in the abdomen of a rabbit, **(D)** schema of wireless monitor and control system for the implanted GBFC.

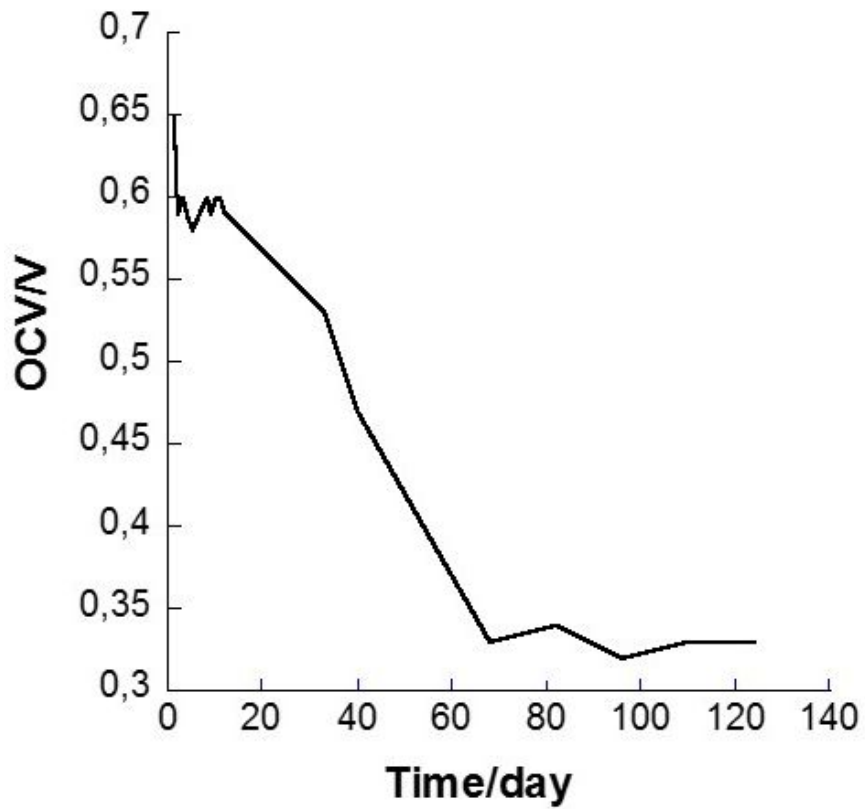


Figure 2: The *in vitro* performance of the GBFC voltage under continuous discharge condition ($R=100k\Omega$) in physiological buffer (pH7.4, 5mM glucose, 140 mM NaCl)

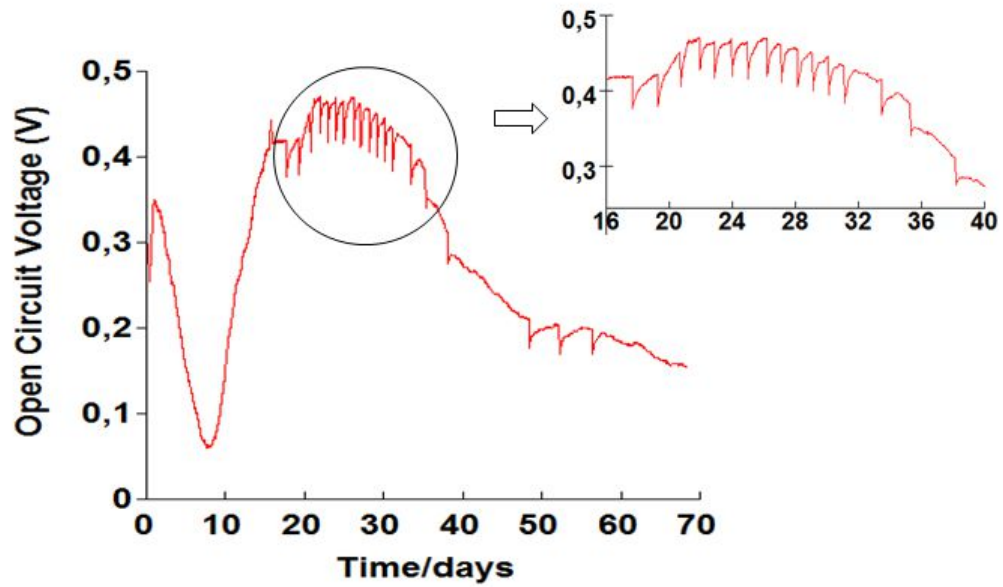


Figure 3: The performance of the implanted GBFC voltage response under *in vivo* discharge and charge, controlled by the teletransmission system, through a 100k Ω load.

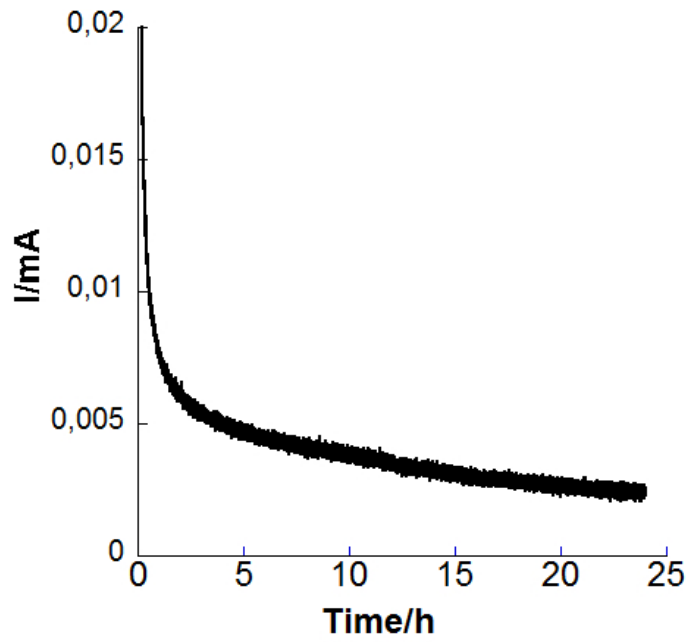


Figure 4: The *ex vivo* chronoamperometry at 200mV in phosphate buffer (pH7.4, 5 mM glucose, 140 mM NaCl) of the explanted GBFC after the period of implantation in the rabbit.

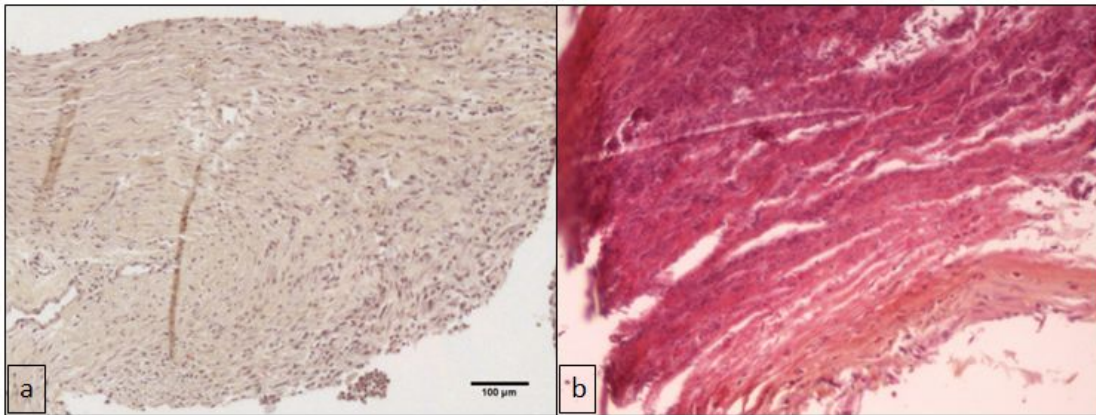


Figure 5: The inflammatory response induced by the non-functioning biocompatibility GBFC that did not contain enzymes or mediators (panel a) compared with the operational GBFC (panel b) after 2 months of implantation in a rabbit. (mag: 100x). The inflammatory process is increased (number of inflammatory cells) in fig b with the operational GBFC.

Biofuel-rabbit supplemental data

1. Ethic statements

The care of the rats was approved by the European Communities Council Directive Animal Care and Use Committee. The experiments were performed in accordance to their guiding principles (European Communities Council Directive 2010/63/EU). The protocol involving living rabbits were performed under license from the French Ministry of Agriculture (License number 38018 and 381141). The Committee on the Ethics of Animal Experiments of the Grenoble University (ComEth) approved the protocol under the number 125_LER-PRETA-JPA-02).

2. Surgical procedure

4 New Zealand White rabbit were used for this study. All rabbits were observed at least one week before implantation. They were 8 to 10 weeks old when they were implanted. The day of surgery, the rabbit were anesthetized with intramuscular injection of ketamine chloride (35mg/kg) and Xylazine hydrochloride (5 mg/kg) followed by gaseous anesthesia with isoflurane. The abdomen was shaved and prepared with povidone-iodine solution. A median laparotomy (4 to 5 cm longitudinal incision) was performed. The linked GBFC-capsule was inserted in the abdominal cavity and the abdominal walls were sutured with a continuous non interlocking technique. The cutaneous layers were sutured with independent nodes. Aluspray was used to help the cutaneous healing and an abdominal dressing was used during the first 14 days after surgery to provide ample time for surface repair. Postoperative pain was treated with subcutaneous injection of buprenorphine (0.01 to 0.05 mg/kg) followed by subcutaneous injection of carprofen (1.5 to 4 mg/kg).

Rabbit weight and behavior observations: The arrow indicates the day of implantation. During 2 days the animals lost 10% of their weight body due to the surgery but the weight increased regularly after in a normal manner until the end of the experiment. An environmental enrichment was provided with roughage rolls.

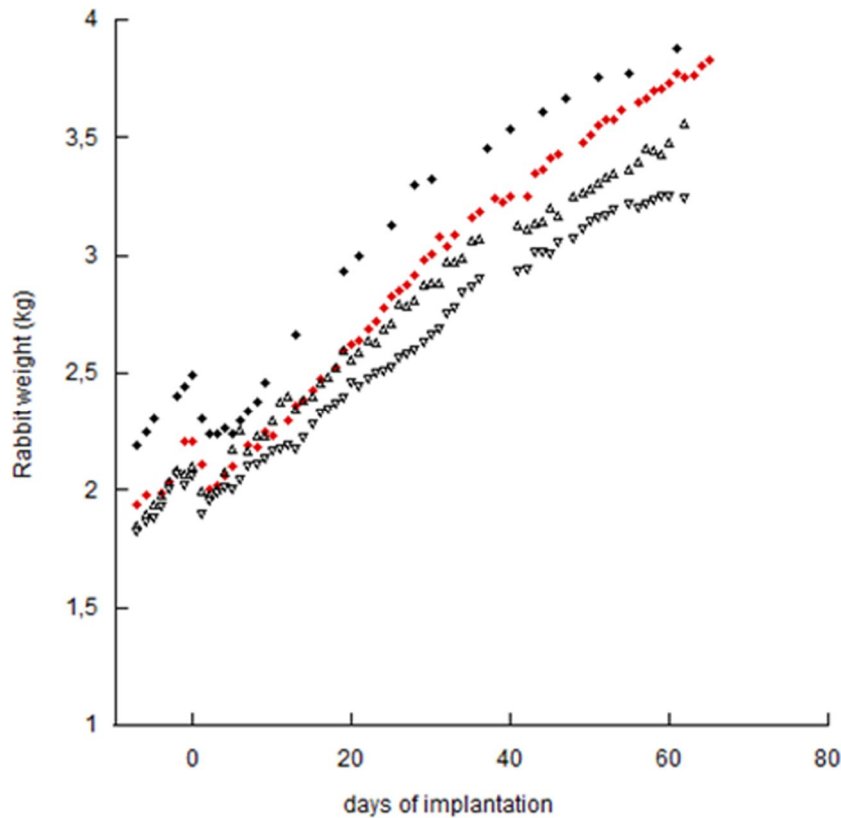
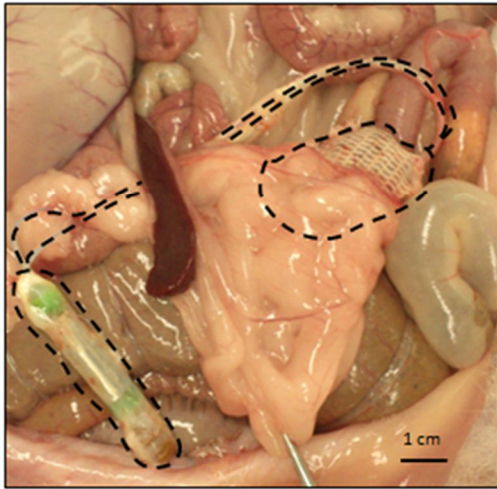


Figure S1. Triangles refers to implanted control electrode rabbits, black diamonds to open circuit implanted GBFC rabbit, and red diamond to monitored GBFC rabbit.

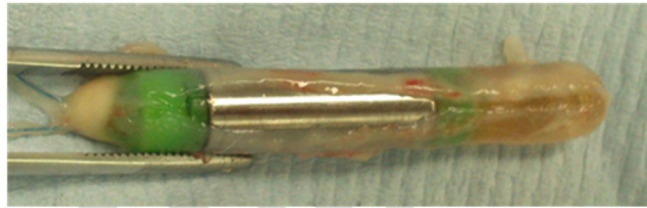
3. Euthanasia of animals:

The rabbits were euthanized using intramuscular ketamine/Xylazine ($35/5 \text{ mg.kg}^{-1}$) injection followed by intravenous phenobarbital (100mg.kg^{-1}). The peritoneal cavity was opened using a horizontal then lateral abdominal wall incision in the lower part of the abdomen. Here is an image of the implanted device during the autopsy at day 68. At the macroscopic level, a fibrous matrix is present and includes the device. The tissues are quite thin (about $100\mu\text{m}$) and appear translucent after 2 months of implantation.

a



b



S. 2 (a) The device is underlign with dashed lign. The dacron mesh is partially covered by a rich vascularized fibro-adipous tissue. All the organs looks normal. (b) Explanted device after 68 days implantation.

4. Ex vivo analysis of bioelectrodes

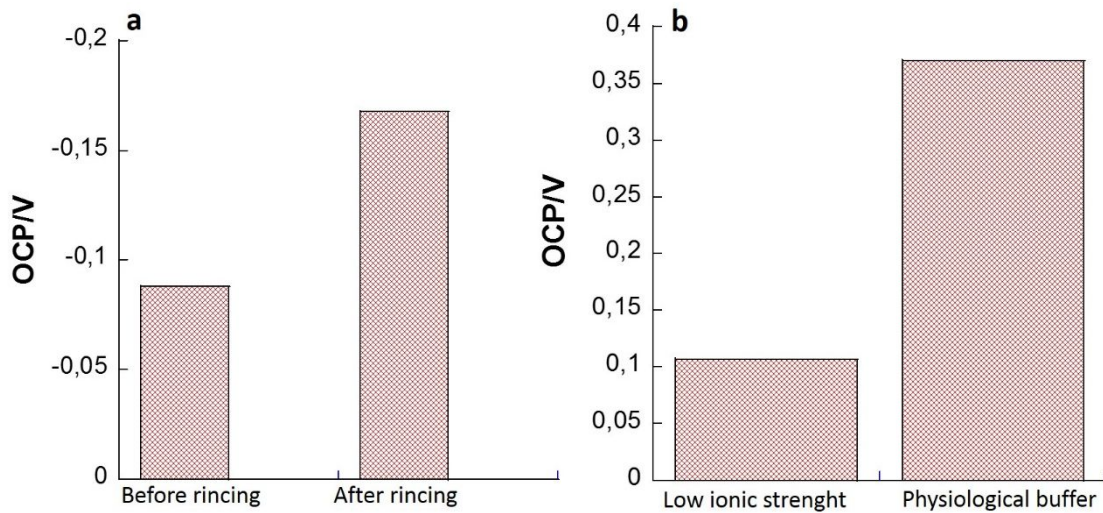


Figure S3. Ex vivo evolution of the OCP (a) of bioanode in physiological buffer, before and after rinsing, (b) and of biocathode after rinsing.

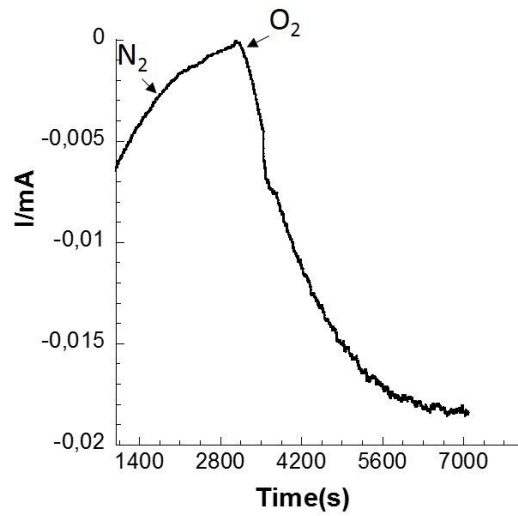


Figure S4. Ext vivo Chronoamperometric response of the biocathode at 200mV, under azote and under oxygen saturations.

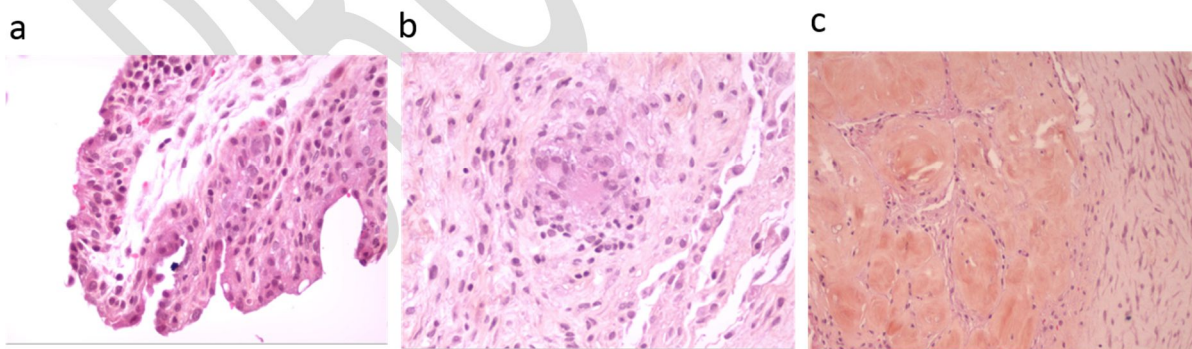


Figure S5. Histological analysis of the telemetric device with a HES staining (mag X400) (a) an area of hyperplasia of mesothelial cells due to a normal reaction process to implantation. At these places, the mesothelial cells can be large but they are stacked on each other. (b) An area of disseminated granulomatous foreign body reactions in contact with the device shown by mesothelial cells well separated from each other. The reaction is predominantly histiocytic, strong in places, low in other

locations, perhaps due to the difference component of the device materials. (c) A collagenous tissue area more or less dense well highlighted by the color saffron.

5. Bioavailability of substrates

One rabbit died 2 days after implantation due to fulminant hepatitis, without obvious link with the implantation. The death of the animal stopped the diffusion process and the voltage quickly dropped to 0V. The biofuel cell was explanted and put in 60ml of 50mM glucose buffer without stirring: The voltage quickly increases to 0.54V then stabilize around 0.4V after 2 days.

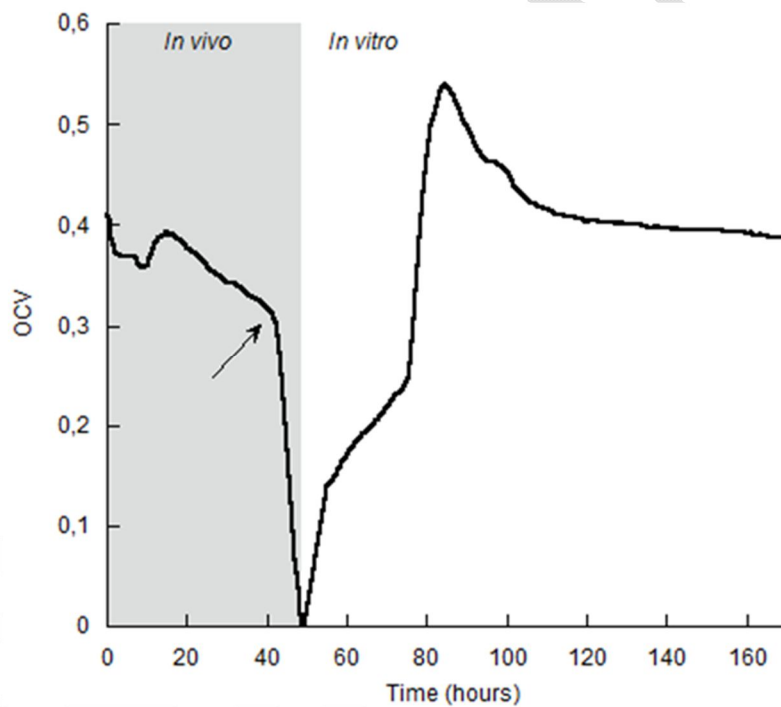


Figure S6. GBFC OCV as a function of time. The rectangles show the transition from *in vivo* to *in vitro*. The black arrow indicates the death of the animal.

6. Implanted open circuit GBFC

2 months implantation of an open circuit GBFC reflects a moderate granulomatous foreign body inflammatory response near the bioelectrodes. Around the Dacron mesh, a connective tissue is organizing with a trend forward densification. The chitosan films show some degradation and patches of fibrin appears at few places, but the response is far less than with the operating biofuel cell.

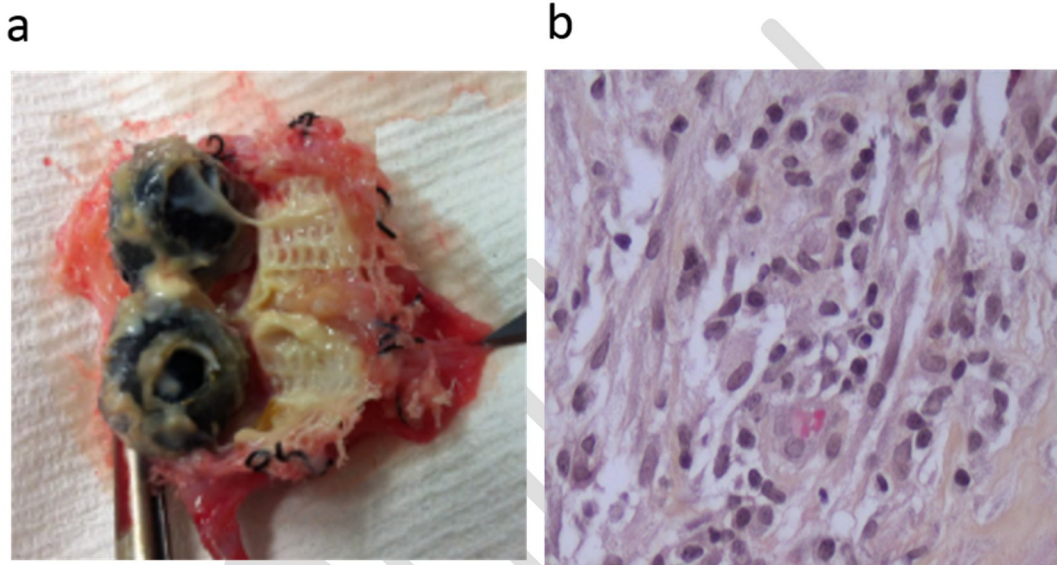


Figure S7. (a) Explanted non-functioning biocompatibility GBFC after 2 months, (b) Granulomatous reaction with polymorphonuclear geant cells (mag. X400)

4.3.4 Analyse anatomo-pathologique de l'implant téléométrique

Nous avons également analysé l'intégration de l'implant téléométrique. Au niveau macroscopique, une gangue fibreuse est présente et englobe la capsule. Les tissus qui la recouvrent sont assez fins (environ 100 μm) et d'un aspect transparent après les 2 mois d'implantation.



Figure 4.18 : capsule Sorin implantée en intra-abdominal chez le lapin pendant 68 jours.

L'analyse microscopique permet de différencier 3 zones :

-Une zone (1) d'hyperplasie de cellules mésothéliales due à un processus réactionnel normal à l'implantation. Les cellules mésothéliales tapissent la paroi péritonéale. Le processus inflammatoire induit une prolifération des cellules mésothéliales. A ces endroits, les cellules mésothéliales peuvent être grandes, mais elles sont empilées les unes sur les autres.

-Une zone (2) de réactions granulomateuses disséminées au contact du dispositif, montrée par des cellules mésothéliales bien séparées les unes des autres. Il n'y a pas de réaction inflammatoire de type polynucléaire ou de lymphocytes. La réaction est à prédominance histiocytaire, elle est variable en intensité, forte par endroits, faible à d'autres, peut-être due à la différence de matériaux composant le dispositif.

-Une zone (3) de tissus collagéniques plus ou moins denses bien mis en évidence par la coloration au safran.

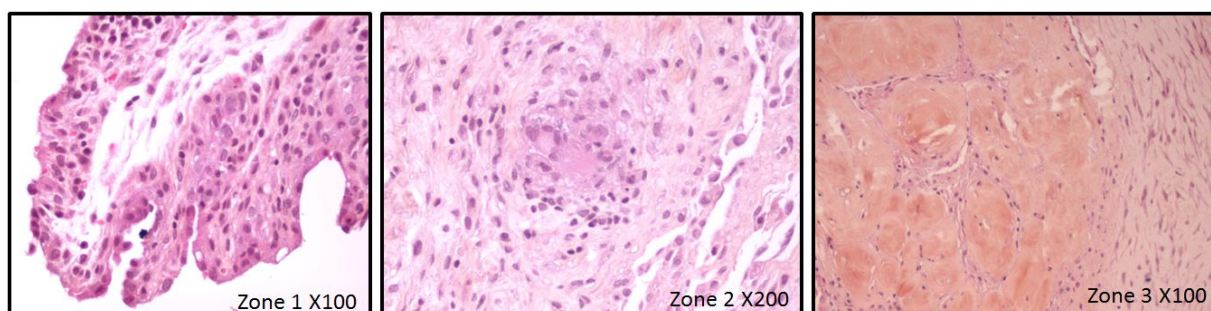


Figure 4.19 : Analyse microscopique des tissus enrobant la capsule implantable.

4.4 Implantation chez la brebis

Les implantations menées dans ce cadre n'ont pour l'instant pas donné de résultats satisfaisants en termes de performances électriques, car nous nous sommes heurtés à des problèmes techniques de connectique et de transmission de données. Cependant, nous avons pu approcher plusieurs aspects qui méritent d'être soulevés dans le cadre de cette thèse.

Chez la brebis, la différence de taille entre l'animal et de la biopile peut justifier une implantation sous-cutanée, car on diminue de façon importante le risque de nécrose tissulaire autour de l'implant. Une expérimentation menée chez le rat avec des implants en titane pénétrant ou non la paroi péritonéale montre que la réaction inflammatoire est juste retardée si l'implant est pénétrant mais qu'une capsule finit par se former sur le matériau. De plus l'opération chirurgicale et les suites opératoires sont alors plus simples à gérer. Cependant, pour nous baser sur l'expérience acquise avec les rats et les lapins, une implantation sous-cutanée et des implantations intra-péritonéales ont été réalisées.

4.4.1 Mesures électriques de la biopile

Nous avons pu observer des variations du potentiel de la biopile implantée en intra-abdominal dans les premiers jours d'implantation avec une perte puis une remontée de potentiel à J5, phénomène déjà discuté plus haut. Dans cette expérience, le potentiel de la biopile a été suivi in vitro pendant plus de 15 jours en environnement stérile avant son implantation, ce qui a permis une hydratation de l'électrode : on observe que le potentiel diminue dans des proportions moindres. La transmission des données a été interrompue à J5 à cause d'une fuite qui a endommagé les circuits électroniques.

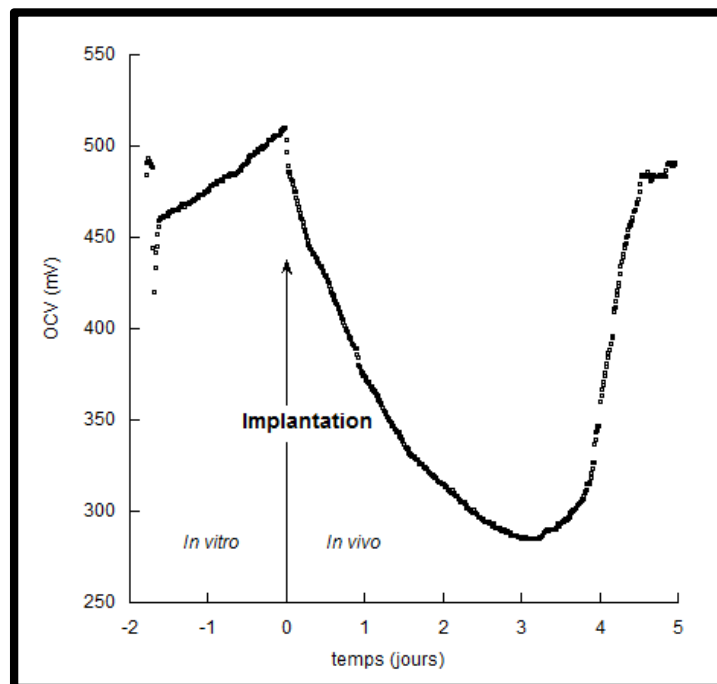


Figure 4.20 : évolution du potentiel de la biopile lors de l'implantation d'une biopile en intra-abdominal chez la brebis

4.4.2 Analyse de l'implant après autopsie

Nous avons confirmé les résultats d'anatomo-pathologie obtenus chez les autres espèces animales (rat, lapin) à court terme (15 jours) et moyen terme (1 mois ½, 4 mois) avec une incorporation du treillis de Dacron dans un tissu adipo-fibreux et la dégradation du film de chitosane avec le temps.

La taille de l'animal nous a permis de réaliser des implantations en intra-péritonéal, mais aussi en sous-cutané. Pour ces implantations, la biopile était protégée en très grande partie par une coque trouée en polyéthylène haute densité (PEHD) formant également le corps de la biopuce. Le PEHD génère rapidement une épaisse gangue de tissus fibreux pouvant atteindre le millimètre, et ce quel que soit le lieu d'implantation.

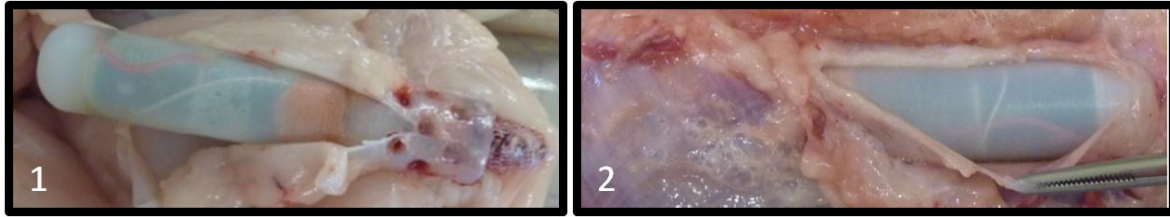


Figure 4.21 : biopile implantée chez la brebis pendant 49 jours. 1) En intra-abdominal. 2) en sous-cutané

La gangue fibreuse qui recouvre le PEHD est plus dense et beaucoup moins vascularisée que ce que l'on a observé sur le dispositif en alliage de titane et thermoplastiques pour les implantations chez le lapin. Il n'y a pas de différence anatomique significative entre les couches fibreuses observées à 15, 49 ou 167 jours. De même, il n'y a pas de différence non plus entre un dispositif implanté en sous-cutané ou en intra-abdominal après 49 jours.

Le placement de la biopile dans la coque PEHD n'est pas en faveur d'une diffusion des substrats à cause de l'encapsulation de la coque. Ce phénomène est d'autant plus remarquable en sous-cutané où les tissus colonisent très rapidement l'espace laissé par les trous dans le PEHD avec des adhérences très fortes au Dacron.

4.5 Bilan des implantations de biopiles de 3^{ème} génération:

Les dispositifs télémétriques que nous avons utilisés sont constitués de matériaux différents chimiquement. Or, la structure chimique et l'état de surface des biomatériaux implantés ont une influence sur la réponse inflammatoire dans un délai court et sur le type d'intégration obtenu après une plus longue période d'implantation.

Avec l'implant en PEHD, les tissus ne sont pas adhérents et l'implant s'encapsule rapidement. Ce n'est pas un problème pour la biopuce seule car même encapsulée, elle peut continuer à fournir des informations à la base. En revanche, si on veut alimenter ce dispositif avec une biopile, il convient de trouver un moyen d'enrober le dispositif entier par un matériau poreux, non biodégradable et générant peu de fibrose. Il en est de même avec l'implant en titane/EPO-TEK/polymère utilisé pour le suivi télémétrique du lapin, même si cette encapsulation a l'air d'être moins prononcée.

Il est connu depuis longtemps que les implants à surface lisse ont plutôt tendance à provoquer une réponse d'encapsulation fibreuse plus ou moins importante. Ces phénomènes étaient déjà observés lors de l'utilisation d'électrodes biogalvaniques poreuses dans les implantations de ce type de piles [13] : non seulement, on pouvait multiplier par un facteur 6 la performance de la pile mais la réaction aux corps étrangers était nettement moins sévère. Une implantation d'un dispositif en titane recouvert ou non d'hydroxyapatite pour aider la reconstruction osseuse datant de 1987 [14], [15] montre bien ce phénomène : les auteurs observent une repousse cellulaire osseuse favorisée par le dépôt d'hydroxyapatite par rapport au titane seul encapsulé par une gangue fibreuse. La micro et nanostructuration en surface des matériaux et polymères mous sont maintenant accessibles avec l'utilisation par exemple de lasers pulsés permettant le contrôle de la mouillabilité et de la rugosité de surface. Le laser offre en outre un autre avantage au sens où il évite les contaminations.

Les implants à base de PEEK (polyétheréther cétone, un thermoplastique polymère organique) révèlent la même encapsulation fibreuse que le titane seul [16], [17]. Ces implants remplacent de plus en plus le titane dans la fabrication de prothèses cervicales que l'on peut alors imager finement sous IRM ou scanner. Cependant, cette encapsulation n'est pas toujours compatible avec une ostéointégration. Une publication récente montre une meilleure

intégration d'un alliage de titane microtexturé par rapport au PEEK et analyse finement la réponse inflammatoire et la différenciation ostéoblastique grâce à une puce ARN [18].

Voici un schéma récapitulatif des implantations réalisées avec la nouvelle génération de biopile au chitosane. Mes contributions sont en couleur rouge.

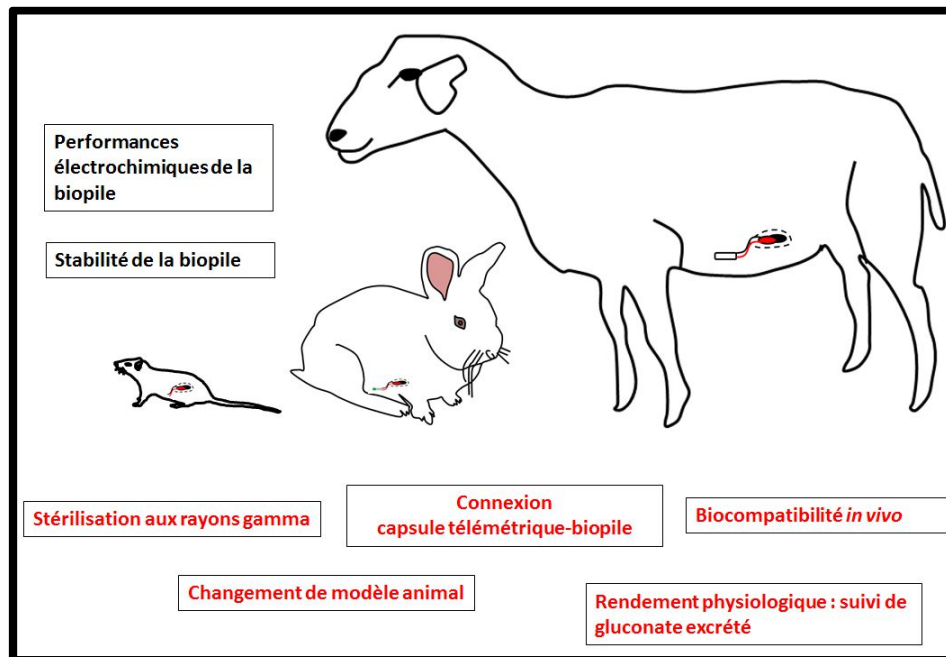


Figure 4.22 : Optimisations réalisées pour l'implantation d'une 3ème génération de biopile.

Les expérimentations menées *in vivo* avec l'implantation de biopiles sur des durées de 15 jours à quelques mois ont révélé les points suivants à prendre en compte :

1) Les bioélectrodes sont « encrassées » par des substances électro-actives pouvant gêner le fonctionnement de la biopile.

Une requête sur web of science avec les mots clé « fouling » et « biosensor » ne renvoie que 227 références, avec 16 à 18 articles par ans depuis 5 ans. Autant dire que l'étude de ce phénomène reste marginal et les solutions trouvées jusqu'à présent par les scientifiques sont de courte durée. Ce phénomène est pourtant primordial pour des implantations à long terme dans l'organisme. En effet, les protéines sont les premières molécules entrant en contact avec l'implant et ce contact conditionne la réponse de l'hôte à ce corps étranger. L'intérêt pour ce type d'étude est cependant grandissant comme le montre la croissance exponentielle du nombre de citations des articles s'intéressant à l'encrassement des membranes.

Différentes stratégies existent pour limiter l'encrassement [19], [20] : (i) la pré-adsorption de matériel avec des molécules ayant des propriétés anti-inflammatoires. La limite est la stabilité à long terme notamment le déplacement de protéines pré-adsorbées par des molécules de l'immunité (anticorps ou complément) ou leur dégradation par les leucocytes. (ii) La pré-adsorption de matériel avec des cellules : les limites sont alors l'approvisionnement en cellules, la compatibilité donneur/receveur. (iii) L'utilisation d'un polymère enrobant qui doit avoir les spécificités suivantes :

- Non toxique
- Inhibiteur du biofouling

-D'épaisseur et de perméabilité compatibles avec le fonctionnement de la biopile

-Déposable sur une grande variété de biomatériaux d'architecture différente

-Robuste mécaniquement, chimiquement et électriquement pour résister au traitement de surface, à la stérilisation, au geste chirurgical ainsi qu'à l'environnement in vivo.

A ce titre, des dépôts à base de PEG dont on peut faire varier la longueur, la forme, la densité ou l'utilisation de polymères sous la forme d'hydrogels nous semblent une alternative intéressante pour augmenter la durée de vie de fonctionnement de ces biopiles implantables.

2) La biodégradabilité du film de chitosane, vraisemblablement due à l'environnement acide généré par le fonctionnement de l'anode et à la production de ROS.

Une autre hypothèse implique la stérilisation aux rayons gamma. En effet, le chitosane, bien que réticulé avec de la génipine, reste un polymère naturel dont on ne peut exclure une dépolymérisation des chaînes glycosidiques [21], et donc une fragilisation de la structure du film.

3) L'encapsulation progressive de la biopile, causée par une réaction granulomateuse, qui est une réponse inflammatoire chronique secondaire, avec l'apparition d'une fibrose lâche et cellulaire limitant les échanges. L'évolution de cette fibrose vers un tissu plus dense en collagène et pauvre en cellules rendra les échanges de plus en plus difficiles, donc rendra la biopile non fonctionnelle.

Tout doit être fait pour limiter la réponse inflammatoire initiale et de nouveaux matériaux poreux, non biodégradables sont actuellement testés dans l'équipe. Il nous semble pour cela intéressant de travailler avec un matériel polymérique synthétique, plus à même de résister aux « agressions » du système immunitaire.

Dans ce cadre, la thèse « encapsulation de dispositifs symbiotiques implantables : évaluation de la biocompatibilité et des performances » réalisée dans l'équipe par Géraldine Penven [22] offre des perspectives intéressantes avec une piste prometteuse de membranes d'alcool polyvinylique (PVA).

4.6 Références du chapitre 4

- [1] B. Reuillard, A. Le Goff, C. Agnes, M. Holzinger, A. Zebda, C. Gondran, K. Elouarzaki, & S. Cosnier, « High power enzymatic biofuel cell based on naphthoquinone-mediated oxidation of glucose by glucose oxidase in a carbon nanotube 3D matrix », *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 15, n° 14, p. 4892–4896, 2013.
- [2] M. Ash et I. Ash, *Handbook of preservatives*. Endicott, NY: Synapse Information Resources, ISBN n°1-890595-66-7, 2009.
- [3] A. S. Wilson, C. D. Davis, D. P. Williams, A. R. Buckpitt, M. Pirmohamed, & B. K. Park, « Characterisation of the toxic metabolite (s) of naphthalene », *Toxicology*, vol. 114, n° 3, p. 233–242, 1996.
- [4] K. Ollinger & A. Brunmark, « Effect of hydroxy substituent position on 1, 4-naphthoquinone toxicity to rat hepatocytes. », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 266, n° 32, p. 21496–21503, 1991.
- [5] M. Rasmussen, A. Shrier, & S. D. Minter, « High performance thylakoid bio-solar cell using laccase enzymatic biocathodes », *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 15, n° 23, p. 9062–9065, 2013.
- [6] S. El Ichi, A. Zebda, A. Laaroussi, N. Reverdy-Bruas, D. Chaussy, M. N. Belgacem, P. Cinquin, & D. K. Martin, « Chitosan improves stability of carbon nanotube biocathodes for glucose biofuel cells », *Chemical Communications*, vol. 50, n° 93, p. 14535–14538, 2014.
- [7] S.-F. Wang, L. Shen, W.-D. Zhang, & Y.-J. Tong, « Preparation and mechanical properties of chitosan/carbon nanotubes composites », *Biomacromolecules*, vol. 6, n° 6, p. 3067–3072, 2005.
- [8] Y. Liu, M. Wang, F. Zhao, Z. Xu, & S. Dong, « The direct electron transfer of glucose oxidase and glucose biosensor based on carbon nanotubes/chitosan matrix », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 21, n° 6, p. 984–988, 2005.
- [9] R. R. Whitfield, H. F. Stills, H. R. Huls, J. M. Crouch, & W. W. Hurd, « Effects of peritoneal closure and suture material on adhesion formation in a rabbit model », *American journal of obstetrics and gynecology*, vol. 197, n° 6, p. 644–e1, 2007.
- [10] W. A. Altemeier, W. R. Culbertson, & R. P. Hummel, « Surgical considerations of endogenous infections—sources, types, and methods of control. », *The Surgical clinics of North America*, vol. 48, n° 1, p. 227–240, 1968.
- [11] S. Poggiagliolmi, S. L. Crowell-Davis, L. C. Alworth, & S. B. Harvey, « Environmental enrichment of New Zealand White rabbits living in laboratory cages », *Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research*, vol. 6, n° 6, p. 343–350, 2011.
- [12] T. Gidenne & F. Lebas, « Le comportement alimentaire du lapin », *Proc.: 11èmes Journées de la Recherche cynicicole*, p. 29–30, 2005.
- [13] E. Weidlich, G. Richter, F. Von Sturm, J. R. Rao, A. Thoren, & H. Lagergren, « Animal experiments with biogalvanic and biofuel cells », *Biomaterials, medical devices, and artificial organs*, vol. 4, n° 3-4, p. 277–306, 1976.
- [14] S. D. Cook, J. F. Kay, K. A. Thomas, & M. Jarcho, « Interface mechanics and histology of titanium and hydroxylapatite-coated titanium for dental implant applications. », *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, vol. 2, n° 1, 1987.
- [15] K. A. Thomas, S. D. Cook, J. F. Kay, M. Jarcho, R. C. Anderson, A. F. Harding, & M. C. Reynolds, « Attachment strength and histology of hydroxylapatite coated implants », in *Biomaterials Medical Devices and Artificial Organs*, vol. 14, p. 73–74, 1986.
- [16] S. M. Kurtz & J. N. Devine, « PEEK biomaterials in trauma, orthopedic, and spinal implants », *Biomaterials*, vol. 28, n° 32, p. 4845–4869, 2007.
- [17] K. B. Sagomyants, M. L. Jarman-Smith, J. N. Devine, M. S. Aronow, & G. A. Gronowicz, « The in vitro response of human osteoblasts to polyetheretherketone (PEEK) substrates compared to commercially pure titanium », *Biomaterials*, vol. 29, n° 11, p. 1563–1572, 2008.
- [18] R. Olivares-Navarrete, S. L. Hyzy, P. J. Slosar, J. M. Schneider, Z. Schwartz, & B. D. Boyan, « Implant materials generate different peri-implant inflammatory factors: poly-ether-ether-ketone promotes fibrosis and microtextured titanium promotes osteogenic factors », *Spine*, vol. 40, n° 6, p. 399, 2015.
- [19] S. L. M. Van Loon, A. Smits, A. Driessen-Mol, F. P. T. Baaijens, & C. V. C. Bouten, « The immune response in in situ tissue engineering of aortic heart valves », *Calcific aortic valve disease*, vol. 8, p. 207–245, 2013.
- [20] J. D. Bryers, C. M. Giachelli, & B. D. Ratner, « Engineering biomaterials to integrate and heal: the biocompatibility paradigm shifts », *Biotechnology and bioengineering*, vol. 109, n° 8, p. 1898–1911, 2012.
- [21] T. Minagawa, Y. Okamura, Y. Shigemasa, S. Minami, & Y. Okamoto, « Effects of molecular weight and deacetylation degree of chitin/chitosan on wound healing », *Carbohydrate Polymers*, vol. 67, n° 4, p. 640–644, 2007.
- [22] G. Penven, « Encapsulation de dispositifs symbiotiques implantables : Evaluation de la biocompatibilité et des performances », Thèse Université Grenoble Alpes, 2016.

Chapitre 5 : Biopiles à bases de membranes biomimétiques

Dans le même temps de développement de notre biopile enzymatique, nous avons entrepris de créer une biopile à base de membranes biomimétiques. Comme nous l'avons évoqué dans le premier chapitre de cette thèse, ce type de pile est inspiré du concept de polarisation membranaire. Les décharges électriques provoquées par les gymnotes ou certaines raies, dont nous avons vu le fonctionnement dans le chapitre introductif, sont un exemple de l'efficacité de telles structures, que nous nous proposons de mimer dans le système développé ci-après pour fabriquer une biopile.

Cependant, pour créer une biopile, il nous faut pouvoir collecter les électrons et maintenir le gradient d'ions. Ce chapitre décrit la réalisation du dispositif schématisé au chapitre 1, figure 1.33. Ce dispositif constitue la première étape vers la construction d'une biopile biomimétique. Il comprend 2 compartiments séparés par une membrane biomimétique plane. Chaque compartiment contiendra des électrodes permettant de collecter des électrons et un système fluide pour maintenir un gradient ionique, dont la conception est initiée dans le cadre de cette thèse.

Dans la suite de cette thèse, nous allons nous focaliser sur trois points essentiels ayant conduit à la création d'un potentiel de part et d'autre d'une membrane biomimétique plane contenant des transporteurs ioniques spécifiques : la recherche d'un support poreux pouvant stabiliser une bicouche lipidique, la production d'un canal ionique spécifique, et l'intégration de ce canal ionique dans la bicouche lipidique.

5.1 Fabrication d'une bicouche lipidique stable sur un support poreux

5.1.1 Généralités sur les bicouches lipidiques planes et leur stabilité

Les films noirs (black lipid membrane BLM), très utilisés en biophysique et pour l'étude de protéines de transport, sont des systèmes biomimétiques mimant parfaitement le schéma de principe de notre pile biomimétique : il s'agit de la création d'une bicouche lipidique plane dans un tout petit orifice séparant 2 compartiments aqueux. Elle est formée en « peignant » littéralement un trou d'une dizaine de microns réalisé dans un matériau hydrophobe comme du téflon avec des lipides solubilisés dans un solvant organique (le plus souvent un alcane visqueux du type décane ou squalène qui stabilisent la bicouche aux interfaces avec le téflon). On parle de « film noir » à cause de la couleur que prend la membrane, causée par les interférences de l'éclairage d'un microscope optique [1].

Le champ d'application de ces membranes est immense mais la difficulté de fabrication est un frein à leur développement [6]–[9]

. Il existe cependant les plateformes commerciales de patch clamp sur puce (Nanon, Sophion, Molecular Device) basées sur ce principe mais plutôt appliquées à des cellules entières ou à des systèmes biomimétiques de type vésicules unilamellaires géantes (GUV) pour la recherche de cibles thérapeutiques de protéines membranaires. Ces GUV peuvent constituer

un bon modèle de la membrane biologique mais restent extrêmement fragiles. La stabilité dans le temps est suffisante pour des mesures d'électrophysiologie (quelques heures). Elle n'est malheureusement pas suffisante pour notre application.

La stabilité de ce type de bicouche peut-être considérablement augmentée en utilisant des lipides sous la forme de liposomes de taille plus réduite (30-100 nm) [6]. Ces SUV (small unilamellar vesicles) intéressent particulièrement le domaine de la délivrance de médicaments. Là encore, pour notre application, comme on doit pouvoir contrôler les deux compartiments séparant la membrane, un système fermé de vésicules n'est intuitivement pas une méthode de choix.

Historiquement, la construction de bicouches lipidiques planes a été réalisée par la technique de Langmuir-Blodgett ou de Langmuir-Schaeffer depuis les années 1940 [7]. Cette technique consiste à déposer 2 couches mono-moléculaires de lipides flottant à la surface d'un compartiment aqueux en contrôlant la tension de surface pour maintenir la stabilité de cette monocouche pendant le transfert sur le support.

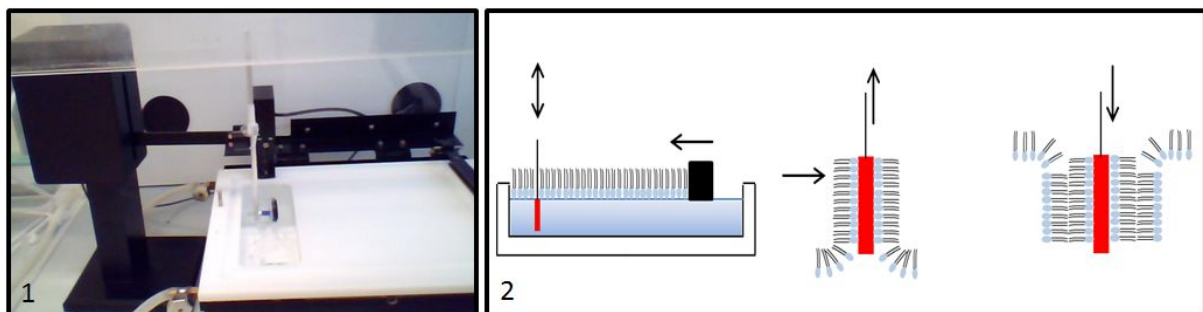


Figure 5.1 : dépôt d'une bicouche lipidique par la technique de Langmuir-Blodgett. 1) Appareillage NIMA. 2) Schéma de dépôt de la bicouche lipidique en vue de profil. Le support rouge est monté puis descendu de manière synchrone avec la barre permettant le compactage des lipides à la surface de l'eau en suivant la mesure de la tension de surface.

Il n'existe à ce jour pas de méthode « universelle » de fabrication de bicouches planes et d'autres méthodes d'auto-assemblage ont été mises au point pour former une bicouche sur un support (figure 5.2). Chaque méthode doit pouvoir s'adapter aux conditions expérimentales, par exemple l'incorporation ou non de protéines ou le type d'appareillage utilisé pour l'étude.

L'adsorption de liposomes sur la surface du support est maintenant la technique la plus souvent utilisée à cause de sa simplicité d'exécution. La déformation des vésicules lors du contact induit leur rupture et la formation d'une bicouche lipidique sur le support (figure 5.2, procédé 2). Les forces impliquées dans la fusion des vésicules sont mécaniques, électrostatiques, et de van der Waals. Ce phénomène d'adhésion est influencé par différents facteurs :

- la composition des vésicules en lipides, en termes de nature, de taille, de charge mais également de leur état physique [8], [9]. En effet, ils doivent se trouver dans un état fluide, bien au-dessus de leur température de transition gel/fluide, pour que l'énergie les liant entre eux soit plus faible que l'énergie d'adsorption sur le support.

- le support possède lui-même sa propre structure (porosité, rugosité) et sa charge. Le support doit de plus avoir des propriétés spécifiques suivant le type d'applications recherchées, par exemple il doit être conducteur pour des mesures électrochimiques.

-l'environnement physico-chimique joue lui aussi un rôle important en termes de température, de pH et de force ionique, pour déstabiliser les vésicules lipidiques au profit de la formation d'une bicouche plane auto-soutenue. La température modifie l'état des lipides, mais des cycles de congélation/ décongélation [10] peuvent être à l'origine de la formation d'une bicouche par la différence de vitesse de congélation entre l'intérieur et l'extérieur des vésicules. Un choc osmotique permettant de rompre ces vésicules peut aussi être envisagé. On peut également utiliser des détergents [11] ou des peptides [12] connus pour déstabiliser les liposomes en augmentant leur rayon de courbure jusqu'à les rompre.

L'utilisation de détergents est également une méthode de choix : les lipides sont solubilisés grâce à un détergent, formant ainsi des micelles en solution. Une dialyse du détergent en diminue la concentration dans la micelle. Les lipides sont déstabilisés dans l'environnement aqueux et forment une bicouche (figure 5.2 procédé 1). Des molécules de détergent restent cependant dans la bicouche mais ce système permet l'intégration de protéines membranaires dans des bicouches lipidiques planes [13].

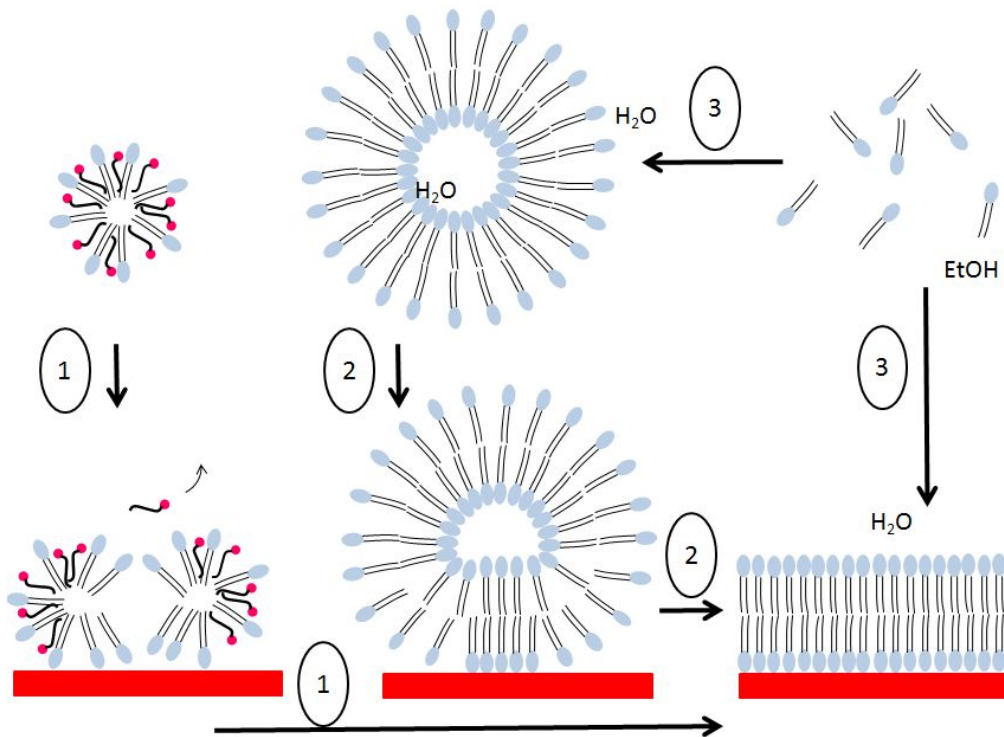


Figure 5.2 : formation d'une bicouche lipidique plane. 1) Action d'un détergent dialysé. 2) Fusion de vésicules. 3) Echange de solvant

Enfin, la technique d'échange de solvant [14], [15], utilise le même principe de manière tout aussi efficace et surtout plus rapide : des lipides dissous dans un solvant organique miscible à l'eau (méthanol, éthanol, isopropanol, ...) sont sous la forme de micelles inversées. Lorsqu'on ajoute de l'eau à ce mélange, les lipides se désassemblent, deviennent monomériques et l'augmentation de la proportion d'eau conduit à la formation de nouvelles structures énergétiquement plus favorables liposomes et bicouche plane (figure 5.2 procédé 3). Cependant, cette technique est peu adaptée à l'incorporation de protéines à cause de la solvation en solvant organique.

Les différentes architectures de bicouches lipidiques planes sont représentées figure 5.3. A la différence des BLMs, les membranes lipidiques supportées (solid-supported bilayer lipid

membranes sBLMs) sont plus stables, sur des surfaces de plusieurs centimètres carrés. Cependant, même si une couche de solvant existe entre la bicouche et le support, permettant de conserver une certaine fluidité, l'accès à ce compartiment est restreint à quelques Angströms et ces interactions entre le support et la membrane modifient les propriétés physiques et thermodynamiques de la membrane, comme sa perméabilité ou la température de transition [16]. Les films lipidiques formés sur une surface nue ou fonctionnalisée permettent la mesure directe d'interaction protéines/lipides, par des techniques de résonance plasmonique de surface (SPR) par exemple, mais cet espace n'est pas suffisant pour y intégrer des protéines de façon stable. Afin de créer un compartiment entre la bicouche et le support pour permettre l'intégration de protéines fonctionnelles ou simplement la création d'un compartiment permettant l'accumulation de substrats, on peut utiliser des lipides fonctionnalisés qui ancrent la bicouche lipidique (tethered lipid membranes tBLM). L'autre possibilité pour créer un espace est d'utiliser un polymère poreux qui constitue un véritable coussin stabilisant la membrane lipidique (pBLM).

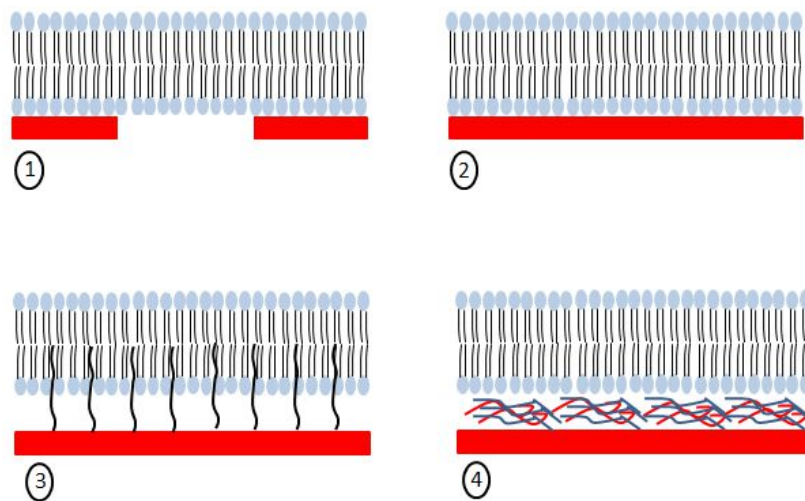


Figure 5.3 : les différents types de bicouches lipidiques planes.

1) BLM (black lipid membrane). 2) sBLM (solid supported bilayer lipid membrane).

3) tBLM (tethered bilayer lipid membrane). 4) pBLM (polymer supported bilayer lipid membrane)

5.1.2 Fabrication d'une bicouche lipidique plane sur un support poreux

5.1.2.1 Sur un support de silicium poreux

L'accès aux membranes de silicium poreux utilisées dans le chapitre 3 comme alternative au sac de dialyse de notre biopile enzymatique a permis d'imaginer l'utilisation de ces membranes comme support d'une biopile à base de membranes biomimétiques. En effet, la stabilisation de la membrane de silicium nanoporeux passe par sa silanisation avec un PEG-silane, il est de ce fait envisageable de fixer des ancres compatibles avec une bicouche lipidique pour former une tBLM [17], [18] (Figure 5.4) car les ancres de tels systèmes sont espacés d'une dizaine de nanomètres [19].

L'ancre que nous avons utilisée est un DSPE-PEG-Silane. Cette molécule possède 3 parties liées par liaison covalente.

- La partie « silane » permet la stabilisation du silicium poreux (voir chapitre 3).
- Le « DSPE » (di-stearoyl phosphatidyl ethanolamine) est un lipide qui va constituer l'ancre.
- Le « PEG » (polyéthylène glycol), par son repliement tridimensionnel, va fournir à la bicouche lipidique une certaine fluidité. En faisant varier les quantités de PEG-Silane

et de DSPE-PEG-Silane, on va pouvoir créer un réservoir hydrophile entre le support et la bicouche en permettant ainsi l'incorporation de protéines au sein de la bicouche.

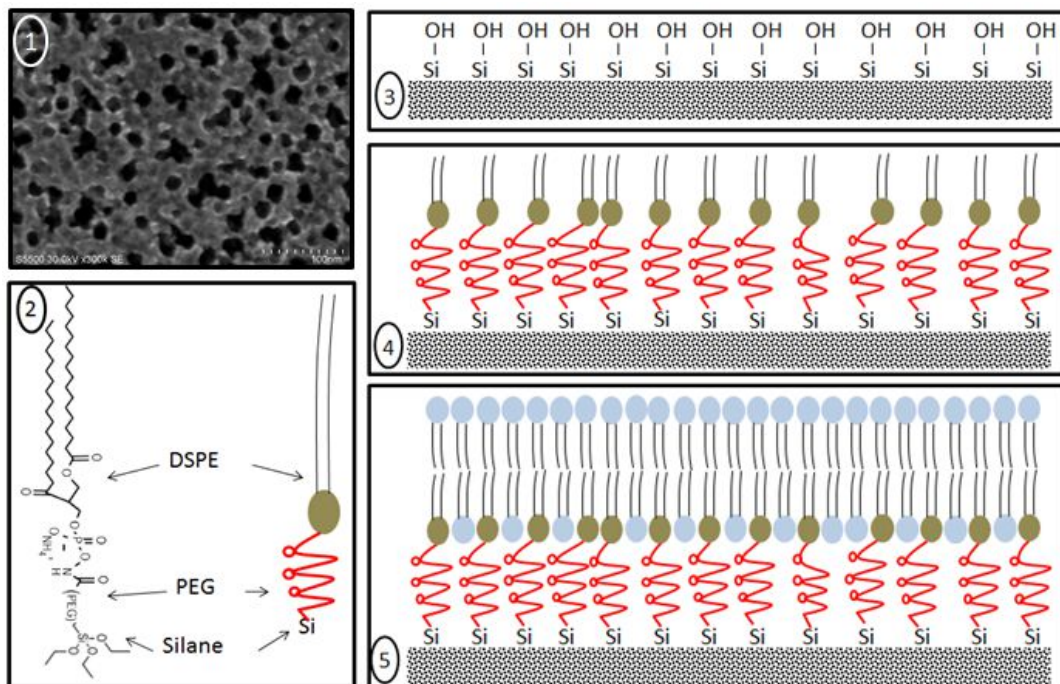


Figure 5.4 : création d'une tBLM sur silicium poreux.

1) Structure microscopique du silicium poreux face avant 2) Molécule de Silane-PEG-DSPE. 3) Silicium poreux non stabilisé. 4) Silicium poreux silanisé avec le silane-PEG-DSPE. 5) Dépôt d'une bicouche lipidique.

Nous avons dans un premier temps réalisé une bicouche plane par échange de solvant sur ce support dans une chambre de diffusion (Figure 5.5). L'utilisation de membranes de polycarbonate et de silicone spongieux permet le remplissage des différents compartiments sans provoquer de perturbations importantes de flux. L'analyse a été réalisée par spectroscopie d'impédance à 4 électrodes.

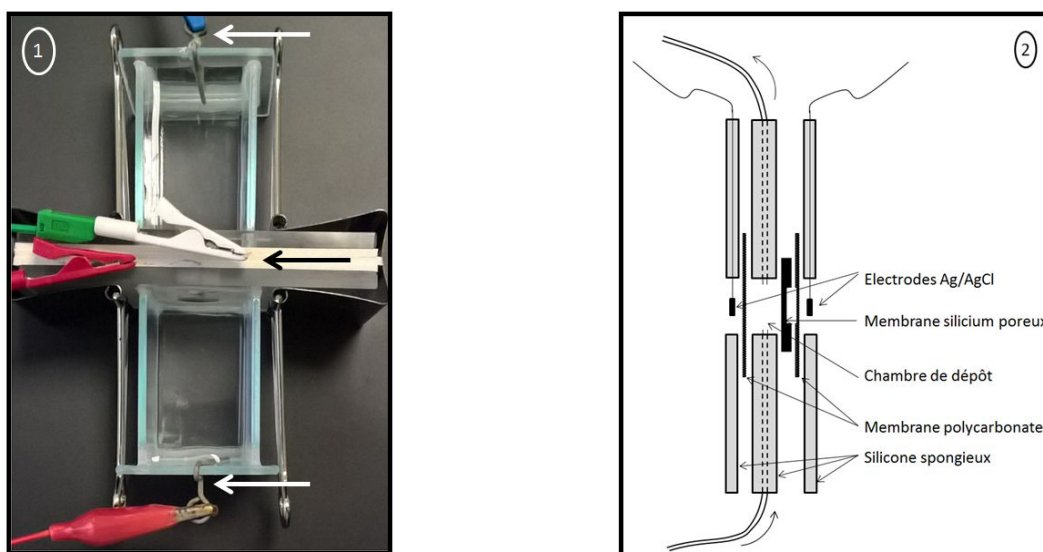


Figure 5.5 : Analyse de la membrane biomimétique par spectroscopie d'impédance électrochimique à 4 électrodes. 1) tBLM en place dans la chambre de diffusion. Les électrodes de platine sont signalées par des flèches blanches, les électrodes de Ag/AgCl sont signalées par une flèche noire. 2) Schéma de la mise place des différents éléments à proximité de la membrane.

Le protocole a été établi à partir des résultats des expériences de diffusion neutronique réalisées à l'Institut Laue Langevin où nous avons mis au point la technique de dépôt de lipides par échange de solvant sur substrat de silicium pour étudier l'insertion d'autres protéines. Les lipides à 10mM dans l'éthanol pur sont tout d'abord injectés dans la chambre de dépôt. Les compartiments de la chambre de diffusion sont ensuite remplis et l'acquisition de spectres d'impédance permet de voir évoluer l'impédance au cours du temps. Nous avons testé plusieurs types de lipides : du di-myristoyl phosphatidylglycérol (DMPC), la fraction soluble dans l'éthanol d'asolectine, et du 1-palmitoyl 2-oleoyl phosphatidylglycérol (POPC). La figure 5.6 présente le meilleur résultat que nous avons pu obtenir avec cette technique. L'impédance augmente très fortement dans les premières minutes de l'expérience, se stabilise après rinçage de la chambre avec du tampon pendant environ 1 heure puis décroît régulièrement jusqu'à s'effondrer au bout de 43 heures. Un témoin réalisé sans la membrane de silicium poreux nous montre le même phénomène sur une période de temps beaucoup plus réduite (5 heures) et correspond à la fixation de lipides sur les filtres de polycarbonate constitués de pores de 100nm. L'impédance du silicium poreux silanisé seul n'est pas présentée ici car elle est peu lisible sur ce graphique (voir description au 3.1.2.2).

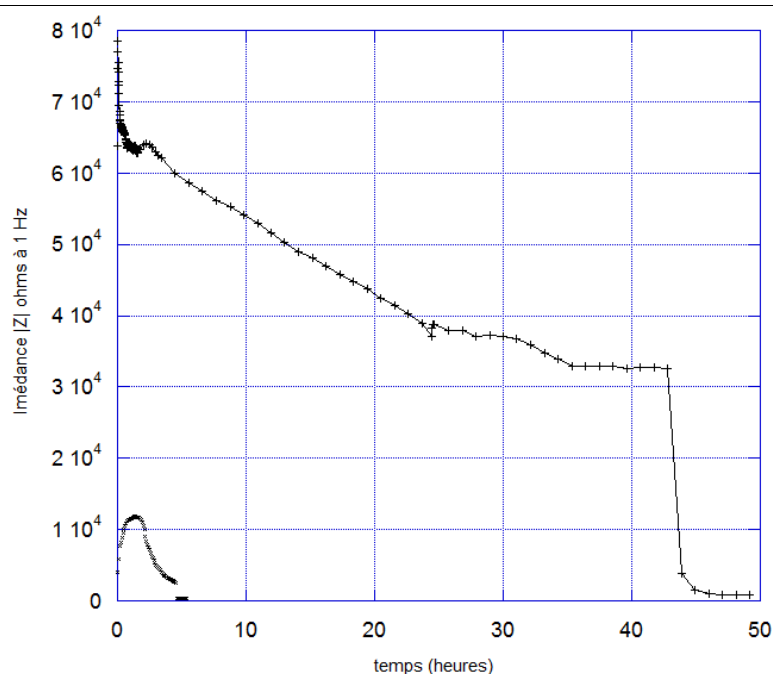


Figure 5.6 : évolution de l'impédance à 1 Hz d'une t-BLM sur silicium poreux avec du POPC. Avec membrane de silicium poreux (croix et ligne continue) comparé au même système sans la membrane (pointillés fins).

Nous avons essayé de modéliser ces données pour apprécier la qualité de la membrane biomimétique à base de silicium poreux mais cela ouvre un champ d'investigation trop important dans le cadre de cette thèse. L'analyse doit en effet être plus poussée pour comprendre les phénomènes physiques dirigeant la création de la membrane et sa dégradation au cours du temps. Le meilleur modèle utilisé inclut la présence d'un élément très capacitif de l'ordre de $3 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ et d'une résistance proche du még Ω , ressemblant à une bicouche lipidique. Il paraît cependant peu envisageable de se servir de ce support pour une pile biomimétique fonctionnant à long terme à cause de sa stabilité générale de l'ordre de 2 mois en tampon salin. Le défaut de stabilité à court terme de la membrane en silicium poreux dans ces expériences de silanisation avec le DSPE-PEG-Silane peut être lié à 2 phénomènes principaux :

1) la silanisation doit être parfaite sur toute la surface du silicium poreux pour éviter sa dégradation sur le long terme. La présence du lipide peut créer un encombrement stérique limitant l'accès du silane à la surface du silicium poreux. On pourrait tester cette hypothèse avec des mélanges de DSPE-PEG-Silane et de PEG-Silane déjà caractérisés pour leur stabilité.

2) la porosité trop forte du silicium poreux ne permet pas d'ancrer convenablement la bicouche lipidique car l'espacement entre les ancres est trop grand.

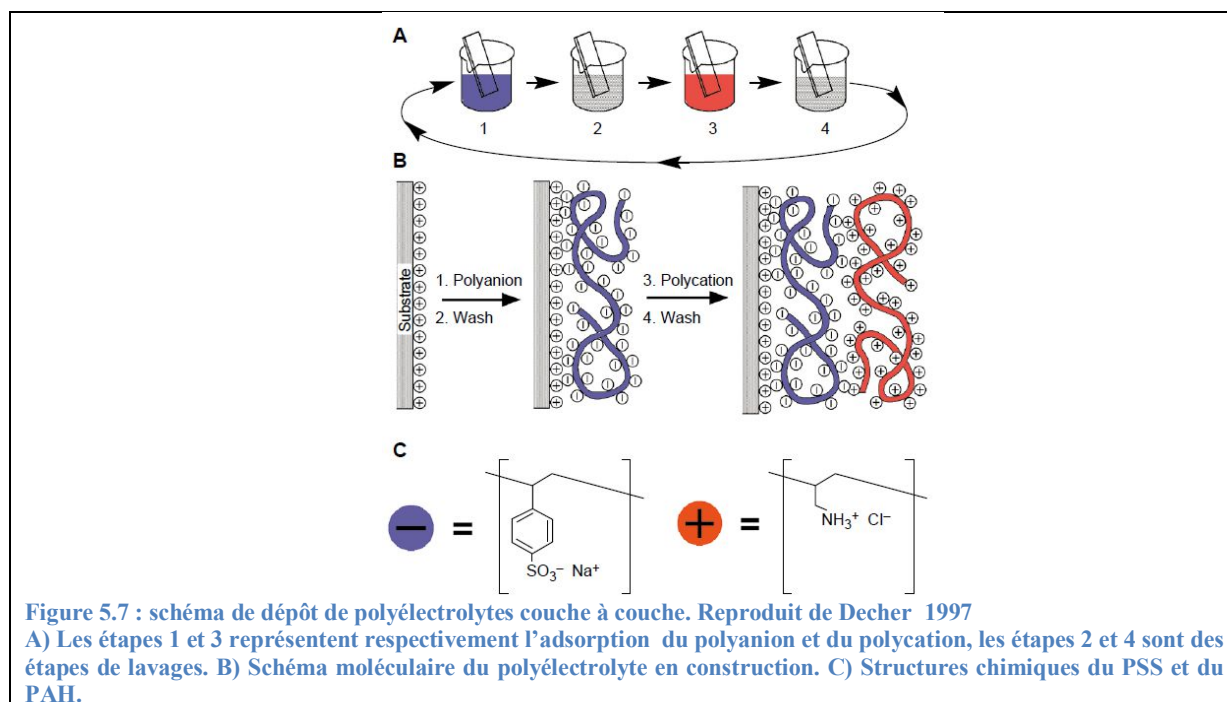
Les résultats obtenus en réflectométrie neutronique tendent à montrer que la bicouche est stable sur du silicium silanisé avec un PEG-Silane ce qui confirmerait plutôt la deuxième hypothèse.

D'un point de vue technologique, il nous a paru plus pertinent de nous tourner vers un support plus stable dans le temps, mais ces résultats sont toutefois encourageants car ils permettent de mieux appréhender le comportement d'autres substrats.

5.1.2.2 Sur un hydrogel interpénétré

Nous avons également utilisé avec plus de succès un autre type de substrat. Il s'agit d'un hydrogel interpénétré constitué d'agarose et de polyélectrolyte formant un film poreux. La caractérisation de cette membrane support a été réalisée et publiée en 2012 [20].

Nous avons créé ce film en utilisant la technique de dépôt couche à couche de polyélectrolyte découverte par Gero Decher en 1991 [21] sur un support sacrificiel d'agarose.



Les couches successives de polyélectrolyte chargé positivement, le poly(allylamine hydrochloride) PAH, et de polyélectrolyte chargé négativement, le poly(sodium styrène sulfonate) (PSS) permettent d'obtenir, par des interactions intermoléculaires électrostatiques, un film de très faible épaisseur sur un support solide (figure 5.7).

L'épaisseur de l'auto-assemblage peut être très finement régulée par la force ionique : l'ajout de sel augmente significativement la porosité et l'épaisseur du film [22]. Chaque

couche déposée alternativement dans une solution de 0,5M NaCl est constituée d'une seule couche de molécule d'environ 2nm pour les polyélectrolytes employés.

L'agarose est incorporé lors de sa fusion dans la membrane de polyélectrolyte en donnant naissance à un hydrogel interpénétré manipulable d'une épaisseur d'environ 250-300 nm. Comme le montre l'image d'AFM à la figure 5.8, le matériau est rugueux mais constitue toutefois un support adéquat pour accueillir une bicouche lipidique.

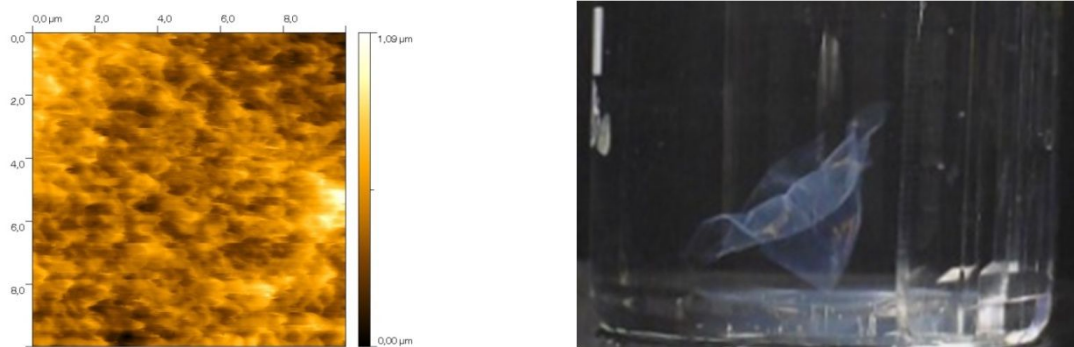


Figure 5.8 : membrane de polyélectrolyte et agarose interpénétrés. A gauche, image AFM du film d'hydrogel interpénétré en mode contact ; à droite, observation macroscopique du film après fusion de l'agarose dans un bécher d'eau chaude.

Ce film est déposé sur un filtre poreux de type « track-etched membrane » nuclepore® placé dans une chambre de diffusion fabriquée pour l'étude de notre biopile (Figure 5.9). Ce dispositif est constitué de 2 pièces en polycarbonate, chacune possédant 6 chambres indépendantes. Ces 2 pièces s'emboîtent en prenant en sandwich la membrane biomimétique grâce à des joints toriques. Un côté des chambres est alimenté par un système de tubulures permettant un flux de liquide par exemple pour des lavages ou un changement de tampon. L'autre côté de la chambre permet l'accès des électrodes de mesure. La chambre supérieure est ouverte pour l'ajout de différents substrats et peut être obturée par une lamelle de verre.

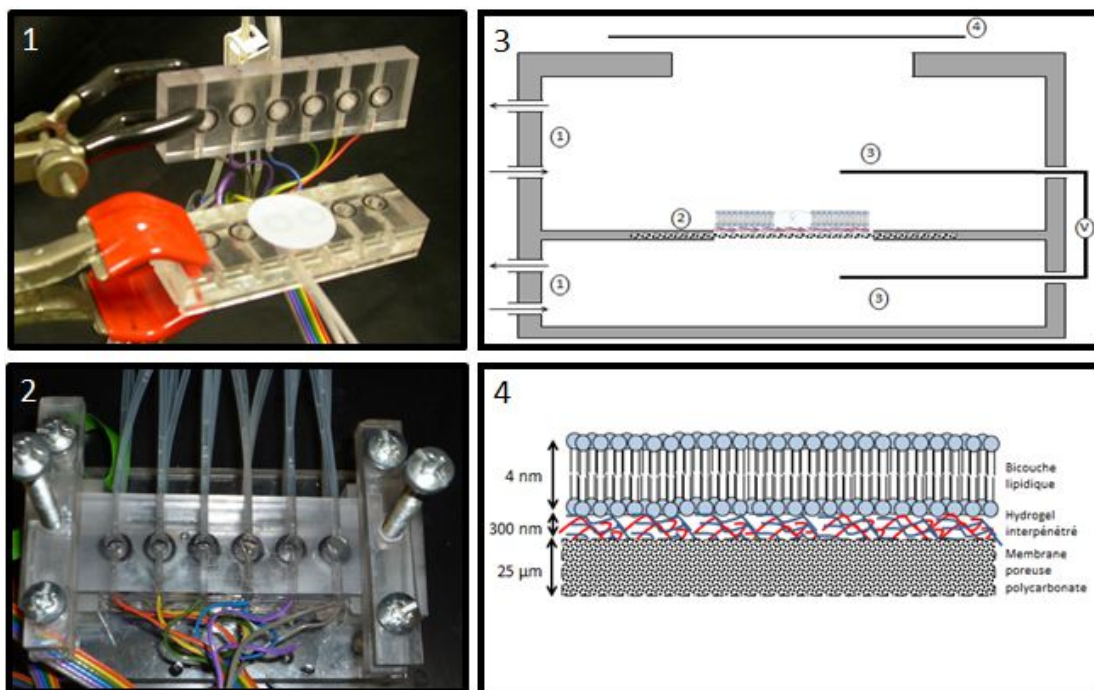


Figure 5.9 : Dispositif d'étude de la membrane biomimétique. 1) Chambre de diffusion ouverte montrant une membrane de polycarbonate de 25 mm de diamètre de type « track-etched » nuclepore® (pores de 100 nm de diamètre). 2) Chambre de diffusion en fonctionnement : les tubulures permettant le flux de liquide sont en haut de la

photo, les électrodes sont en bas. Les 2 pièces en polycarbonate sont emboîtées et maintenues avec un support externe. 3) Schéma d'une chambre vue de profil avec 1 : flux de liquide, 2 : membrane biomimétique, 3 : électrodes reliées à un potentiostat, 4 : lamelle de verre obturante. 4) Schéma de la membrane biomimétique auto-supportée.

Des mesures d'impédance électrique nous ont permis de montrer la formation d'une bicouche lipidique stable séparant les deux chambres (Figure 5.6) après l'ajout d'une couche terminale de PSS au film d'hydrogel interpénétré. On voit nettement l'augmentation de l'impédance liée à la formation d'une bicouche lipidique à la surface du film. L'impédance chute brutalement lors du lavage à l'éthanol après 5 heures.

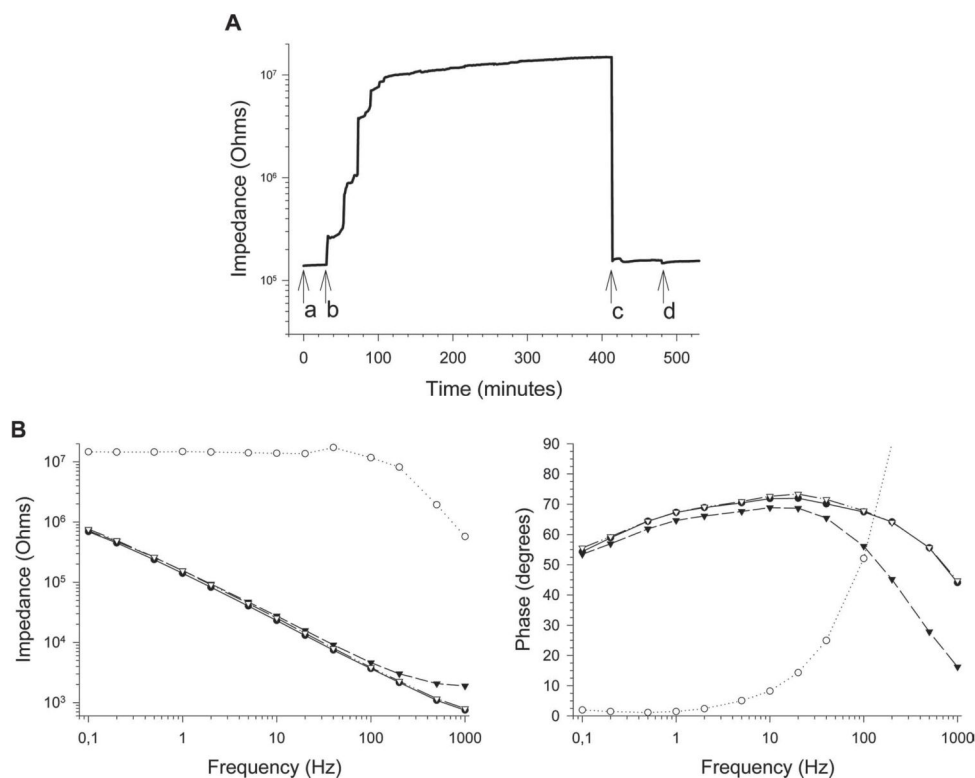


Figure 5.10 : Impédance électrique de la membrane biomimétique (reproduit de Stidder *et al* avec permission de l'éditeur).

A) Evolution de l'impédance à 1 Hz au cours du temps : a) Tampon 150mM NaCl. b) Ajout de liposomes d'un mélange de lipides. c) Lavage avec de l'éthanol pur. d) Lavage avec le tampon de départ.

B) Bode plot représentant le module d'impédance et la phase en fonction de la fréquence sous différentes conditions : en rond noirs : entre a et b, en ronds blancs entre b et c dans la partie stable du dépôt de lipides, en triangles noirs après le lavage à l'éthanol et en triangle blancs après le dernier lavage dans le tampon.

Sur les deux systèmes présentés dans cette thèse, la membrane de gel interpénétré d'agarose et de polyélectrolyte nous a donné de bons résultats en termes de performance et de stabilité. L'incorporation de protéines membranaires dans une bicouche lipidique supportée par ce dispositif peut être envisagée et sera décrite dans le paragraphe 5.3. Nous allons à présent nous intéresser au choix et à la production de la protéine d'intérêt pour notre application.

5.2 Production et test d'activité du canal ionique NhaA

Parmi les transporteurs ioniques permettant de générer un gradient de protons à partir d'un gradient d'autres ions, nous avons choisi d'intégrer NhaA dans notre membrane biomimétique. Il s'agit d'une protéine membranaire bactérienne permettant d'établir

directement un potentiel électrochimique de part et d'autre de la membrane en échangeant un ion sodium contre deux protons.

5.2.1 Généralités sur la protéine NhaA

Il est primordial pour les cellules vivantes de réguler leur concentration en sel, leur pH intracellulaire ainsi que leur volume. Les antiports Na^+/H^+ jouent un rôle essentiel dans ces phénomènes. La superfamille des antiports à cations monovalent/protons (famille CPA) comprend 3 sous familles CPA1, CPA2 [23], et NaT-DC (Figure 5.11). Cette dernière, que l'on retrouve exclusivement chez les procaryotes anaérobies, exporte 2Na^+ contre 1H^+ grâce à l'énergie libérée par une décarboxylation au sein d'un complexe multiprotéique membranaire [24], [25]. La sous famille CPA1 contient les échangeurs non électrogéniques qui captent 1Na^+ vers le cytoplasme en éjectant 1H^+ à l'extérieur. Les antiports de cette famille sont sensibles à l'amiloride. C'est le cas des échangeurs de type NHE [26] (Na^+/H^+ exchanger) impliqués dans les maladies cardiovasculaires (NHE1), intestinales (NHE1, 2, et 3) et rénales (NHE3). La sous-famille CPA2 contient les échangeurs qui n'ont pas d'homologie avec NHE. Certains sont électrogéniques et leur stoechiométrie est donc différente de $n \text{Na}^+$ contre $n \text{H}^+$.

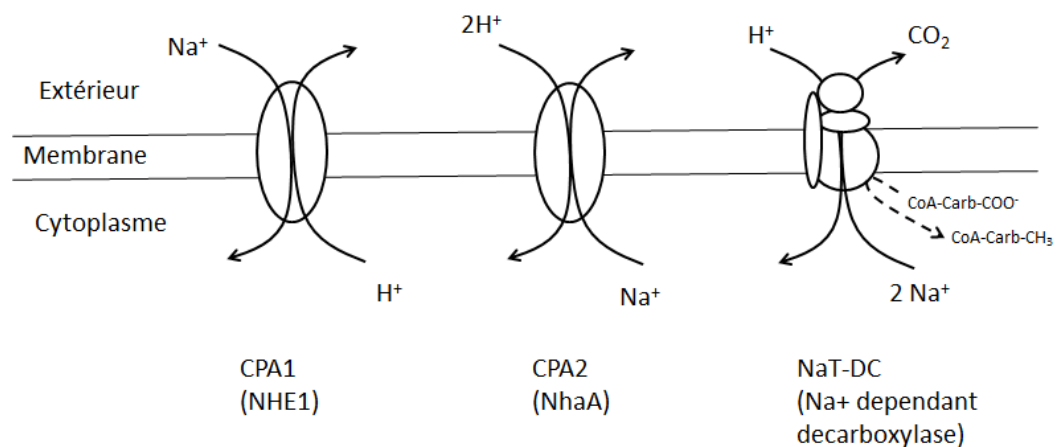


Figure 5.11 : la superfamille des antiports à cations monovalent/proton

2 protéines NHA1 et NHA2 [27], homologues de NhaA de *E. coli*, existent chez l'homme [26], avec cependant seulement 10% d'homologie de séquence. Elles ont d'ailleurs évolué vers des fonctions un peu différentes [28]. Aucune de ces protéines n'est électrogénique. NHA2 est bien un échangeur Na^+/H^+ et est spécifiquement produite au niveau du tube contourné distal au niveau du rein. En revanche, selon une récente publication [29], NHA1 serait en fait un cotransporteur H^+/Cl^- . Elles ont en revanche conservé une homologie forte au niveau des segments transmembranaires IV, V, X et XI impliqués dans le mécanisme de transport [30].

La sous famille CPA2 a un fonctionnement différent de la sous famille CPA1 dans les conditions physiologiques. En effet, la plupart de ces transporteurs permettent d'éjecter le sodium en captant des protons. La pompe à protons rend l'intérieur de la cellule alcalin en créant un potentiel de membrane. Cela engendre une force qui permet aux protons d'entrer par l'échangeur secondaire NhaA tout en chassant le Na^+ qui est entré par les différents cotransporteurs. Cela permet en outre à la bactérie de vivre dans des conditions de pH alcalin ou avec des concentrations de sels importantes jusqu'à 4M en utilisant le gradient de protons.

Au niveau de la physiologie cellulaire, les antiports CPA sont autorégulés par le pH car comme nous allons le voir, c'est une propriété intrinsèque du mécanisme d'échange.

Les CPA1 vont dans le sens de l'entrée de Na^+ et la sortie de H^+ : à pH intracellulaire acide, on a compétition sur la face externe entre les H^+ et le sodium : le Na^+ entre et les protons sont expulsés. Donc le pH intracellulaire augmente et l'épuisement des H^+ à l'intérieur de la cellule diminue l'activité de la protéine : l'intérieur de la cellule ne devient pas basique.

Les CPA2 fonctionnent dans l'autre sens : ils expulsent du Na^+ en laissant entrer les H^+ pour acidifier l'intérieur de la cellule. A pH acide, le transporteur est inactivé par la compétition entre Na^+ et H^+ au niveau du capteur de pH, ce qui évite une trop forte acidification de la cellule [31].

Chez les procaroytes, et notamment chez *E.coli*, il existe 3 antiports différents :

-ChaA fonctionne à un pH supérieur à 8 et son activité est moins spécifique que les 2 protéines suivantes : elle est capable de transporter aussi bien le sodium que le potassium et le calcium [32].

-NhaB a une stoechiométrie de 2Na^+ pour 3H^+ . Elle semble peu ou pas dépendante du pH et son rôle serait de maintenir une concentration faible de sodium dans la cellule et à assumer la fonction d'échange Na^+/H^+ quand les 2 autres protéines ne sont pas exprimées (à pH acide) [33].

-NhaA est le premier antiport d'ions identifié chez *E.coli*. Sa stoechiométrie est de 1Na^+ contre 2H^+ . C'est le premier échangeur Na^+/H^+ à avoir été cristallisé [34]. Il permet à la bactérie de survivre dans un environnement hyper salin ou alcalin. La protéine NhaA est également capable de transporter du Ca^{2+} dans des vésicules inversées sous l'action d'un potentiel membranaire et/ou d'un gradient de Na^+ [35].

La réponse au sodium est gérée au niveau transcriptionnel, la réponse au pH est une fonction de la protéine elle-même grâce à un capteur de pH présent sur la face cytoplasmique, qui joue le rôle de piège à cations grâce à des acides aminés chargés négativement et initie le changement conformationnel.

La protéine NhaA est une protéine de 42 kDa comprenant 12 segments transmembranaires avec les extrémités N et C terminales pointant vers le cytoplasme et 3 hélices topologiquement inversées qui se font face : les hélices III, IV, et V font face aux hélices X, XI et XII (Figure 5.12).

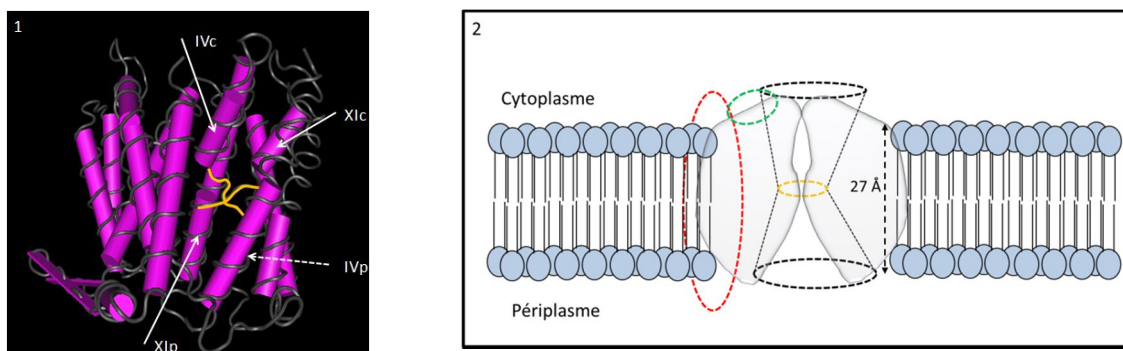


Figure 5.12 : Structure tridimensionnelle de NhaA et son environnement. 1) Structure du cristal de NhaA (PDB 1ZCD). En jaune, le site actif représenté par le chiasma des hélices IV et XI. 2) NhaA enchassée dans une bicouche lipidique. En rouge la zone de dimérisation, en vert le capteur de pH, en noir la forme du canal et en jaune le site actif.

Les hélices IV et XI sont un peu particulières et leur géométrie est spécifique aux échangeurs de type NhaA. On retrouve cette géométrie chez l'orthologue NapA de *Thermus thermophilus* [36], ainsi qu'une homologie de structure (mais pas de séquence) avec ASBT, une protéine symport de Na⁺ et d'acides biliaries.

Ces 2 hélices sont en fait constituées de 2 segments interrompus en leur milieu par une petite chaîne étendue de quelques acides aminés. Ces chaînes (correspondant aux hélices IV et XI) se croisent au milieu de la membrane.

On pense à l'heure actuelle que c'est cette configuration spéciale qui confère au canal sa spécificité grâce à l'environnement des charges électrostatiques en équilibre au milieu de la membrane [37].

Le canal a une forme de diabolo, les faces cytoplasmiques et périplasmiques sont accessibles à l'eau et aux ions Li⁺, Na⁺, K⁺ et même Ca²⁺ alors que l'étranglement n'est accessible qu'aux ions Na⁺ et Li⁺. Les résidus Asp163 et Asp 164 sont conservés dans toutes les protéines orthologues, et sont impliqués dans la fixation des ions sodium et des protons. Leur localisation est proche du cœur du transporteur avec les 2 chaînes étendues croisées et leur remplacement dans des mutants augmente fortement le Km apparent de l'antiport. Un premier modèle a été proposé en 2007 par Roux [38].

Le modèle cinétique équivalent est simple et suffit à décrire le transport : la protéine oscille entre 2 conformations, ouverte soit vers l'extérieur soit vers l'intérieur de la cellule. L'énergie utilisée pour le changement de conformation provient de la fixation des ions sur le site actif, commun pour les substrats à transporter. Le modèle décrit donc un système où l'échangeur fonctionne de manière totalement symétrique [23].

Lorsque le pH est bas, le canal est en conformation ouverte du côté périplasmique (et donc fermé du côté cytoplasmique). L'augmentation du pH provoque un changement de conformation qui expose le site actif (notamment Asp164) à l'intérieur de la cellule, ce qui permet la fixation du sodium.

Un nouveau changement de conformation intervient et le site actif devient exposé vers l'extérieur, ce qui permet l'expulsion du sodium. La protonation d'Asp 164 et Asp 163 permet le retour à la conformation ouverte vers l'intérieur où l'accueil d'un nouvel ion sodium peut avoir lieu.

Ce mécanisme est extrêmement rapide avec une vitesse de translocation de l'ordre de 10⁵ min⁻¹ [39], soit près de 2000 échanges par seconde!

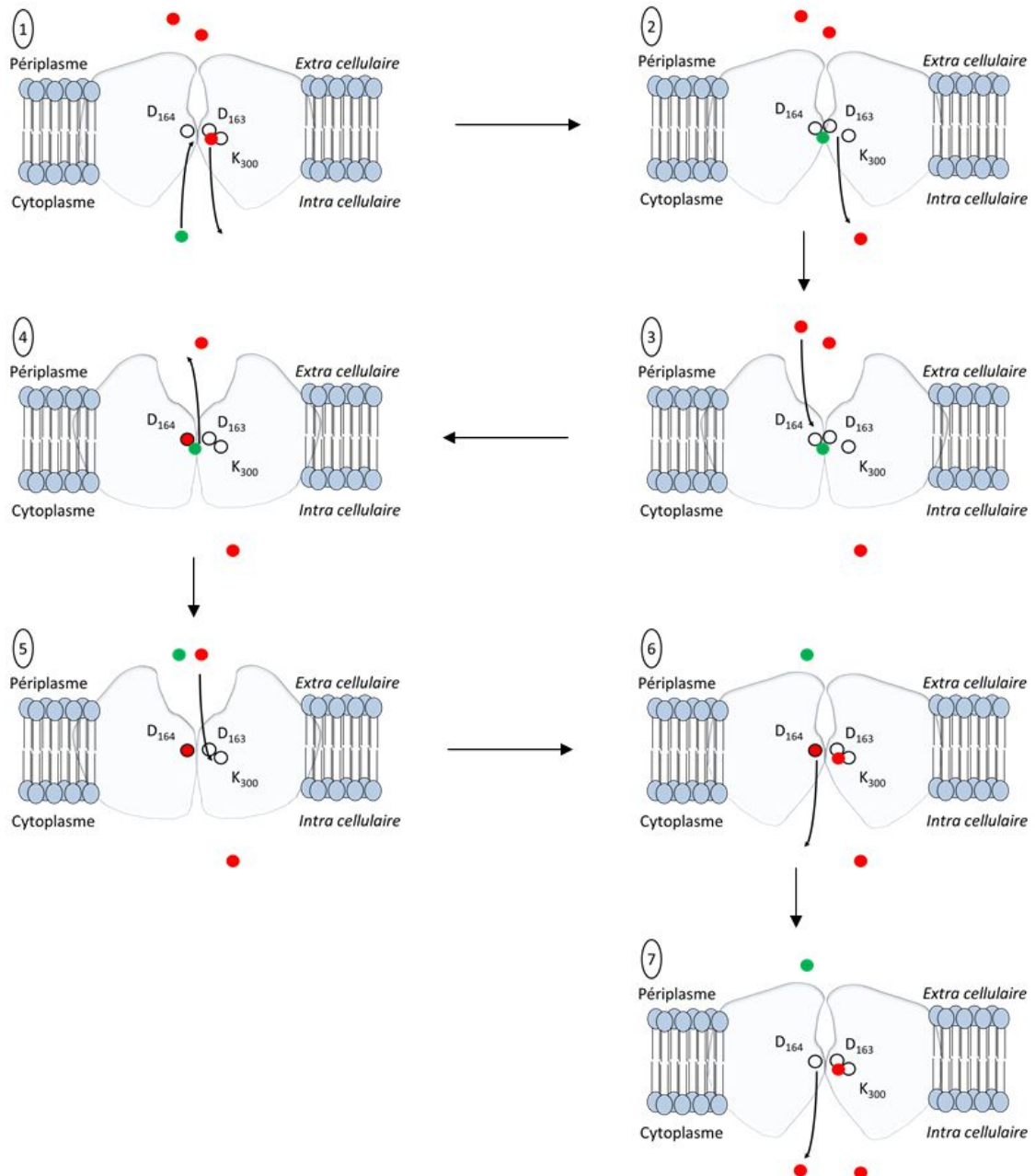


Figure 5.13 : mécanisme de transport de NhaA (d'après [35]). Les résidus acide aspartique (D) et lysine (K) du site actif sont figurés par des ronds vides. Un ion sodium est échangé avec deux protons. Les différentes étapes sont décrites dans le texte.

Très récemment, un nouveau modèle, basé sur des simulations de dynamique moléculaire, a apporté un éclairage nouveau sur la base d'une nouvelle cristallisation de la protéine à une haute résolution [36]. En réajustant les paramètres de l'hélice transmembranaire X (en déplaçant l'hélice de 3 acides aminés), les auteurs font apparaître au niveau du site actif une lysine L300 qui crée un pont salin avec Asp163 et qui permet d'expliquer le fonctionnement du canal.

Le fonctionnement de ce nouveau modèle est présenté figure 5.13. A pH acide, une liaison hydrogène est établie entre les résidus Asp163 et Lys 300. Lorsque le pH augmente, l'ion sodium entre en compétition avec le proton du pont salin, ce qui affaiblit la liaison hydrogène entre Asp163 et Lys300 qui relargue un premier proton (étapes 1 et 2). La fixation du sodium engendre un changement de conformation vers l'extérieur, ce qui relargue le

sodium (étapes 3 et 4). Les résidus Asp164 et Lys300 sont reprotonés, ce qui permet d'ouvrir le canal de nouveau vers l'intérieur (étapes 5 et 6). Le résidu Asp63 interagit alternativement avec la Lys300 par liaison hydrogène et avec l'ion sodium. Le bilan de la réaction est donc un transport de proton (via Asp164) et un échange proton/sodium (via Asp163/Lys). On obtient donc bien un échange de 2 protons pour un sodium (étape 7).

On peut cependant noter que cette cristallisation a été faite à pH acide, c'est-à-dire dans une conformation non active de la protéine.

La protéine NhaA sous une forme monomérique constitue l'unité fonctionnelle. Néanmoins, il existe une forme dimérique [40] qui est essentielle à la stabilité du transporteur. Cela a été montré par cryo-microscopie électronique de cristaux de NhaA en 2D [41]. Des barreaux bêta côté périplasma et des hélices alpha VI et VII transmembranaires sont impliquées et forment des structures en épingle à cheveux (α -hairpin et β -hairpin) à l'interface du dimère. Une délétion des feuilletts bêta avait montré qu'ils n'étaient pas essentiels à l'activité de la protéine [42]. Très récemment, une protéine NhaA tronquée, avec seulement 10 hélices transmembranaires, a montré qu'une double délétion des feuilletts bêta et des hélices impliquées dans la dimérisation permet de conserver l'activité de la protéine qui perd cependant sa stabilité [43].

La protéine NhaA a été choisie pour son activité électrogénique dans un système biomimétique. Elle peut en effet établir un potentiel membranaire grâce au transport d'un sodium contre 2 protons en suivant le gradient de concentration des ions.

5.2.2 Production de NhaA en système acellulaire

Les protéines membranaires nécessitent par définition un environnement lipidique pour leur repliement correct et leur fonctionnement, ce qui représente une difficulté importante pour leur surproduction sous forme recombinante. Un des problèmes clés lors de la surproduction de protéines et en particulier de protéines membranaires est la difficulté de prédire quel système de surproduction sera le plus efficace.

Nous avons tout d'abord utilisé un système acellulaire développé dans le laboratoire par l'équipe Therex. Il consiste en l'utilisation d'un système de transcription/traduction *in vitro* optimisé pour la surproduction de protéines membranaires avec l'ajout de liposomes dans la réaction de synthèse des protéines. Ceci présente plusieurs avantages : on s'affranchit des problèmes de toxicité liés à l'activité même du transporteur et on fournit à la protéine l'environnement lipidique dont elle a besoin pour son repliement. La taille des liposomes est inférieure à 200 nm avant la production et contient un mélange de lipides permettant à la fois la stabilité du liposome en solution et une bonne intégration de la protéine.

Cette première étape n'est toutefois pas la seule à déterminer un bon repliement de la protéine dans la membrane, d'autres facteurs interviennent, soit intrinsèques à la protéine, comme l'hydrophobicité des hélices et leurs interactions réciproques, soit extrinsèques comme le rayon de courbure des liposomes ou leur composition lipidique.

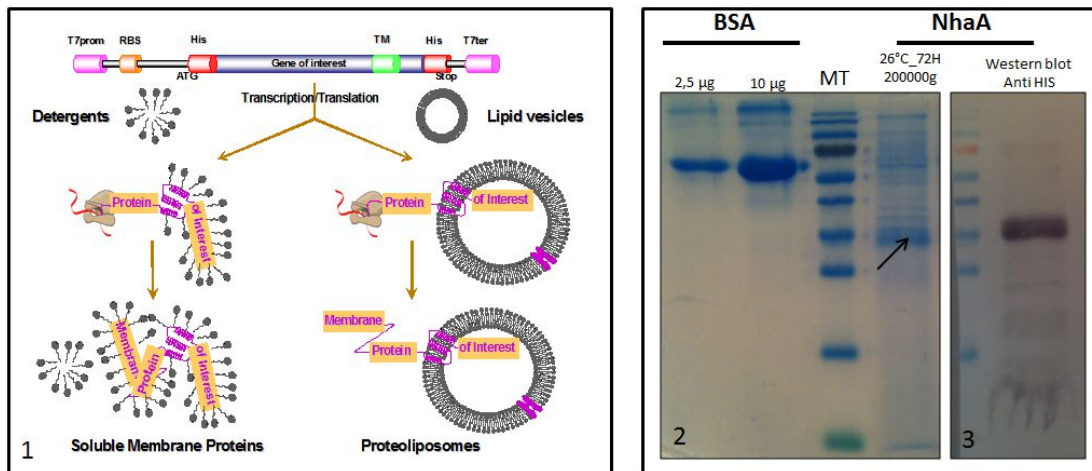


Figure 5.14 : Production de NhaA en système acellulaire. 1) A partir du clonage du gène d'intérêt, la production de la protéine membranaire est réalisée *in vitro* en présence de détergent ou de liposomes. 2) SDS-PAGE de la protéine surexprimée en protéoliposomes. La flèche indique la position de NhaA à 41 kDa apparent 3) Western-blot correspondant au SDS-PAGE.

Nous avons utilisé une version étiquetée de la protéine, avec une queue poly histidine présente en N-terminal. Le clonage a été réalisé dans le vecteur pIVEX2.4b. La synthèse a été réalisée en incorporant un mélange de lipides DOPC/DOPE/DMPA/Cholesterol (4/2/2/2) formant des liposomes préparés par sonication. Le protocole est décrit en détail dans une publication concernant la production d'une autre protéine membranaire d'intérêt [44]. Une ultracentrifugation sur gradient discontinu de sucrose permet de récupérer NhaA intégrée dans des protéoliposomes en éliminant la plupart des contaminants de la réaction de synthèse. Cependant, nous pouvons voir qu'il subsiste de nombreuses protéines contaminantes que nous avons essayé d'éliminer par lavages dans des tampons hypersalins (KCl 2M) ou en augmentant le pH grâce à un tampon bicarbonate (NaCO_3 , pH10) [45], [46] de façon à éliminer la majorité des protéines extrinsèques de la membrane des liposomes. Ces protéines viennent « coller » aux lipides ou aux protéines membranaires par diverses liaisons électrostatiques, hydrophobes ou via des cations divalents. Les lavages se sont révélés peu efficaces et nous n'avons pas continué dans cette voie.

5.2.3 Test d'activité par une méthode optique

Une première étape dans la réalisation de notre pile est de vérifier la fonctionnalité de la protéine. Nous avons utilisé pour cela des microcapsules nanostructurées constituant une sorte de cellule artificielle. La fabrication de telles capsules a été utilisée avec succès par Donald Martin et son équipe dès 2007 pour la construction d'une microcapsule intégrant une protéine de transport dans une membrane biomimétique [47]. Cette équipe a montré le transport effectif d'ions à travers une bis-gramicidine. La gramicidine a été modifiée dans une conformation bloquée par une liaison chimique covalente pour former un canal ionique permanent traversant la bicouche lipidique [48].

Les microcapsules sont fabriquées à partir d'un cœur de mélamine formol sur lequel sont déposés couche-par-couche des polyelectrolytes PAH/PSS, comme présenté dans la figure 5.16 et décrit précédemment [20] dans l'introduction de ce chapitre. Les billes sont lavées entre chaque dépôt par centrifugation dans de l'eau distillée.

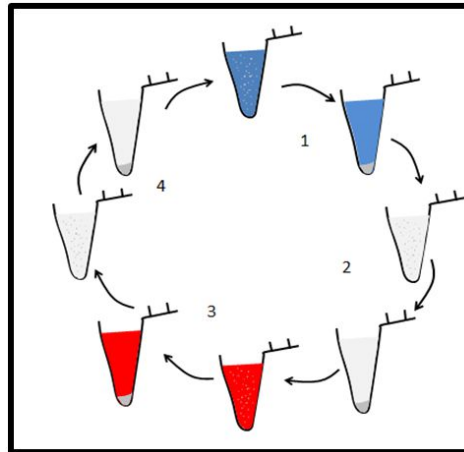


Figure 5.15 : adaptation du protocole pour le dépôt de polyélectrolytes sur des microcapsules de mélamine formol. Le PAH est symbolisé en bleu, le PSS en rouge, et l'eau distillée en gris.

La dissolution du cœur de mélamine [49] réalisée à pH acide après dépôt de 8 couches de polyélectrolytes permet d'obtenir des microcapsules de 6 μm de diamètre pouvant servir de support à une bicouche lipidique (figure 5.16).

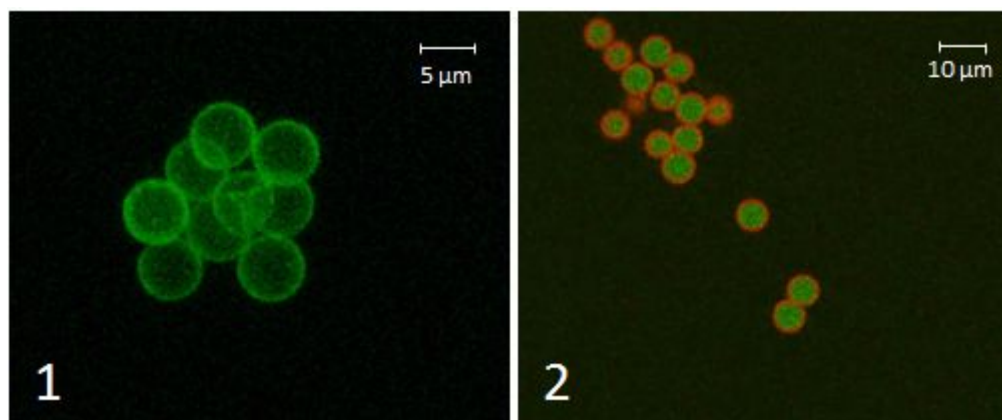


Figure 5.16 : photos des capsules biomimétiques observées en microscopie confocale. 1) Image 3D des capsules de polyélectrolyte colorées au BCECF ($\lambda_{exc}=488\text{nm}$, $\lambda_{em}=535\text{nm}$). 2) Image des capsules constituées de 9 couches (18 nm d'épaisseur) piégeant du BFECF par le dépôt d'une bicouche lipidique de DOPC/POPE/DMPA/cholestérol (4/2/2/2) et marquée par du Nile Red ($\lambda_{exc}=488\text{ nm}$, $\lambda_{em}=630\text{ nm}$).

La bicouche lipidique est formée par fusion de vésicules avec des liposomes. L'utilisation de colorants fluorescents sélectifs, d'une part de la phase aqueuse avec la fluorescéine ou le BCECF, et d'autre part de la bicouche lipidique avec le Nile Red, a permis de mettre en évidence l'existence d'une bicouche lipidique stable autour des capsules constituées de 8 à 9 couches de polyélectrolyte terminant soit par du PAH soit par du PSS. Après 24h, on observe toutefois une disparition de la fluorescence au centre de la vésicule pour ne conserver qu'une fluorescence associée au polyélectrolyte qui se comporte comme une éponge [20].

Nous avons utilisé ces capsules pour intégrer la protéine NhaA dans cette membrane biomimétique et vérifier son activité. Nous nous sommes basés sur les travaux de Lee *et al*

[30] utilisant des protéoliposomes constitués de membranes E.Coli inversées. Ces membranes contiennent à la fois le transporteur étudié mais également de l'ATPase. L'ajout d'ATP à l'extérieur des vésicules génère artificiellement un potentiel membranaire en acidifiant l'intérieur des vésicules. On peut alors jouer soit sur l'abolition du ΔpH ou du $\Delta\Psi$ en jouant sur les concentrations de K^+ en ajoutant de la valinomycine.

Dans notre expérience, l'incorporation de la protéine est réalisée par fusion des protéoliposomes contenant NhaA, préalablement lavés dans un tampon dépourvu de sodium et des microcapsules de 8 couches de PAH/PSS. Le témoin est constitué de liposomes contenant les mêmes lipides.

Le potentiel de la membrane est détectable par augmentation de la fluorescence du 9-amino, 6-chloro, 2-méthoxyacridine (ACMA). En effet, cette amine fluorescente est une sonde sensible au pH qui s'intègre aux membranes sous son état excité et sa fluorescence est atténuée quand un gradient de pH se forme. D'autre part, l'intérêt de cette sonde est que sa fluorescence est indépendante de sa concentration qui peut atteindre 200 μM sans former de dimères. Si la protéine est active, elle doit générer un potentiel de membrane lors de l'ajout de NaCl, en échangeant les protons qui se trouvent à l'intérieur de la vésicule avec le sodium se trouvant à l'extérieur avec une stœchiométrie 2 H^+ contre 1 Na^+ .

Pour les mesures de fluorescence, nous avons utilisé un microscope biphoton qui présente trois avantages majeurs : la précision du point de focalisation (car il faut que les 2 photons émis dans un temps très court puissent exciter le fluorophore et cela ne se produit que rarement, sauf dans le très petit volume confocal où cette probabilité est maximale), le photoblanchiment, qui est réduit au focus, et l'amélioration du rapport signal/bruit. L'analyse des résultats est présentée dans la figure 5.17. Un traitement des images développé sur le logiciel imageJ a été utilisé pour traiter les données de manière automatisée. Il comporte 3 étapes principales : un lissage gaussien facilitant la segmentation par reconnaissance de forme puis une mesure du niveau de gris de la fluorescence émise par le fluorophore (figure 5.17.1 et 5.17.2).

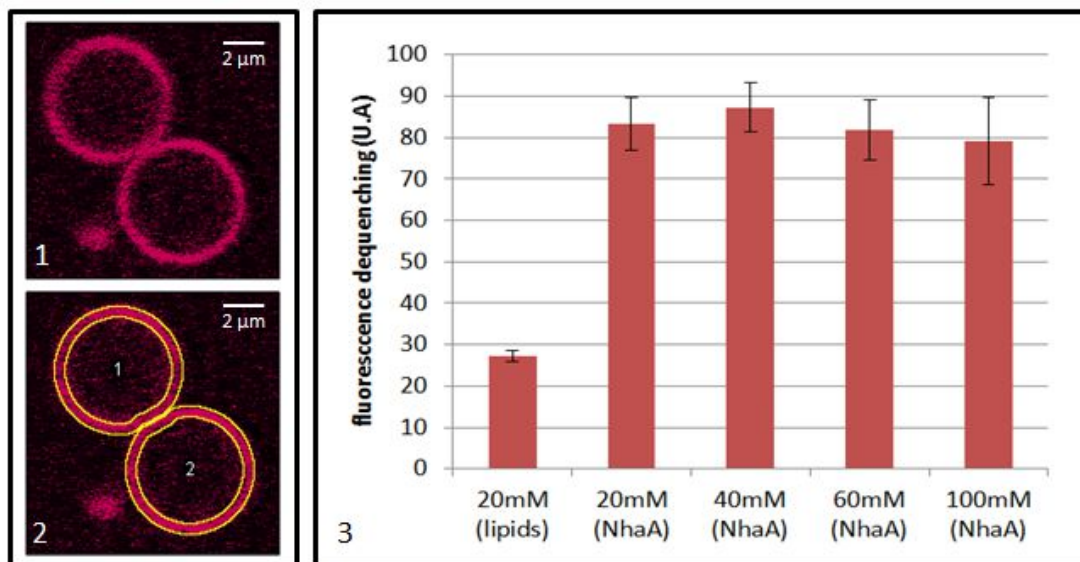


Figure 5.17: test d'activité de la protéine NhaA par une méthode optique. 1) Observation des vésicules par microscopie confocale biphoton avec la sonde ACMA. 2) repérage automatique des vésicules par traitement d'image. 3) Comparaison des niveaux de fluorescence après ajout de NaCl à l'extérieur des vésicules.

La comparaison des niveaux de fluorescence après l'ajout de sel est illustrée dans le tableau de la figure 5.17.3. Un gradient de pH artificiel est généré en préparant les capsules dans un tampon Hepes 10mM/KCl 150mM à pH 6,5 pendant le dépôt des lipides ou des

protéoliposomes. Les capsules sont ensuite placées dans le même tampon à pH 8,5. L'ajout de Na^+ à l'extérieur des vésicules crée un gradient de sodium de part et d'autre de la membrane biomimétique. Lorsque cette membrane n'est constituée que de lipides, l'imperméabilité de la bicouche lipidique ne génère pas de changement de fluorescence. En revanche, lorsque la membrane biomimétique est constituée de lipides et de la protéine NhaA, le sodium entre dans les vésicules en échange de 2 protons qui sortent, abolissant ainsi un potentiel membranaire visible par l'augmentation de fluorescence de la sonde ACMA.

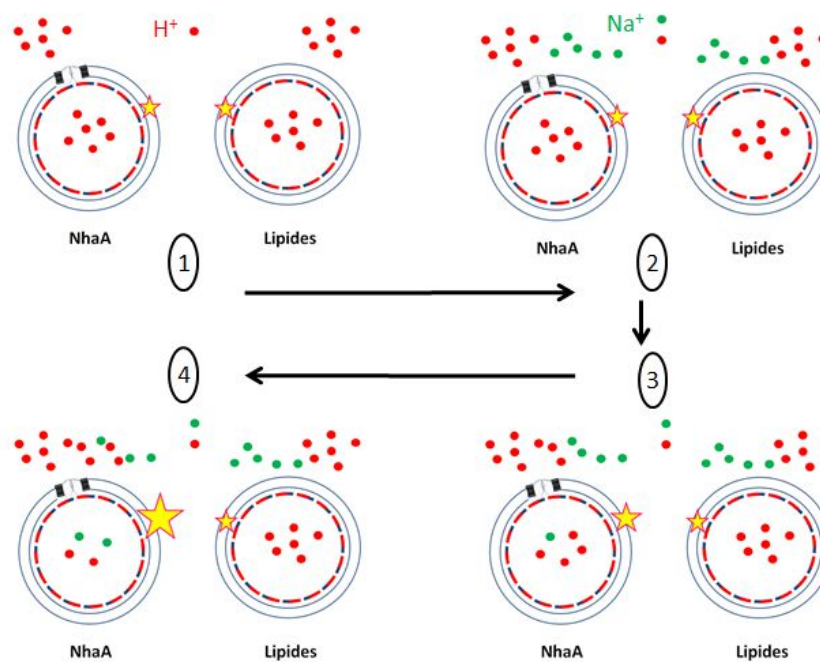


Figure 5.18 : modèle de fonctionnement de NhaA intégré dans des capsules biomimétiques.

Les capsules sont préparées avec un dépôt de lipides seuls ou de protéoliposomes contenant NhaA sur un coussin de polyélectrolyte de 16 couches. La solution baignant les capsules est composée de KCl 150mM à pH 8 (1). Les protons sont représentés par des ronds rouges. L'ACMA (étoile) est une sonde sensible à un gradient de pH incorporée dans la bicouche. L'ajout d'ions Na^+ (2) active NhaA qui échange 1 Na^+ de l'extérieur avec 2 protons de l'intérieur des capsules (3). La sortie des H^+ crée un gradient de protons qui augmente la fluorescence de l'ACMA (4).

La figure 5.18 présente la modélisation du fonctionnement du système. L'augmentation de la fluorescence dans les capsules contenant NhaA montre l'incorporation de la protéine et son activité. Le système est cependant saturable et l'ajout d'une quantité plus importante de sel ne permet pas d'augmenter plus la fluorescence. Cependant, cette expérience a ses limites et quelques améliorations sont à apporter pour valider totalement l'activité de la protéine comme l'ajout d'une base faible du type NH_4^+ qui aura le même effet sur des capsules contenant uniquement des lipides.

En incorporant NhaA dans des vésicules biomimétiques à base de polyélectrolyte, nous avons donc réussi à créer un gradient de protons à partir d'un gradient de sel. Nous avons également vu que ce système était saturable, car nous n'avons pas accès à l'intérieur de la vésicule. Nous avons donc utilisé le même principe d'incorporation sur une bicouche plane formée sur l'hydrogel interpénétré d'agarose et de polyélectrolyte que nous avons exposé au paragraphe 5.2.1.

5.3 Conception d'une membrane biomimétique contenant un canal ionique

Les deux éléments décrits dans les paragraphes précédents, à savoir le support d'hydrogel interpénétré décrit au (paragraphe 5.1.2.2) et la protéine NhaA surproduite en protéoliposomes (paragraphe 5.2.2.1), ont été associés pour fabriquer une membrane biomimétique. Le témoin de l'expérience est constitué d'une bicouche lipidique plane fabriquée par fusion de liposomes. La stabilité de la membrane biomimétique ayant intégré le transporteur a été vérifiée par mesure d'impédance au cours du temps (figure 5.19). Sur une des cellules de mesure, le système est resté stable pendant au moins 12 jours, date à laquelle des bulles se sont formées dans le dispositif et nous ont contraints à stopper les mesures. L'ajout de NaCl provoque une baisse transitoire de l'impédance qui confirme l'activité de la protéine.

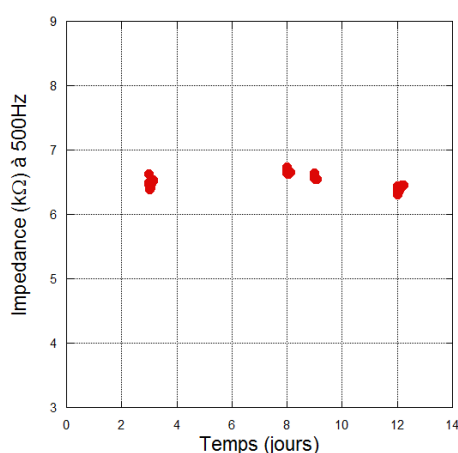


Figure 5.19 : mesure de l'impédance d'une membrane biomimétique incorporant NhaA et réponse à l'ajout de NaCl. La mesure est réalisée entre 2 électrodes d'or placées dans les compartiments séparés par la membrane biomimétique. Le dispositif est présenté figure 5.5.

Ce dispositif est le premier dispositif stable de membrane biomimétique sur une grande surface de support poreux séparant 2 compartiments liquides accessibles. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, la stabilité d'une BLM est de l'ordre de l'heure sur une surface maximale de 0,2 mm². Nous avons ici une surface de 38 mm² (le diamètre de la chambre est de 7 mm) et la stabilité est de plus de 12 jours. La performance est donc multipliée par un facteur 200 pour la surface et par un facteur 300 pour la stabilité.

Pour confirmer l'incorporation de NhaA dans notre système biomimétique et la création d'un gradient de protons à partir d'un gradient de sel, nous avons introduit dans les chambres de la quinhydrone, une sonde redox sensible au pH. Ce composé présente l'avantage lors de sa dissolution de présenter les formes oxydée (benzoquinone) et réduite (hydroquinone) dans les mêmes proportions. L'expérience est présentée figure 5.21. Chaque chambre est remplie avec un tampon (HEPES 10mM pH 8,5, KCl 150mM, quinhydrone 1mM). L'introduction d'ions Na⁺ (12,5mM final) dans la chambre supérieure (étape 1) crée un gradient de sodium de part et d'autre de la membrane biomimétique, ce qui active NhaA (étape 2). Le passage de sodium de la chambre supérieure à la chambre inférieure par le canal ionique est couplé au passage inverse des protons. La génération du gradient de protons est observée par l'oxydation de la quinone dans la chambre inférieure (3a) et la réduction de la quinone dans la chambre supérieure (3b), établissant ainsi un potentiel de part et d'autre de la membrane biomimétique par transfert électronique au niveau des électrodes d'or.

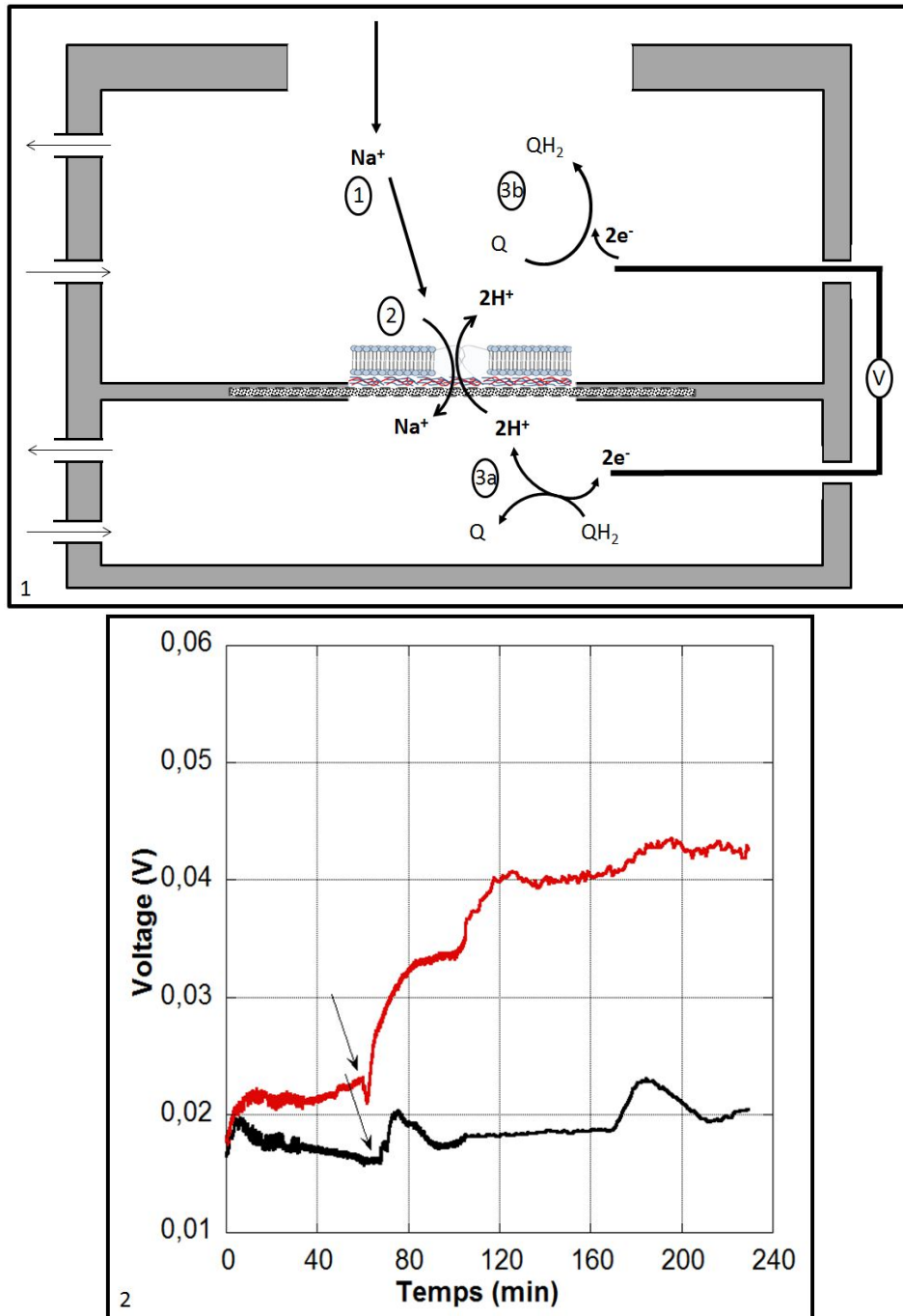


Figure 5.20 : fabrication d'un gradient de pH à partir d'un gradient de sel sur une membrane biomimétique plane. 1) Principe de mesure dans la chambre de diffusion. 2) Suivi du potentiel entre les 2 chambres au cours du temps. Les flèches indiquent l'ajout de 12,5mM de NaCl.

La figure 5.20.2 montre le résultat de l'ajout de sel sur le potentiel. Nous voyons que 12,5 mM de sel génèrent un potentiel environ 20mV. Cette expérience a été réalisée plusieurs fois en fournissant les mêmes valeurs, ce qui nous conforte dans l'idée que nous avons bien généré un potentiel électrique à partir d'un système biomimétique intégrant une protéine canal.

A l'issue de l'obtention de ce potentiel, nous avons tenté sans succès de mesurer le courant de notre biopile. Une des hypothèses que nous avons soulevée est la transformation à

un pH supérieur à 8 du diphénol de la quinhydrone en diphénate. La présence de ces nouvelles espèces rend l'analyse plus complexe car ces formes acido-basiques peuvent induire des changements de pH [50], [51].

La solution que nous avons envisagée pour l'avenir est de simplifier la mesure en s'affranchissant de la présence de quinhydrone. Notre système se comportera alors comme un super condensateur : l'ajout de sel activera la protéine échangeuse qui permet l'accumulation des charges au niveau des électrodes de mesures au niveau de la double couche électrochimique. Le transfert électronique se fera alors par couplage capacitif. La décharge provoque le relargage des ions dans la solution et la circulation des électrons dans le circuit.

5.4 Conclusion et perspectives du chapitre 5

Dans ce chapitre, nous avons décrit la réalisation d'une pile biomimétique à partir d'un support constitué d'un polymère poreux supportant une membrane lipidique, où est inséré un canal ionique spécifique. La complexité du dispositif et sa manutention (présence de bulles, fuites éventuelles) ainsi que les nombreuses étapes de fabrication de cette membrane, mènent à des résultats peu reproductibles.

Le principal écueil est la fabrication d'un support d'une homogénéité quasi-parfaite. Des images de microscopie électronique de filtres de polycarbonate montrent une certaine hétérogénéité dans la distribution des pores. Le type d'agarose à faible point de fusion peut varier selon la marque et même selon le lot. Enfin, le procédé de fusion est difficile à contrôler, et produit un film dans lequel on ne peut exclure des micro-cassures rompant la continuité du gel interpénétré, ou des zones où de l'agarose est encore présent, limitant la diffusion.

Sur les multiples essais réalisés, nous avons toutefois observé un potentiel de 20mV sur 5 expériences indépendantes avec une membrane biomimétique stable pendant au moins 12 jours sur une surface de presque 0,4 cm².

Il existe peu d'exemples à l'heure actuelle sur des systèmes biomimétiques suffisamment stables pour être utilisés. Nous pouvons citer 2 exemples :

Le séquençage de 4^{ème} génération utilise en partie un système biomimétique [52], en particulier le système MinIon, commercialisé par Oxford Nanopore Technologies. Dans ce type de séquençage par nanopore, l'ADN est décodé via les signaux électriques générés lors du passage de chaque base azotée dans un nanocanal inséré dans une membrane biomimétique [53].

Le nanopore peut être formé d'une protéine canal extrêmement stable, MspA [54]. Sa structure tridimensionnelle n'est pas détruite par les solvants organiques, et elle peut résister à un stress thermique à 100°C avec 2% de SDS [55]. La porine est ensuite intégrée dans une membrane biomimétique constituée d'analogues de lipides mimant son environnement naturel, ou même directement sur une surface de graphite pyrolytique hautement orienté [56].

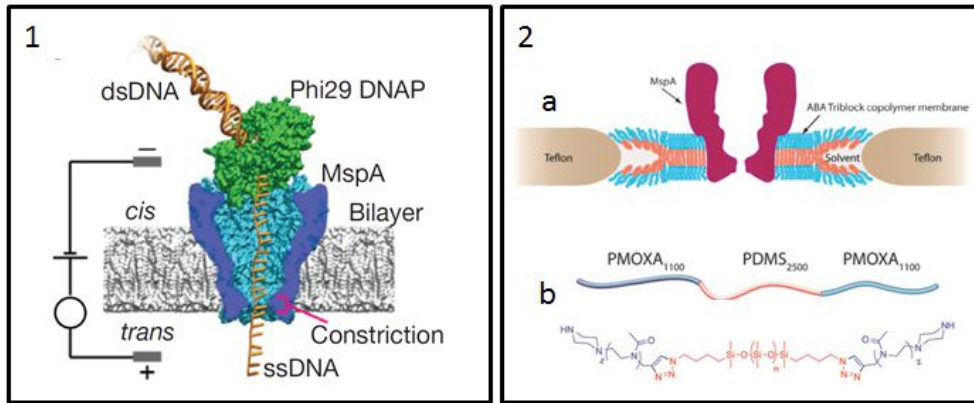


Figure 5.21 : membrane biomimétique de séquençage nanopore reproduit de [52], [57]. 1) principe de fonctionnement du séquençage par nanopore : la protéine nanopore MspA est représentée en bleu, l'ADN polymérase phi29 en vert et l'ADN en orange. Une tension appliquée de part et d'autre de la membrane entraîne un courant ionique à travers le pore, et un amplificateur mesure le courant. Le passage des différentes bases de l'ADN dans l'étranglement produit un courant ionique différent mesuré au niveau des électrodes. La polymérase permet le guidage de l'ADN dans le pore. 2) (a) Une optimisation du système de séquençage par nanopore avec (b) l'utilisation d'un tri-bloc copolymère ABA.

D'autres systèmes de stabilisation utilisent des murs d'agarose ou d'autres polymères enrobant la membrane biomimétique pour lui conférer une stabilité de l'ordre d'une semaine [57]. Très récemment, la bicouche lipidique a été remplacée par un tri-bloc copolymère conférant une stabilité plus grande à la membrane [58].

Un deuxième exemple a permis la création d'une société danoise, Aquaporin, qui s'appuie sur les recherches concernant la filtration d'eau par osmose [59]–[61].

On retrouve l'utilisation de lipides naturels ou de tri-blocs copolymères pour former la membrane biomimétique. Elle est dans ce cas constituée de vésicules de pMOXA_a-PDMS_b-pMOXA_c (poly(2-méthyl-oxazoline-block-diméthylsiloxane-block-2-méthyl-oxazoline), un tri-bloc copolymère mimant une bicouche lipidique dans lequel est incluse l'aquaporine Z [62].

Ces vésicules sont appelées des protéopolymersomes en référence aux protéoliposomes.

Ces protéopolymersomes en contact étroit dans un polymère polyamide formé par réticulation [63] déposé sur un support polymérique poreux de polysulfone de très grande surface.

La membrane biomimétique n'est alors plus constituée d'un seul élément, mais d'un ensemble de liposomes interconnectés dans un réseau plus ou moins hydrophobe qui force l'eau à emprunter l'intérieur des vésicules.

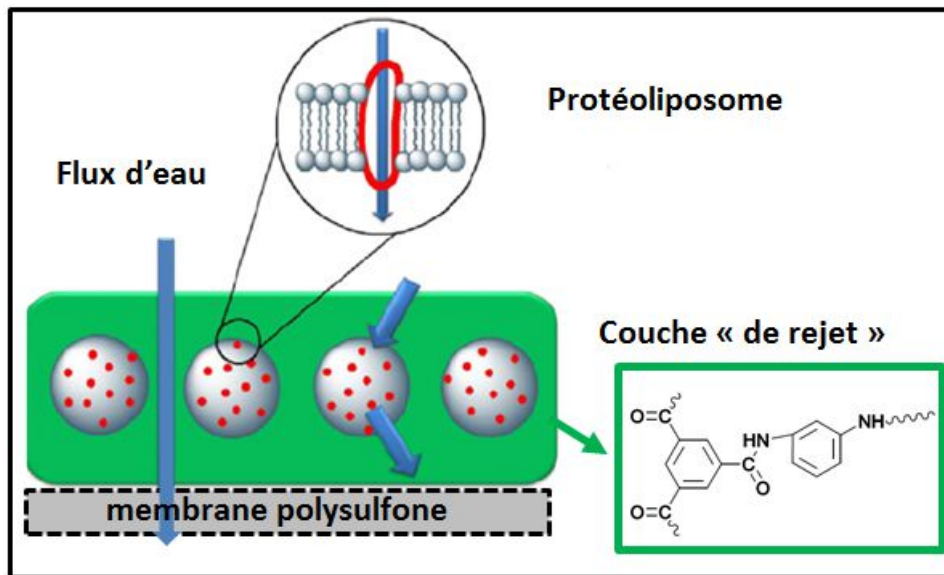


Figure 5.22 : membrane biomimétique de filtration d'eau d'après [63]

L'utilisation de ce type de construction de vésicules interconnectées dans un polymère sera la prochaine étape de la construction d'une membrane biomimétique stable pouvant générer une différence de potentiel. D'autres optimisations sont également envisageables en ce qui concerne les protéines recombinantes, par exemple en utilisant la protéine NhaA provenant d'autres organismes, comme celle d'*Helicobacter Pylori* qui a un turn-over trois fois plus rapide que celle d'*E.coli* et fonctionne à un pH plus acide d'une unité de pH [64], [65]. Nous avons également commencé à optimiser la production de la protéine NhaA en la produisant non pas en système acellulaire, mais en bactérie.

La surproduction de NhaA en système bactérien a en effet donné de bons résultats quant au taux d'expression et de purification obtenus. Le clonage de la protéine a été réalisé dans le vecteur pET11a à partir du clone Pivex2.4b::NhaA. La souche C43 (DE3) d'*E.coli* a été choisie pour la transformation et l'expression du clone. C'est une souche mutante de la souche BL21(DE3) utilisée plus classiquement dans la surexpression de protéines chez *E.coli*.

L'avantage principal de l'utilisation de la souche C43 est sa capacité à fabriquer un grand nombre de membranes intracellulaires qui peuvent servir de support à la fabrication des protéines membranaires, en évitant ainsi la formation de corps d'inclusion (figure 5.23.2). La purification de la protéine a été réalisée en deux étapes (figure 5.23.1). La première étape de purification consiste à isoler les membranes d'*E.coli* par ultracentrifugation. Elle permet d'éliminer les protéines solubles du lysat. La seconde étape est la solubilisation de NhaA par un détergent doux, le dodécylmaltoside (DDM) et sa purification par affinité sur une colonne IMAC (Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography). En effet, la protéine surproduite est une version étiquetée avec 6 histidines en N-terminal de la protéine, qui peut interagir avec le Nickel par des liaisons de coordination. Cette technique nous a permis d'obtenir de grandes quantités de NhaA à forte concentration (de 1 à 2 mg/mL). Le SDS-PAGE de purification de la protéine est présenté figure 5.23.3.

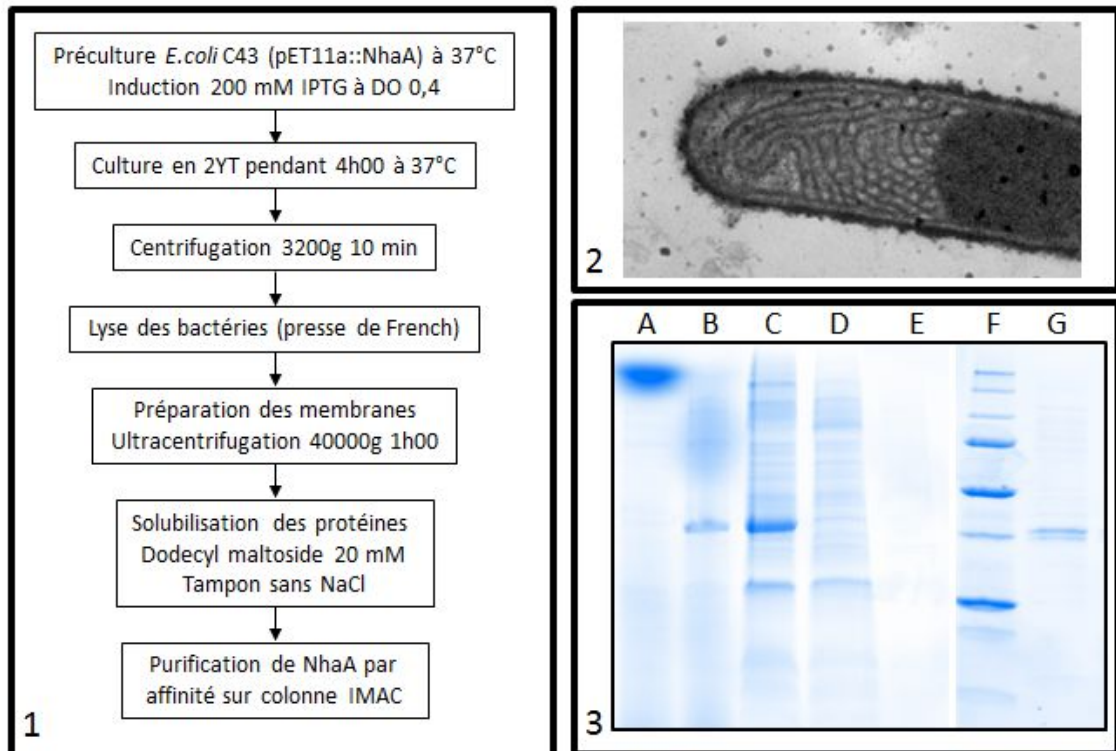


Figure 5.15 : Surproduction de NhaA en bactérie E.coli C43.

1) Protocole de culture et de purification de NhaA selon [66]. 2) E.coli C43 (DE3) vue au microscope électronique lors de la production de la sous-unité b de l'ATPase après 18H d'induction [67]. 3) Purification de NhaA surproduite dans C43 : A) C43 non induit. B) extrait brut de lysat induit. C) fraction membranaire + DDM. D) Fraction non retenu sur colonne IMAC, 10mM imidazole. E) Lavage 25mM imidazole. F) Marqueur de poids moléculaire. G) Fraction d'élution à 500mM imidazole.

La quantité et la pureté de la protéine NhaA surproduite en bactérie et purifiée en détergent devrait permettre d'optimiser la génération d'un plus fort gradient électrochimique.

5.5 Références du chapitre 5

- [1] E. S. Johonnott, « LXVIII. The black spot in thin liquid films », *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, vol. 11, n° 66, p. 746–753, 1906.
- [2] E. T. Castellana et P. S. Cremer, « Solid supported lipid bilayers: From biophysical studies to sensor design », *Surface Science Reports*, vol. 61, n° 10, p. 429–444, 2006.
- [3] D. Martin, *Nanobiotechnology of biomimetic membranes*, vol. 1. Springer Science & Business Media, 2007.
- [4] K. Koeper, E. C. Slob, S. Lambot, et others, « Incorporating near surface layering for improved surface water content estimates », in *67. Jahrestagung der Deutschen Geophysikalischen Gesellschaft*, 2007.
- [5] O. G. Mouritsen, « Lipids, curvature, and nano-medicine », *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 113, n° 10, p. 1174–1187, 2011.
- [6] J. R. Burns, A. Seifert, N. Fertig, et S. Howorka, « A biomimetic DNA-based channel for the ligand-controlled transport of charged molecular cargo across a biological membrane », *Nature nanotechnology*, 2016.
- [7] K. B. Blodgett, *Film structure and method of preparation*. Google Patents, 1940.
- [8] R. P. Richter, N. Maury, et A. R. Brisson, « On the effect of the solid support on the interleaflet distribution of lipids in supported lipid bilayers », *Langmuir*, vol. 21, n° 1, p. 299–304, 2005.
- [9] E. Reimhult, M. Zäch, F. Höök, et B. Kasemo, « A multitechnique study of liposome adsorption on Au and lipid bilayer formation on SiO₂ », *Langmuir*, vol. 22, n° 7, p. 3313–3319, 2006.
- [10] K. Sugihara, B. Jang, M. Schneider, J. Vörös, et T. Zambelli, « A universal method for planar lipid bilayer formation by freeze and thaw », *Soft Matter*, vol. 8, n° 20, p. 5525–5531, 2012.
- [11] H. P. Vacklin, F. Tiberg, et R. K. Thomas, « Formation of supported phospholipid bilayers via co-adsorption with β -D-dodecyl maltoside », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, vol. 1668, n° 1, p. 17–24, 2005.
- [12] N.-J. Cho, S.-J. Cho, K. H. Cheong, J. S. Glenn, et C. W. Frank, « Employing an amphipathic viral peptide to create a lipid bilayer on Au and TiO₂ », *Journal of the American Chemical Society*, vol. 129, n° 33, p. 10050–10051, 2007.
- [13] F. Giess, M. G. Friedrich, J. Heberle, R. L. Naumann, et W. Knoll, « The protein-tethered lipid bilayer: a novel mimic of the biological membrane », *Biophysical journal*, vol. 87, n° 5, p. 3213–3220, 2004.
- [14] S. R. Tabaei, J. A. Jackman, S.-O. Kim, V. P. Zhdanov, et N.-J. Cho, « Solvent-assisted lipid self-assembly at hydrophilic surfaces: factors influencing the formation of supported membranes », *Langmuir*, vol. 31, n° 10, p. 3125–3134, 2015.
- [15] S. R. Tabaei, J.-H. Choi, G. Haw Zan, V. P. Zhdanov, et N.-J. Cho, « Solvent-assisted lipid bilayer formation on silicon dioxide and gold », *Langmuir*, vol. 30, n° 34, p. 10363–10373, 2014.
- [16] M. Tanaka et E. Sackmann, « Polymer-supported membranes as models of the cell surface », *Nature*, vol. 437, n° 7059, p. 656–663, 2005.
- [17] E. Karatekin et J. E. Rothman, « Fusion of single proteoliposomes with planar, cushioned bilayers in microfluidic flow cells », *Nature protocols*, vol. 7, n° 5, p. 903–920, 2012.
- [18] S. Hertrich, F. Stetter, A. Rühm, T. Hugel, et B. Nickel, « Highly hydrated deformable polyethylene glycol-tethered lipid bilayers », *Langmuir*, vol. 30, n° 31, p. 9442–9447, 2014.
- [19] B. A. Cornell, V. L. B. Braach-Maksyvtis, L. G. King, P. D. J. Osman, B. Raguse, L. Wieczorek, R. J. Pace, et others, « A biosensor that uses ion-channel switches », *NATURE-LONDON*, p. 580–582, 1997.
- [20] B. Stidder, J.-P. Alcaraz, L. Liguori, N. Khalef, A. Bakri, E. B. Watkins, P. Cinquin, et D. K. Martin, « Biomimetic membrane system composed of a composite interpenetrating hydrogel film and a lipid bilayer », *Advanced Functional Materials*, vol. 22, n° 20, p. 4259–4267, 2012.
- [21] G. Decher, « Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites », *science*, vol. 277, n° 5330, p. 1232–1237, 1997.
- [22] O. V. Lebedeva, B.-S. Kim, K. Vasilev, et O. I. Vinogradova, « Salt softening of polyelectrolyte multilayer microcapsules », *Journal of colloid and interface science*, vol. 284, n° 2, p. 455–462, 2005.
- [23] O. Călinescu et K. Fendler, « A universal mechanism for transport and regulation of CPA sodium proton exchangers », *Biological chemistry*, vol. 396, n° 9-10, p. 1091–1096, 2015.
- [24] W. Buckel, « Sodium ion-translocating decarboxylases », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, vol. 1505, n° 1, p. 15–27, 2001.
- [25] T. Granjon, O. Maniti, Y. Auchli, P. Dahinden, R. Buchet, O. Marcillat, et P. Dimroth, « Structure-function relations in oxaloacetate decarboxylase complex. Fluorescence and infrared approaches to monitor oxomalonnate and Na⁺ binding effect », *PloS one*, vol. 5, n° 6, p. e10935, 2010.
- [26] M. Donowitz, C. M. Tse, et D. Fuster, « SLC9/NHE gene family, a plasma membrane and organellar family of Na⁺/H⁺ exchangers », *Molecular aspects of medicine*, vol. 34, n° 2, p. 236–251, 2013.
- [27] D. G. Fuster, J. Zhang, M. Shi, I. A. Bobulescu, S. Andersson, et O. W. Moe, « Characterization of the sodium/hydrogen exchanger NHA2 », *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 19, n° 8, p. 1547–1556, 2008.
- [28] C. L. Brett, M. Donowitz, et R. Rao, « Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers », *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, vol. 288, n° 2, p. C223–C239, 2005.
- [29] V. R. Chintapalli, A. Kato, L. Henderson, T. Hirata, D. J. Woods, G. Overend, S. A. Davies, M. F. Romero, et J. A. Dow, « Transport proteins NHA1 and NHA2 are essential for survival, but have distinct transport modalities », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 112, n° 37, p. 11720–11725, 2015.

- [30] C. Lee, H. J. Kang, C. Von Ballmoos, S. Newstead, P. Uzdavinyas, D. L. Dotson, S. Iwata, O. Beckstein, A. D. Cameron, et D. Drew, « A two-domain elevator mechanism for sodium/proton antiport », *Nature*, vol. 501, n° 7468, p. 573–577, 2013.
- [31] O. Călinescu, E. Danner, M. Böhm, C. Hunte, et K. Fendler, « Species differences in bacterial NhaA Na⁺/H⁺ exchangers », *FEBS letters*, vol. 588, n° 17, p. 3111–3116, 2014.
- [32] M. V. Radchenko, K. Tanaka, R. Waditee, S. Oshimi, Y. Matsuzaki, M. Fukuhara, H. Kobayashi, T. Takabe, et T. Nakamura, « Potassium/proton antiport system of Escherichia coli », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, n° 29, p. 19822–19829, 2006.
- [33] E. Pinner, E. Padan, et S. Schuldiner, « Kinetic properties of NhaB, a Na⁺/H⁺ antiporter from Escherichia coli. », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 269, n° 42, p. 26274–26279, 1994.
- [34] C. Hunte, E. Screpanti, M. Venturi, A. Rimon, E. Padan, & H. Michel, « Structure of a Na⁺/H⁺ antiporter and insights into mechanism of action and regulation by pH. » *Nature*, vol. 435, n° 7046, p. 1197–1202, 2005. [35] P. A. Dibrov, « Calcium transport mediated by NhaA, a Na⁺/H⁺ antiporter from Escherichia coli », *FEBS letters*, vol. 336, n° 3, p. 530–534, 1993.
- [36] C. Lee, S. Yashiro, D. L. Dotson, P. Uzdavinyas, S. Iwata, M. S. Sansom, C. von Ballmoos, O. Beckstein, D. Drew, et A. D. Cameron, « Crystal structure of the sodium–proton antiporter NhaA dimer and new mechanistic insights », *The Journal of general physiology*, vol. 144, n° 6, p. 529–544, 2014.
- [37] E. Padan & M. Dwivedi, « Overexpression, Isolation, Purification, and Crystallization of NhaA », in *Methods in Enzymology*, vol. 557, Elsevier, p. 135–148, 2015
- [38] B. Roux, « A proton-controlled check valve for sodium ion transport », *Nature chemical biology*, vol. 3, n° 10, p. 609–610, 2007.
- [39] D. Taglicht, E. Padan, et S. Schuldiner, « Overproduction and purification of a functional Na⁺/H⁺ antiporter coded by nhaA (ant) from Escherichia coli. », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 266, n° 17, p. 11289–11294, 1991.
- [40] E. Padan, L. Kozachkov, K. Herz, & A. Rimon, « NhaA crystal structure: functional–structural insights », *Journal of Experimental Biology*, vol. 212, n° 11, p. 1593–1603, 2009.
- [41] K. A. Williams, « Three-dimensional structure of the ion-coupled transport protein NhaA », *Nature*, vol. 403, n° 6765, p. 112–115, 2000.
- [42] A. Rimon, T. Tzuber, et E. Padan, « Monomers of the NhaA Na⁺/H⁺ antiporter of Escherichia coli are fully functional yet dimers are beneficial under extreme stress conditions at alkaline pH in the presence of Na⁺ or Li⁺ », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, n° 37, p. 26810–26821, 2007.
- [43] E. Padan, T. Danieli, Y. Keren, D. Alkoby, G. Masrati, T. Haliloglu, N. Ben-Tal, et A. Rimon, « NhaA antiporter functions using 10 helices, and an additional 2 contribute to assembly/stability », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 112, n° 41, p. E5575–E5582, 2015.
- [44] L. Liguori, B. Stidder, J.-P. Alcaraz, J.-L. Lenormand, P. Cinquin, & D. K. Martin, « Cell-free production of VDAC directly into liposomes for integration with biomimetic membrane systems », *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, vol. 46, n° 6, p. 546–551, 2015.
- [45] Y. Fujiki, S. Fowler, H. Shio, A. L. Hubbard, et P. B. Lazarow, « Polypeptide and phospholipid composition of the membrane of rat liver peroxisomes: comparison with endoplasmic reticulum and mitochondrial membranes. », *The Journal of Cell Biology*, vol. 93, n° 1, p. 103–110, 1982.
- [46] M. P. Molloy, « Isolation of bacterial cell membranes proteins using carbonate extraction », *2D PAGE: Sample Preparation and Fractionation in Method in Molecular Biology*, vol. 142, p. 397–401, 2008.
- [47] A. R. Battle, S. M. Valenzuela, A. Mechler, R. J. Nichols, S. Praporski, I. L. Di Maio, H. Islam, A. P. Girard-Egrot, B. A. Cornell, J. Prashar, et others, « Novel engineered ion channel provides controllable ion permeability for polyelectrolyte microcapsules coated with a lipid membrane », *Advanced Functional Materials*, vol. 19, n° 2, p. 201–208, 2009.
- [48] V. Krishnamurthy, K. Y. Luk, B. Cornell, J. Prashar, I. L. Di Maio, H. Islam, A. R. Battle, S. M. Valenzuela, et D. K. Martin, « Gramicidin ion channel-based biosensors: Construction, stochastic dynamical models, and statistical detection algorithms », *Sensors Journal, IEEE*, vol. 7, n° 9, p. 1281–1288, 2007.
- [49] G. Gao, S. Moya, H. Lichtenfeld, A. Casoli, H. Fiedler, E. Donath, et H. Mohwald, « The decomposition process of melamine formaldehyde cores: the key step in the fabrication of ultrathin polyelectrolyte multilayer capsules », *Macromolecular Materials and Engineering*, vol. 286, n° 6, p. 355–361, 2001.
- [50] B. Jean-Louis, *Méthodes électrochimiques d'analyse*. Lavoisier, 2012.
- [51] W. Vonau et U. Guth, « pH Monitoring: a review », *J Solid State Electrochem*, vol. 10, n° 9, p. 746–752, 2006.
- [52] A. H. Laszlo, I. M. Derrington, B. C. Ross, H. Brinkerhoff, A. Adey, I. C. Nova, J. M. Craig, K. W. Langford, J. M. Samson, R. Daza, et others, « Decoding long nanopore sequencing reads of natural DNA », *Nature biotechnology*, vol. 32, n° 8, p. 829–833, 2014.
- [53] Y. Feng, Y. Zhang, C. Ying, D. Wang, et C. Du, « Nanopore-based fourth-generation DNA sequencing technology », *Genomics, proteomics & bioinformatics*, vol. 13, n° 1, p. 4–16, 2015.
- [54] C. Heinz, « The Core of the Tetrameric Mycobacterial Porin MspA Is an Extremely Stable beta -Sheet Domain », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, n° 10, p. 8678–8685, 2003.
- [55] S. H. Bossmann, K. Janik, M. R. Pokhrel, et M. Niederweis, « Experimental Strategies Toward the Use of the Porin MspA as a Nanotemplate and for Biosensors », in *NanoBioTechnology*, ISBN 978-1-58829-894-2, p. 19–39, 2008.
- [56] O. Shoseyov et I. Levy, *NanoBioTechnology bioinspired devices and materials of the future*. Totowa, N.J.: Humana Press, 2008.
- [57] L.-Q. Gu et J. W. Shim, « Single molecule sensing by nanopores and nanopore devices », *The Analyst*, vol. 135, n° 3, p. 441–451, 2010. [58]

- [58] D. Morton, S. Mortezaei, S. Yemenicioglu, M. J. Isaacman, I. C. Nova, J. H. Gundlach, et L. Theogarajan, « Tailored polymeric membranes for Mycobacterium smegmatis porin A (MspA) based biosensors », *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 3, n° 25, p. 5080–5086, 2015.
- [59] C. H. Nielsen, « Biomimetic membranes for sensor and separation applications », *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 395, n° 3, p. 697–718, oct. 2009.
- [60] Y. Kaufman et V. Freger, *Supported biomimetic membranes for pressure-driven water purification*. INTECH Open Access Publisher, 2011.
- [61] C. Y. Tang, Y. Zhao, R. Wang, C. Hélix-Nielsen, et A. G. Fane, « Desalination by biomimetic aquaporin membranes: Review of status and prospects », *Desalination*, vol. 308, p. 34–40, 2013.
- [62] H.-J. Choi et C. D. Montemagno, « Recent Progress in Advanced Nanobiological Materials for Energy and Environmental Applications », *Materials*, vol. 6, n° 12, p. 5821–5856, 2013.
- [63] Y. Zhao, C. Qiu, X. Li, A. Vararattanavech, W. Shen, J. Torres, C. Hélix-Nielsen, R. Wang, X. Hu, A. G. Fane, et C. Y. Tang, « Synthesis of robust and high-performance aquaporin-based biomimetic membranes by interfacial polymerization-membrane preparation and RO performance characterization », *Journal of Membrane Science*, vol. 423–424, p. 422–428, déc. 2012.
- [64] Y. Tsuboi, H. Inoue, N. Nakamura, et H. Kanazawa, « Identification of membrane domains of the Na⁺/H⁺ antiporter (NhaA) protein from Helicobacter pylori required for ion transport and pH sensing », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, n° 24, p. 21467–21473, 2003.
- [65] N. Kuwabara, H. Inoue, Y. Tsuboi, N. Nakamura, et H. Kanazawa, « The fourth transmembrane domain of the Helicobacter pylori Na⁺/H⁺ antiporter NhaA faces a water-filled channel required for ion transport », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, n° 39, p. 40567–40575, 2004.
- [66] J. Kubicek, H. Block, B. Maertens, A. Spriestersbach, et J. Labahn, « Expression and Purification of Membrane Proteins », in *Methods in Enzymology*, vol. 541, Elsevier, 2014, p. 117–140.
- [67] I. Arechaga, B. Miroux, S. Karrasch, R. Huijbregts, B. de Kruijff, M. J. Runswick, et J. E. Walker, « Characterisation of new intracellular membranes in Escherichia coli accompanying large scale over-production of the b subunit of F₁F₀ ATP synthase », *FEBS letters*, vol. 482, n° 3, p. 215–219, 2000.

Conclusion et perspectives générales

Au cours de cette thèse, de nombreuses optimisations ont été apportées pour améliorer le fonctionnement d'une biopile implantée.

- Nous avons en premier lieu imaginé une solution nous permettant de diminuer la complexité de l'expérimentation animale pour contrôler périodiquement les performances de la biopile sur **animal libre de ses mouvements** grâce à un connecteur fixé sur le crâne.

- Nous avons montré la possibilité de générer suffisamment de puissance ($160\mu\text{W}/\text{mL}$) pour alimenter un pacemaker grâce à un **nouveau design miniaturisé** de biopile implanté chez le rat. Puisque les carburants de la biopile ne sont pas embarqués, le rapport puissance / volume de la biopile est très élevé. Ceci permet de multiplier par 30 la capacité volumique par rapport aux meilleures piles au Lithium produisant de 10 à 20 $\mu\text{W}/\text{mL}$. Cela signifie également que (i) les $100\mu\text{W}$ générés par un système de récupération d'énergie physique sont dépassés par l'énergie chimique, (ii) quelques mL de cette biopile seraient suffisants pour alimenter un sphincter urinaire artificiel, (iii) une biopile de 10 μl serait suffisante pour alimenter la nouvelle génération de pacemakers sans fil.

- Nous avons résolu le problème de **stérilisation de l'implant**, ce qui nous a permis de passer des tests sur rats à des tests sur lapins et brebis. Les deux derniers modèles animaux, beaucoup plus fragiles que le rat, sont du point de vue de leur sensibilité à une infection, plus proches de l'homme que le rat.

- Nous avons testé l'utilisation de différentes membranes filtrantes *in vitro* et *in vivo* pour améliorer le **design de la biopile** (membrane de silicium poreux, capsule d'acétate de cellulose), la **stabilité des bioélectrodes** et la **biocompatibilité de l'implant** (membranes de chitosane). Nous avons ainsi gagné considérablement en durée de vie du dispositif (implantation de plus de 5 mois d'une cathode).

-Une **analyse cellulaire systématique** nous permet de mieux comprendre le type de réponse inflammatoire générée par les implants. Le protocole ainsi conçu permet de travailler sur la biocompatibilité et l'intégration de ce nouveau type de dispositif médical implantable.

-Enfin, nous sommes maintenant capables d'implanter une biopile avec un **système téléométrique** miniaturisé chez de gros animaux mais aussi récemment chez le rat, ce qui permettra de suivre les variations de potentiel en temps réel et d'apprendre à utiliser notre biopile dans les conditions complexes de fonctionnement d'un organisme vivant.

Une des originalités, mais aussi la principale difficulté de bon fonctionnement de la biopile enzymatique *in vivo*, réside dans son enrobage, qui doit être biocompatible, non biodégradable et doit permettre la diffusion de molécules sur le long terme sans générer d'inflammation chronique, d'encapsulation ni de colmatage de la membrane filtrante.

Le schéma ci-dessous (Figure 5.1), adapté de Wisniewski et Reichert [1] résume les limites de fonctionnement d'une biopile implantée.

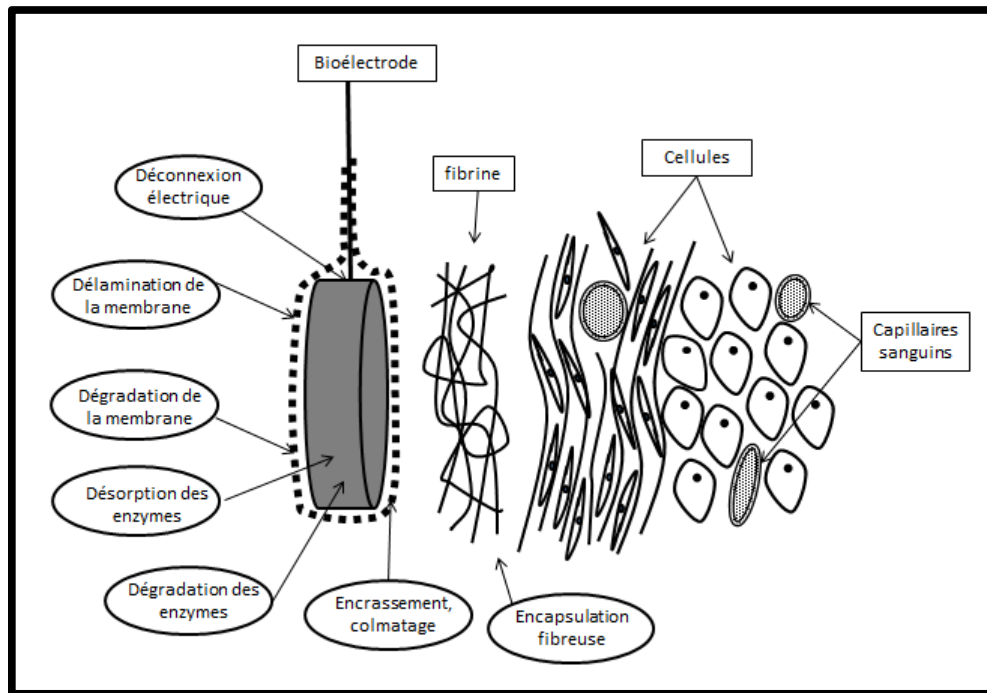


Figure 6.1 : schéma des causes de non fonctionnement de la biopile adapté de [1]

Les futurs développements viseront à augmenter les performances des biopiles en jouant sur les éléments suivants :

- Les systèmes catalytiques peuvent être changés : on peut par exemple utiliser une GOX mutée présentant une constante catalytique 4 fois plus forte [2], [3] ou une laccase mutée résistante aux chlorures et adaptée au pH physiologique [4] ou encore d'autres enzymes évitant la production d' H_2O_2 à l'anode comme la Glucose deshydrogénase [5]. Des systèmes abiotiques sont aussi en cours d'évaluation.

- Une grande surface d'échange pourrait être obtenue en utilisant des matrices 3D nanostructurées poreuses dont la surface spécifique est importante.

- La connexion des enzymes à l'électrode doit être finement étudiée et optimisée, car elle permet d'augmenter les transferts électroniques tout en évitant la désorption des enzymes.

- La connexion électrique de l'électrode et son isolation peuvent être améliorées

- La stabilité du système dans le temps peut être prolongée par un traitement de la biopile pour éviter la désorption des enzymes, leur dégradation, l'encrassement de la membrane et son encapsulation « non poreuse ».

- La diminution du biofouling pourrait être obtenue en jouant sur la rétention d'eau par les molécules de type PEG ou autre polymères. Les travaux effectués par Géraldine Penven sur l'alcool polyvinylique (PVA) vont dans cette voie. Ce matériau a d'ailleurs fait l'objet de recherche pour des prothèses vasculaires en le réticulant avec du trimétaphosphate de sodium [6]. En combinaison avec de la gélatine, le PVA réticulé permet de ralentir les phénomènes d'adhésion plaquettaire et la gélatine incorporée avec un faible pourcentage améliore l'endothélisation de la prothèse [7]. D'autres revêtements sont également possibles du type

MPC (Methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) [8], [9], le carbofilm [10]–[12] ou encore de parylène .

- La diminution de la réaction inflammatoire induite par l'implantation de la biopile. Une des stratégies envisagées pourrait être de diminuer fortement l'apparition de de la fibrine dans les stades précoces du processus inflammatoire à l'aide de drogues [13]–[15]. La pirféridone [16], un immunosuppresseur anti-fibrotique, ou des molécules de la famille du bosentan, inhibiteur de l'endothéline 1 (puissant vaso constricteur également impliqué dans les phénomènes de fibrose) sont des exemples de drogues anti-fibrotiques en phase 2 ou 3 d'essais cliniques. Ils sont utilisés pour le traitement de la fibrose pulmonaire idiopathique. De même, on peut tenter de réguler l'activité et le recrutement des macrophages [13, p. 12], qui ont un rôle central dans l'apparition de la fibrose, en utilisant des stratégies anticorps comme l'anti-CCL2 ou l'injection d'IL10 [17].

- Enfin, on doit pouvoir garantir l'inocuité du système implanté, en particulier lors de l'emploi de médiateurs chimiques non fixés ou d'utilisations de nanoparticules comme les nanotubes de carbone. Il s'agit de démontrer que ces nano-objets ou molécules sont parfaitement confinées à l'intérieur de la membrane semi-perméable.

Nous avons également exploré une autre voie pour contourner le problème d'encapsulation de la biopile enzymatique. Nos résultats sur la création d'une biopile biomimétique sont très encourageants, même si nous sommes encore loin d'un système implanté. Nous avons en effet fabriqué une membrane biomimétique stable pendant plus de 12 jours sur une surface de 0,38 cm² et produit un potentiel électrique à partir d'un gradient de sel grâce à un premier prototype.

Le principe décrit au chapitre 5, qui exploite des vésicules interconnectées, offre une voie très prometteuse pour ce type de pile, que nous explorons actuellement.

Références de la partie conclusion/perspectives

- [1] N. Wisniewski & M. Reichert, « Methods for reducing biosensor membrane biofouling », *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 18, n° 3, p. 197–219, 2000.
- [2] M. R. Sierks, K. Bock, S. Refn, & B. Svensson, « Active site similarities of glucose dehydrogenase, glucose oxidase, and glucoamylase probed by deoxygenated substrates », *Biochemistry*, vol. 31, n° 37, p. 8972–8977, 1992.
- [3] J. T. Holland, J. C. Harper, P. L. Dolan, M. M. Manginell, D. C. Arango, J. A. Rawlings, C. A. Apblett, & S. M. Brozik, « Rational redesign of glucose oxidase for improved catalytic function and stability », *PloS one*, vol. 7, n° 6, p. e37924, 2012.
- [4] D. M. Mate, D. Gonzalez-Perez, M. Falk, R. Kittl, M. Pita, A. L. De Lacey, R. Ludwig, S. Shleev, et M. Alcalde, « Blood tolerant laccase by directed evolution », *Chemistry & biology*, vol. 20, n° 2, p. 223–231, 2013.
- [5] M. Southcott, K. MacVittie, J. Halámek, L. Halámková, W. D. Jemison, R. Lobel, et E. Katz, « A pacemaker powered by an implantable biofuel cell operating under conditions mimicking the human blood circulatory system—battery not included », *Physical chemistry chemical physics*, vol. 15, n° 17, p. 6278–6283, 2013.
- [6] M. Chaouat, C. Le Visage, W. E. Baille, B. Escoubet, F. Chaubet, M. A. Mateescu, et D. Letourneur, « A Novel Cross-linked Poly(vinyl alcohol) (PVA) for Vascular Grafts », *Advanced Functional Materials*, vol. 18, no 19, p. 2855–2861, 2008.
- [7] J. M. Ino, E. Sju, V. Ollivier, E. K. F. Yim, D. Letourneur, et C. Le Visage, « Evaluation of hemocompatibility and endothelialization of hybrid poly(vinyl alcohol) (PVA)/gelatin polymer films: Hemocompatibility And Endothelialization Of Hybrid PVA/Gelatin Polymer Films », *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, vol. 101, no 8, p. 1549–1559, 2013.
- [8] R. S. Teotia, G. J. Dahe, et J. Bellare, « In-situ coating of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymer on polysulfone hollow fiber membranes for hemodialysis », *Advanced Science Letters*, vol. 20, n° 5-6, p. 1191–1197, 2014.
- [9] Q. Zhong, J. Yan, X. Qian, T. Zhang, Z. Zhang, et A. Li, « Atomic layer deposition enhanced grafting of phosphorylcholine on stainless steel for intravascular stents », *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 121, p. 238–247, 2014.
- [10] F. Vallana, E. Pasquino, S. Rinaldi, M. Galloni, A. M. Gatti, F. Modica, et A. Benech, « Carbofilm™: Present and future applications in biomedical devices », *Ceramics international*, vol. 19, n° 3, p. 169–179, 1993.
- [11] P. B. Sick, G. Gelbrich, U. Kalnins, A. Erglis, R. Bonan, W. Aengevaeren, D. Elsner, B. Lauer, M. Woinke, O. Brosteanu, et others, « Comparison of early and late results of a Carbofilm-coated stent versus a pure high-grade stainless steel stent (the Carbostent-Trial) », *The American journal of cardiology*, vol. 93, n° 11, p. 1351–1356, 2004.
- [12] A. P. De Prado, C. P. Martinez, C. C. Ramon, J. Orden, M. Gonzalo, J. R. Altonaga, M. J. G. Iglesias, M. R. Purrinos, M. A. Orden, J. F. G. Marin, et others, « Endothelialization of Nonapposed Stent Struts Located over the Origin of a Side Branch: Results with Different Carbofilm-Coated Stents », *Journal of interventional cardiology*, vol. 22, n° 3, p. 222–227, 2009.
- [13] T. A. Wynn et T. R. Ramalingam, « Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease », *Nature medicine*, vol. 18, n° 7, p. 1028–1040, 2012.
- [14] M. R. Dillingh, B. van den Blink, M. Moerland, M. G. J. van Dongen, M. Levi, A. Kleinjan, M. S. Wijsenbeek, M. L. Lupher, D. M. Harper, J. A. Getsy, et others, « Recombinant human serum amyloid P in healthy volunteers and patients with pulmonary fibrosis », *Pulmonary pharmacology & therapeutics*, vol. 26, n° 6, p. 672–676, 2013.
- [15] L. Helming, E. Tomasello, T. R. Kyriakides, F. O. Martinez, T. Takai, S. Gordon, et E. Vivier, « Essential role of DAP12 signaling in macrophage programming into a fusion-competent state », *Science signaling*, vol. 1, n° 43, p. ra11, 2008.
- [16] *Vidal 2016: le dictionnaire*. Issy-les-Moulineaux: Vidal, 2016.
- [17] D. R. Nelson, G. Y. Lauwers, J. Y. Lau, et G. L. Davis, « Interleukin 10 treatment reduces fibrosis in patients with chronic hepatitis C: a pilot trial of interferon nonresponders », *Gastroenterology*, vol. 118, n° 4, p. 655–660, 2000.

Annexe 1

Dosage du gluconate

Dosage du gluconate dans des échantillons d'urine de porc

Domaine Universitaire, 601 rue de la Chimie, Saint Martin d'Hères
BP 53, 38041 Grenoble cedex 9

Claire Boisset-Helbert
☎ 04.76.03.76.23
claire.boisset-helbert@cermav.cnrs.fr

Laurine Buon
☎ 04.76.03.76.60
laurine.buon@cermav.cnrs.fr

A l'attention de Monsieur Jean-Pierre Alcaraz

Société/Laboratoire : GMCAO/TIMC-IMAG bâtiment Taillefer

Adresse : Domaine de la merci 38710 La Tronche

Dosage du gluconate (acide gluconique) par HPAEC-PAD

Chaque échantillon d'urine de porc a été analysé par chromatographie ionique avec détection par ampérométrie pulsée.

Auparavant, une gamme d'étalonnage de gluconate de sodium a été réalisée pour des concentrations allant de 0.003 à 0.055 g/L .

Mode opératoire

Après décongélation, 1 ml de chaque échantillon d'urine est prélevé puis centrifugé.

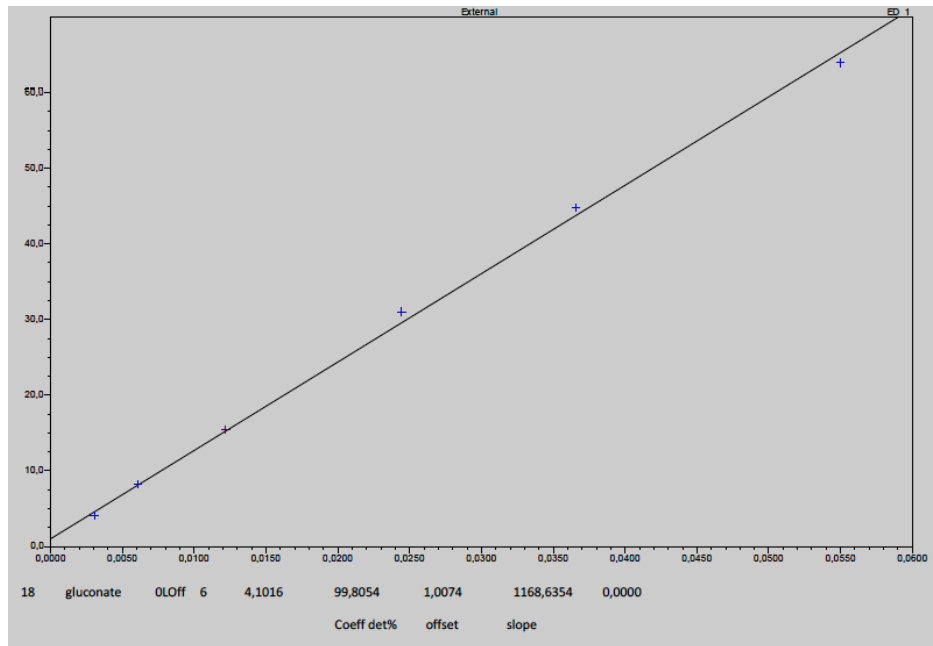
Le surnageant est ensuite dilué 70 fois dans l'eau distillée et filtré sur une membrane de nylon de 0.2µm.

20 µL de chaque échantillon sont injectés en chromatographie ionique sur une colonne CarboPac PA1 avec détection par ampérométrie pulsée.

L'élution s'effectue par un gradient en NaOH (0.1M)/ NaOH(0.1M)-acétate de sodium(0-0.3M) à un débit de 1ml/min.

Résultats

1- Gamme étalonnage Gluconate de sodium obtenue à partir de 6 points (0.00305-0.055 g/L)



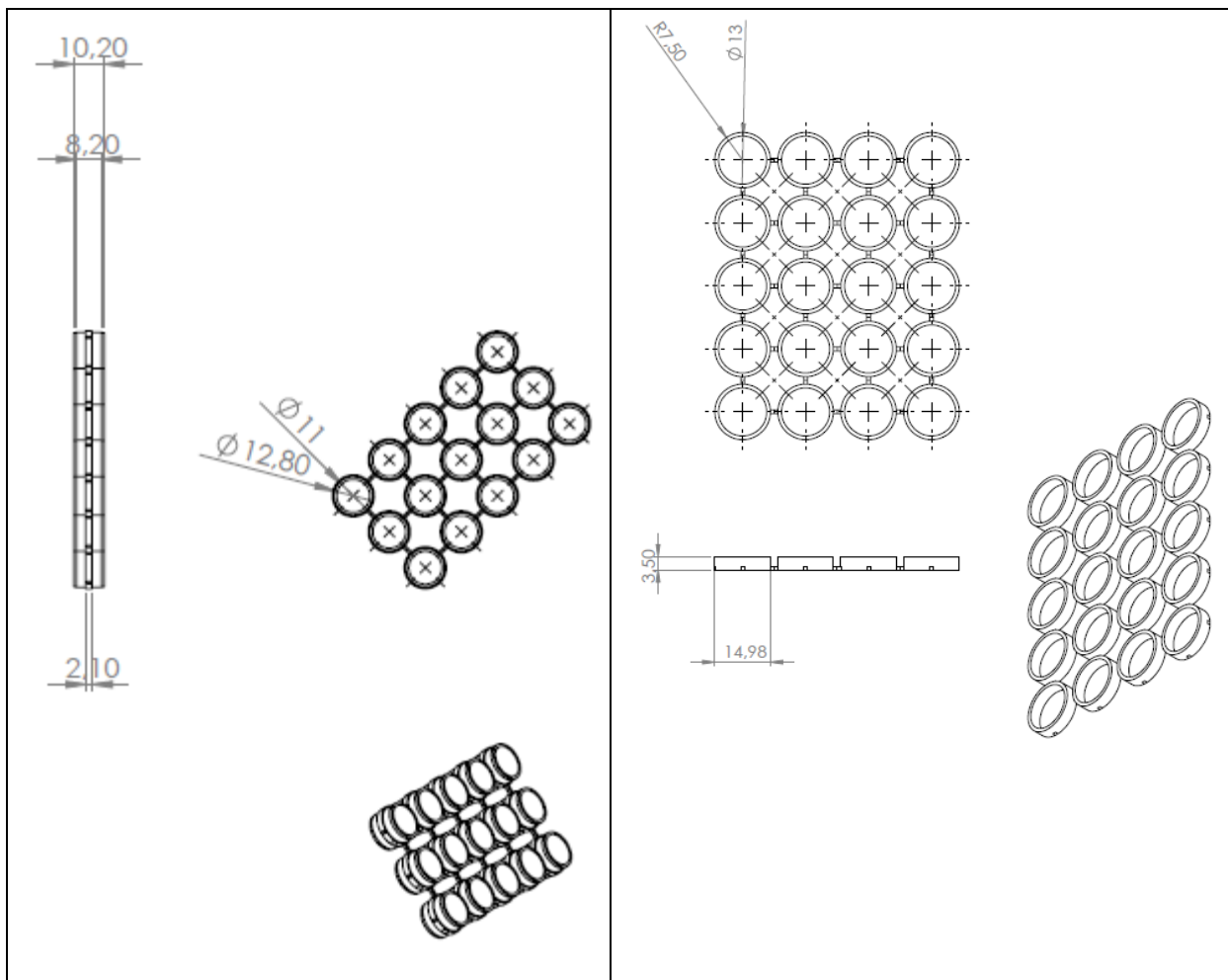
2- Quantification du gluconate dans les échantillons d'urine

Echantillons	Concentration en gluconate (g/L d'urine)
PO17-201113	4,2
PO17-191113	3,227
PO17/24H-281113	0,119
PO17/48H-291113	0,287
PO17-051213	0,091
PO17/24H-051213	0,07
PO17-061213	0,112
PO16/24H-281113	0,147
PO16-48H-291113	0
PO16-301113	0
PO16-061213	0
PO15-191113	0,252
PO15-201113	1,127
PO15/24H-281113	0,063
PO15/48H-291113	0,322
PO15-061213	0,154

Annexe 2

Plans des prototypes

Plans de la capsule polyamide par impression 3D et étapes de fabrication de la capsule implantable :

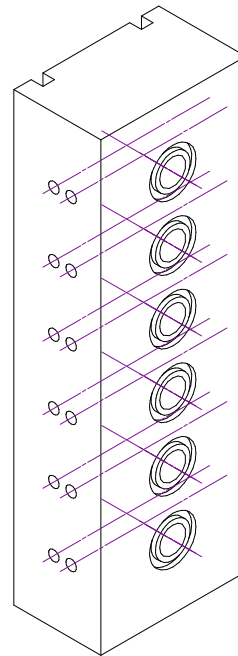
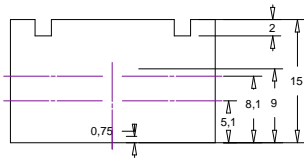
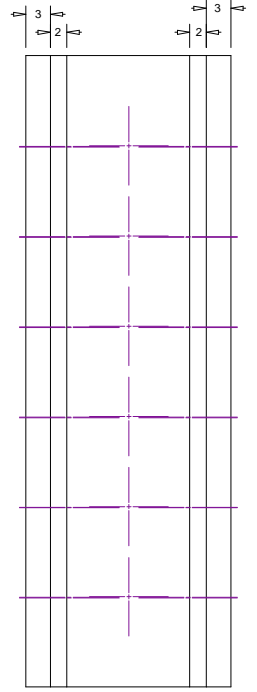
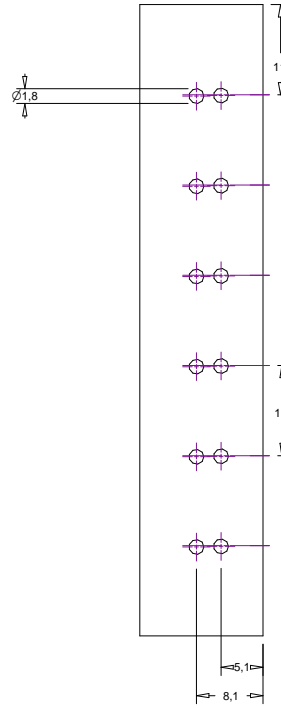
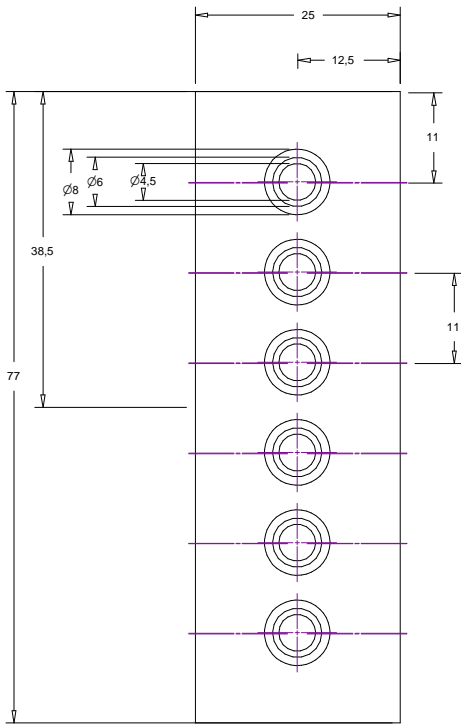


Plans du support de biopile biomimétique :

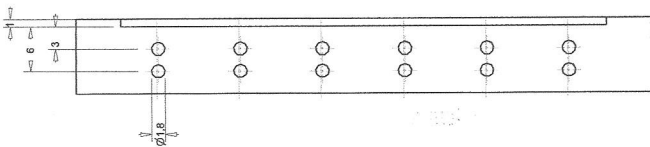
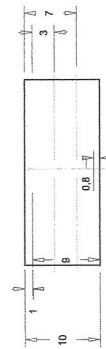
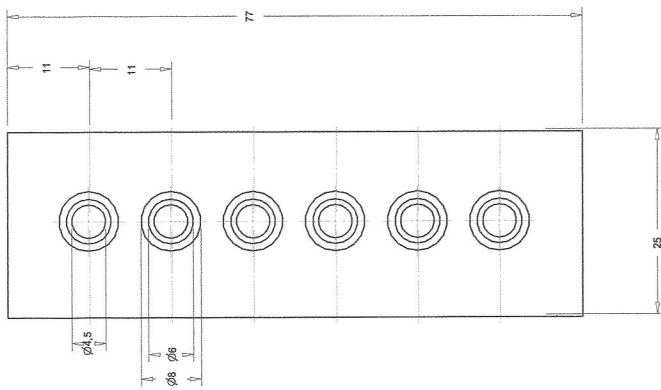
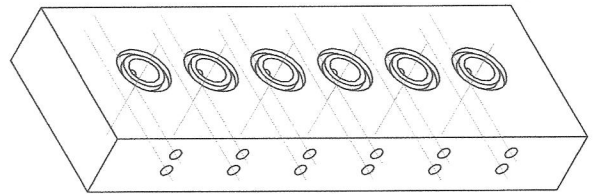
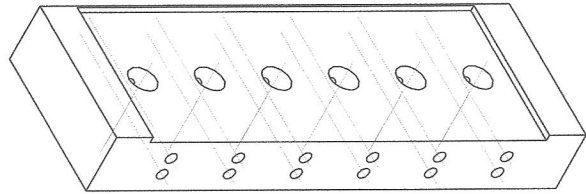
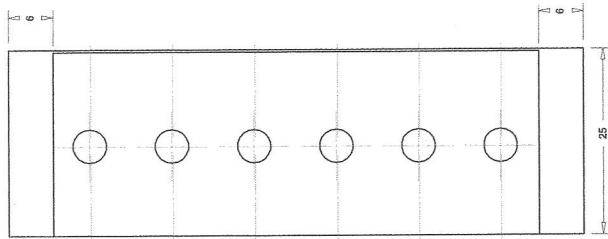
Chambre inférieure : « ½ chambre plexi »

Chambre supérieure : « ½ chambre obsmicro polycarbonate »

1/2 chambre plexi



1/2 chambre obsmicro polycarbonate



Annexe 3

Dosage du complément

1) Solutions stock :

VBSx10 (Véronal 25mM, NaCl 0,7M) pH ajusté à 7,4 avec NaOH

MgCl₂ 0,1M

CaCl₂ 0,1M

DGVB²⁺ (Dextrose 0,1M, Gélatine 0,05%, Véronal 2,5mM, Ca²⁺ 0,15mM, Mg²⁺ 0,5mM)

Les hématies de mouton ont été préparées à partir de sang total (hépariné à 25 UI/ml) récupéré aux abattoirs de Grenoble, lavées 3 fois par centrifugation 10 min à 300 rpm dans du tampon PBS puis resuspendues à 50 % dans du tampon DGVB²⁺.

2) Préparation des hématies

Prendre 1mL d'hématies dans 20mL de DGVB²⁺.

Centrifuger : 10min, 3750rpm

Laver par centrifugation jusqu'à l'obtention d'un surnageant non coloré.

Resuspendre dans 1mL

Doser l'hémoglobine relarguée par la lyse des hématies à 541nm après dilution au 1/15 dans l'eau et ajuster la concentration à 1×10^9 cellules/mL (DO = 0,7)

Pour les tests, diluer les hématies à $3,7 \times 10^6$ cellules/mL (DO environ 0,3)

3) Sensibilisation des hématies

Ajouter 50µL d'hémolysine à 1 mL d'hématie à 1×10^9 cellules/mL et incuber 15 minutes à 37°C. Laver les hématies comme précédemment dans 20 ml de tampon DGVB²⁺ et les reprendre dans 1mL.

4) Test hémolytique

Des carrés de membrane de 1 cm de côté sont mis en incubation pendant des temps de 2h00 à 24h à 37°C dans 150µL de sérum humain.

30µl de sérum incubé avec les membranes sont ajoutés à 1 mL d'hématies sensibilisées. On suit à 660 nm la diminution de turbidité du milieu due à l'éclatement des hématies par l'action du complément.

ANNEXE 4

Travaux publiés

Biocompatible Implantable Biofuel Cell

Sarra El Ichi, Abdelkader Zebda, Jean-Pierre Alcaraz, François Boucher, Jean Boutonnat, Philippe Cinquin and Donald K. Martin

Abstract— The present work demonstrates the *in vivo* biocompatibility and operation of a biofuel cell enclosed by a chitosan membrane. The measured power output in the range of 6.2 to 20.7 $\mu\text{W cm}^{-2}$ (applied current from 10 to 70 μA) indicated that glucose and oxygen can reach the enzymes in the 3D matrix without any need for a buffer solution in the implant or a hydration step. This is very important to simplify the preparation and sterilization steps, to avoid contamination and to favour the close communication between the device and body fluids. This optimized biofuel cell is now being applied to supplying power for a leadless pacemaker.

I. INTRODUCTION

Electrical power can be generated by the combination of an anode where a fuel is oxidized and a cathode where an oxidant is reduced. Unlike traditional fuel cells or batteries, such an enzymatic fuel cell using two electrodes based on enzyme catalysts and operating under mild conditions is suitable to provide power for biological systems. The progress made in biofuel cell technology since their introduction in the 1950s was reported in many reviews [1-3]. Many authors were interested in the fabrication process of the enzyme electrodes, used materials [4,5] and methods of deposition of enzymes [6]. Physical (entrapment, adsorption) and chemical methods (covalent linkage or immobilization in polymer matrix) were described as possible solutions for enzyme immobilization [4]. Different materials can be used to produce a 3D conducting electrode: graphite particles [5], carbon fibers, carbon felt, carbon nanotubes, carbon black, nanostructured carbons and gold nanoparticles [7].

In the case of using glucose as a fuel coupled to the reduction of oxygen as oxidant, the anode is based on glucose oxidase or glucose dehydrogenase where laccase or bilirubin oxidase is used for the cathode. The advantage of such biofuel cell is that medical application can be considered since the device can be implanted and supplied by the endless glucose and oxygen present in the body fluids. The implanted glucose biofuel cell can power small electronic or portable devices such as pacemakers, artificial urinary sphincter, artificial kidney [1] and electronic contact

lenses [8].

The stability of enzymatic biofuel cells remains poor compared to batteries. The commercial applications for enzymatic biofuel cells are thus very limited. The stability can be affected by protein loss or denaturation, loss of electrical connection between enzymes and the conducting material such as carbon nanotubes, gold, etc. In order to enhance this electrical connection, carbon nanotubes were modified with anthracene residues [9], ferrocene, aryl phenyl, naphthyl and terphenyl moieties [10]. The stability of the biofuel cell voltage can reach two weeks *in vitro* if modified carbon nanotubes are used [10].

Reported studies on the performance and stability of biofuel cells are mainly concentrated on *in vitro* studies, with few *in vivo* data are available. The implantation of a biofuel cell was already investigated in living organisms like snails [11] and insects like cockroach [12]. The implantation of a glucose biofuel cell (GBFC) in rats was first achieved by Cinquin and collaborators [13,14]. That implantation of the biofuel cell in the body of a rat allowed the comparison of *in vitro* results with real *in vivo* conditions.

The first implanted GBFC in rats consisted of two compacted disc electrodes. The anode contained ubiquinone, glucose oxidase (GOX) and catalase. GOX and PPO generate respectively ubiquinol and quinone. The cathode was composed of quinhydrone and polyphenol oxidase (PPO). The electricity is generated by the oxidation of ubiquinol and the reduction of quinone. Prior to implantation, the cathode was inserted in a dialysis bag (cut-off 100 g mol^{-1}) while a second bag (cutoff 6-8000 g mol^{-1}). In the extra-cellular fluid (ECF), the GBFC produced 7.52 $\mu\text{W mL}^{-1}$ for several hours [13].

The second implanted GBFC consists of compressed carbon nanotubes with laccase for the cathode and glucose oxidase and catalase for the anode. The biocatalytic current results from the oxidation of glucose and the reduction of dioxygen. A higher power output was obtained by the direct electron transfer between enzymes and electrodes. The experiments performed *in vitro* demonstrated that the GBFC was able to produce 1 mW cm^{-2} power density under physiological conditions (5×10^{-3} mol L^{-1} glucose, pH 7) [12]. The GBFC was inserted in a dialysis bag (cutoff 6-8000 g mol^{-1}). The device was able to power, for several seconds, a common medical digital thermometer (power consumption: 50 mA at 1.5 V) and another to light a LED

Research supported by ANR and Investissements d'Avenir.

S. El Ichi, A. Zebda, J.-P. Alcaraz, F. Boucher, Philippe Cinquin and D.K. Martin are with the UJF-Grenoble 1/ CNRS/ TIMC-IMAG UMR 5525, Grenoble, F-38041, France (phone: +33-456-520-095; e-mail: Don.Martin@Imag.fr).

J. Boutonnat is with Laboratory of Cytology, Biochemistry and Cytopathology, Centre Hospitalo-Universitaire Albert Michallon, B.P. 217X Cédex 9, 38043 La Tronche Cedex, France (e-mail: JBoutonnat@chu-grenoble.fr).

(4.1 mA at 2.9 V) [14].

The implantation of GBFCs highlighted several problems. In the two previous studies, dialysis bags composed of cellulose acetate were used to confine the GBFC in order to minimize the diffusion of its components into the body as well as minimizing inflammatory reactions. Nevertheless, the use of a dialysis bag complicates the sterilization procedure and increase the total volume of the implant.

Although the simultaneous compression of enzymes and conducting materials, as described previously [2], provides an efficient bioelectrode, the operational stability doesn't exceed several days and only for a maximum of one month [14]. The lack of stability of the laccase-based biocathode affects the operation of the GBFC. In order to enhance the stability of laccase-based biocathode, a new procedure based on conducting polymer and enzyme compression was described in a previous work [15]. In order to solve this problem, we have improved the construction of the bioelectrode by using conducting chitosan nanofibrous 3D network instead of carbon nanotubes. The biocathode constructed in that way was able to deliver a continuous current density around -0.19 mA mL^{-1} during two months at 0.2 V under conditions close to the physiological environment. In order to evaluate the *in vivo* stability and biocompatibility of the biocathode a chitosan film (thickness around 11 μm , pore diameter 5-6 nm) was synthesized. The film was stable more than five months *in vivo*. The present study reports the use of the chitosan film as a GBFC coating.

II. METHODS AND MATERIALS

The anode and the cathode are prepared separately before being combined and coated. The biofuel cell sterilization is important since it minimizes contamination risks after implantation.

A. Enzymes and Chemicals

Laccase from *Trametes versicolor* (12.9 U mg^{-1}), catalase from bovine liver ($2.000\text{-}5.000 \text{ U mg}^{-1}$), highly viscous chitosan from crab shells, genipin, caffeic acid (purity, $\geq 95 \%$), 1,4-naphthoquinone (purity, $\geq 96.5 \%$), D-glucose and ethanol were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Glucose oxidase from *Aspergillus niger* (specific activity (25°C) $> 100 \text{ U mg}^{-1}$) was purchased from Euromedex (Mundolsheim, France). Phosphate buffer solution (0.01 mole L^{-1} , NaCl (0.14 mole L^{-1}), KCl ($0.0027 \text{ mole L}^{-1}$), pH 7.4) was prepared and stored at 4°C . Silicone (AS310) was purchased from SILICOMET. All aqueous solutions were prepared using ultrapure water from Millipore system. Multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) were purchased from Nanocyl ($> 95 \%$ purity, 9.5 nm diameter). The Dacron mesh was purchased from HARVARD APPARATUS (Les Ulis, France). The Wistar Han IGS male rats were purchased from Charles River.

B. Bioelectrodes Preparation

- The cathode consists of a mixture of laccase from *Trametes versicolor* (20 mg), MWCNTs (20 mg) and viscous chitosan-genipin (40 μL).
- The anode consists of a mixture of glucose oxidase from *Aspergillus niger* (10 mg), catalase (10 mg), MWCNTs (50 mg), 1,4-naphthoquinone (5 mg), and H_2O (100 μL). The anode was immersed in solutions of 5 mM glucose in 10 mM PBS pH 7.4 in order to remove excess of 1,4-naphthoquinone. The anode was dried at room temperature before the coating step described below.
- For the preparation of each electrode, the mixture was compacted using a manual press. An electrical wire was embedded in carbon paste covering one side of each disk (surface: 0.5 cm^2 , thickness: 1 mm). The perimeter and the covered side of the disc were isolated with silicone. The electrodes were dried at ambient temperature and then stored at 4°C until use.

C. Biofuel Cell Coating and Sterilization

When electrodes are ready and prior to implantation, the preparation of the biofuel cell follows the steps below:

- Nanoporous chitosan films were used as electrodes coatings. Viscous chitosan (1 % (m/v) solubilized in 0.5 % (v/v) acetic acid at 50°C) was obtained after 2 hours stirring at ambient temperature. A genipin solution (6 mg mL^{-1}) was prepared by solubilizing the genipin powder in 12 % (v/v) DMSO, 88 % (v/v) H_2O . A volume of this solution was added to obtain a final concentration of genipin of 0.0045 % (m/v) in 1 % (m/v) chitosan. The mixture was stirred during 30 min. The same procedure was used to prepare the films for the anode coating but caffeic acid is added to the preparation. Caffeic acid powder was dispersed in ethanol to prepare a 4 % solution. A volume was added to the mixture described above to obtain a final concentration of 0.0032 % (m/v).
- A volume of about 3 g of viscous chitosan was deposited on a non-adhesive circular surface (28 cm^2). For this, a ROTH-disposable weighing tray (PS natural coloured L $89 \times \text{W } 89 \times \text{H } 25 \text{ mm}$) was used. The film casting was followed by a drying step at ambient temperature for a minimum of 72 hours until obtaining a dry plastic film.
- The chitosan films were fixed on the electrodes surface using silicone.
- The anode and the cathode were inserted together in a Dacron lattice. The BFC was sterilized using gamma radiation at a dose of 12 kGy. The irradiator uses sources of ^{60}Co (ARC-nucleart CEA grenoble).

D. Implantation in Rats

Two rats were used for the implantation of the Dacron lattice and the chitosan films. The synthesized chitosan films

for the anode and the cathode films were cut in four rectangular samples (1 cm x 0.6 cm). Each two different films were inserted in a Dacron lattice and sterilized using gamma radiation at a dose of 12 kGy (Fig. 1A). The rat was anesthetized with isofluran, a median laparotomy was performed. Two Dacron lattices (total of four film samples) were implanted in the retroperitoneal space in right and left position. The chitosan films were implanted for a period of 100 days (Fig. 1B). In the second rat, two sterile Dacron lattices without chitosan films were implanted for a period of two weeks as a control to assess the short time inflammatory reaction due to the Dacron.

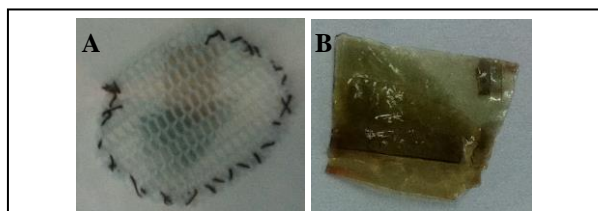


Figure 1. Photos of (A) Chitosan films in Dacron lattice, (B) Chitosan films after 100 days *in vivo*.

Three rats were used for the implantation of the GBFC. The rat was anesthetized with isofluran, a median laparotomy was performed, and the GBFC (Fig. 2A) was inserted into the retroperitoneal space in left lateral position (Fig. 2B). The wires surrounded with a PE catheter were partially tunelled under the animal's skin. The muscular abdominal wall and the skin were separately sutured and the animal was allowed to recover from anesthesia. The weight of the rats was measured periodically.

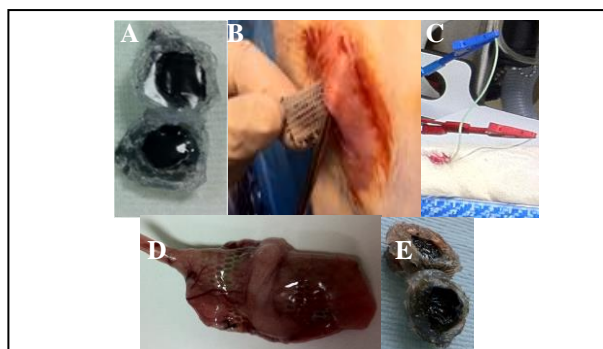


Figure 2. Photos of (A) GBFC, (B) Implant, (C) Connexion of subcutaneous wires, (D) implant and (E) GBFC after 2 weeks *in vivo*.

D. Electrochemical Measurements

After two weeks, the rats were placed under gas anesthesia (isoflurane 2.5%) on a 37°C electric blanket, the skin was incised, and the subcutaneous wires were taken out and stripped for the electrical measurements (Fig. 2C). All electrochemical measurements were performed using an electrochemical potentiostat (Biologic, 300).

After the measurements, the rats were then autopsied and the GBFC recovered and deeped in a 4 % formadehyde solution for fixation (Fig. 2D and 2E).

E. Histological Characterization

The samples were fixed for 24 h in 4% formaldehyde solution immediately after their extraction from the rat body. The processing of cassettes containing those tissue samples was performed automatically in a Semi-Enclosed Benchtop Tissue Processor Leica TP1020 by programming a 16 h sequence where the samples were immersed consecutively in formol (4%), alcohol 70°, alcohol 80°, alcohol 95°, alcohol 100°, xylene, and paraffin. The embedding in paraffin was carried out using a Heated Paraffin Embedding Module Leica EG1150 H. The sectioning into 4 µm slices was carried out using a Semi-Automated Rotary Microtome Leica RM2245. The slices were then rehydrated and stained with a routine trichromic HES (Hematoxilin-Eosin-Safran) histological stain where Hematoxilin stains the nuclei in purple, eosin stains cytoplasm in pink and collagen fibers are colored in orange by Safran. The glass slides were then mounted with Eukitt® after dehydration. The histological images were recorded using a Zeiss microscope (SAMBATM 2050). Microscopic observation was done under the microscope at different magnifications (X10, X20 and X40).

III. RESULTS

We report the results from our study that focus on two main aspects of the biofuel cell that are crucial for its successful implantation; the power output measured *in vivo* and the biocompatibility.

A. In vivo Power Output

After two weeks, the *in vivo* power output was in the range of 6.2 to 20.7 µW cm⁻² (applied current from 10 to 70 µA) (Fig. 2). The measured open circuit potential (OCP) was around 0.32 V.

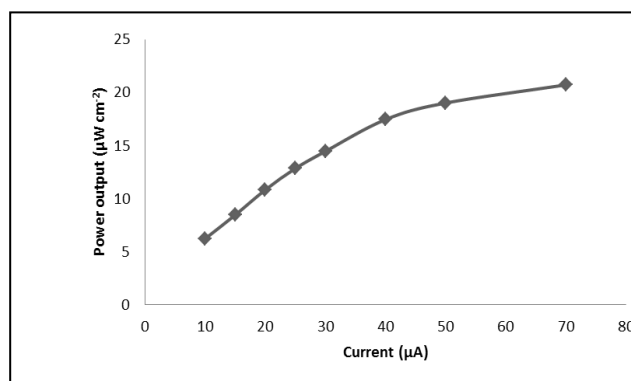


Figure 3. Variation of the power output as function of applied current.

The measurement of the power output demonstrates that the catalytic activity of enzymes was maintained *in vivo* which means that substrates (oxygen, glucose) diffused through the chitosan membrane and reached the laccase and glucose oxidase entrapped in the 3D matrix of respectively, the cathode and the anode. The glucose concentration is 5

mM in the Extra-Cellular Fluid (ECF) which is sufficient for the GBFC operation. The oxygen present in the ECF is replenished by the surrounding blood vessels where the concentration is about 45 μM . The implanted GBFC can supply power (10.35 μW at round 0.15V) to a cardiac pacemaker which needs 10 μW [16]. In a previous work, a quinone-ubiquinone GBFC implanted in rat produced a maximum specific power of 24.4 $\mu\text{W mL}^{-1}$. The measured OCP was 0.275 V [12]. The volume of our GBFC is three times smaller than the previous one but the implanted device was able to supply eight times higher power output (207 $\mu\text{W mL}^{-1}$).

B. Biocompatibility Assessment

In order to assess the biocompatibility of the implanted chitosan films and the biofuel cell that was contained within the chitosan membrane, histological analysis was performed. The biocompatibility of the synthesized chitosan films was assessed after 100 days *in vivo*. The films weren't degraded after this period. The surrounding tissues were collected. As shown in Fig. 4B, no inflammatory reaction was observed on different types of tissues adhering to the implant (fat, muscles or digestive organs). However, after two weeks, the Dacron lattice used as a control showed a minimal granulomatous reaction characterized by the presence of lymphocytes and polynuclei cells (Fig. 4A). This is the body response to a foreign body in the tissues. The absence of this reaction after a period more than three months (Fig. 4B) suggests that this reaction dissipate over time.

Fig. 4C and 4D are slices from two different rats. Although the Dacron lattice was in contact with the GBFC, no inflammatory response was observed. Mesenchymal tissues developed and interpenetrated the mesh if the lattice. The blood vessels present in the growing tissues allowed the vascularization around the biofuel cell. This is very important for substrates supply and thus the operation of the GBFC. Nevertheless, some local tissue reaction showed fibroblasts and lymphocytes which are characteristic of abcess formation (Fig. 4E). The presence of components like silicone and catheters in the GBFC contributes to this reaction. This reaction is often observed in the first two weeks of implantation which corresponds to the initiation, resolution and organization of the acute and inflammatory responses. In the case of biocompatible materials, this reaction is minimized and dissipates over time [17]. In the case of chitosan scaffolds implanted in a mammalian model, an early migration of neutrophils into the implantation area was reported. This reaction disappeared with increasing implantation time [18]. Abcess formation has not been observed when chitosan crosslinked with genipin was implanted *in vivo* [19,20]. Results suggest that the use of chitosan formed a biocompatible material interface of our GBFC. In a parallel study, we implanted electrodes coated with chitosan membranes for different period of times (2 weeks, 3 months and 6 months) to study the evolution of inflammatory response over time (paper in preparation). The chitosan membrane moderated the abcess formation which was completely absent after a period of a three months.

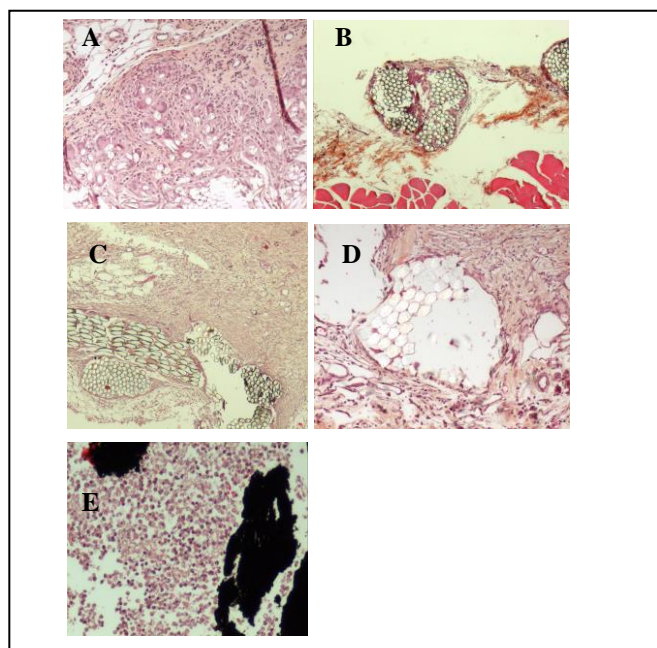


Figure 4. Histological analysis of (A) Dacron lattice (control) after two weeks *in vivo*, (B) Chitosan films in Dacron lattice after 100 days *in vivo*, (C), (D) and (E) the implanted GBFC after two weeks *in vivo*.

The present study will be investigated for an extended periods of time and on other animal models.

IV. CONCLUSION

The implantation of our glucose fuel cell in rats demonstrated that the implanted device is able to produce sufficient power to supply energy to a cardiac pacemaker. Chitosan formed a biocompatible interface between the GBFC and the surrounding body tissues. This preliminary study is the first to demonstrate the positive benefits of chitosan on the biocompatibility of an implantable biofuel cell.

ACKNOWLEDGMENT

Authors thank the ANR (MGBFC-EMMA-043, 2011-2013) and the Investissements d'Avenir (ANR-10-NANO-03-01, 2012-2016) for financial support. We thank Laurent Cortella (CEA, Grenoble) for assistance with the gamma sterilization experiments.

REFERENCES

- [1] R.A. Bullen, T.C. Arnot, J.B. Lakeman, and F.C. Walsh, "Biofuel cells and their development," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 21, pp. 2015–2045, January 2006.
- [2] I. Ivanov, T. Vidaković-Koch, and K. Sundmacher, "Recent Advances in Enzymatic Fuel Cells: Experiments and Modeling," *Energies*, vol. 3, pp. 803–846, April 2010.
- [3] D. Leech, P. Kavanagh and W. Schuhmann, "Enzymatic fuel cells: Recent progress," *Electrochim. Acta*, vol. 84, pp. 223–234, 2012.
- [4] S.D. Minteer, B.Y. Liaw, and M.J. Cooney, "Enzyme-based biofuel cells," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 18, pp. 1–7, March 2007.
- [5] E.H. Yu and K. Scott, "Enzymatic Biofuel Cells—Fabrication of Enzyme Electrodes," *Energies*, vol. 3, pp. 23–42, January 2010.

- [6] M. Ammam, "Electrochemical and electrophoretic deposition of enzymes: Principles, differences and application in miniaturized biosensor and biofuel cell electrodes", *Biosens. Bioelectron.*, vol. 58, pp. 121–131, February 2014.
- [7] A. Zebda, C. Gondran, P. Cinquin and S. Cosnier, "Glucose biofuel cell construction based on enzyme, graphite particle and redox mediator compression," *Sens. Actuat. B*, vol. 173, pp. 760–764, July 2012.
- [8] M. Falk, V. Andoralov, Z. Blum, J. Sotres, D.B. Suyatin, T. Ruzgas, T. Arnebrant, and S. Shleev, "Biofuel cell as a power source for electronic contact lenses," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 37, pp. 38–45, May 2012.
- [9] M.T. Meredith, M. Minson, D. Hickey, K. Artyushkova, D.T. Glatzhofer, and S.D. Minter, "Anthracene-modified multi-walled carbon nanotubes as direct electron transfer scaffolds for enzymatic oxygen reduction," *ACS Catal.*, vol. 1, pp.1683–1690, October 2011.
- [10] K. Stolarczyk, D. Lyp, K. Zelechowska, J.F. Biernat, J. Rogalski, and R. Bilewicz, "Arylated carbon nanotubes for biobatteries and biofuel cells," *Electrochim. Acta*, vol. 79, pp. 74–81, July 2012.
- [11] L. Halámková, J. Halánek, V. Bocharova, A. Szczupak, L. Alfonta, and E. Katz, "Implanted biofuel cell operating in a living snail," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, Issue 11, pp. 5040–5043, March 2012.
- [12] M. Rasmussen, R.E. Ritzmann, I. Lee, A.J. Pollack, and D. Scherson, "An implantable biofuel cell for a live insect," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, Issue 3, pp. 1458–1460, January 2012.
- [13] P. Cinquin, C. Gondran, F. Giroud, S. Mazabrard, A. Pellissier, F. Boucher, J.-P. Alcaraz, K. Gorgy, F. Lenouvel, S. Mathé, P. Porcu, S. Cosnier, "A Glucose Biofuel Cell Implanted in Rats," *PloS ONE*, vol. 5, pp. e10476, May 2010.
- [14] A. Zebda, S. Cosnier, J.-P. Alcaraz, M. Holzinger, A. Le Goff, C. Gondran, F. Boucher, F. Giroud, K. Gorgy, H. Lamraoui, and P. Cinquin, "Single Glucose Biofuel Cells Implanted in Rats Power Electronic Devices," *Sci. Reports*, vol. 3, pp. 1516, March 2013.
- [15] S. El Ichi, A. Zebda, A. Laaroussi, N. Reverdy-Bruas, D. Chaussy, M.N. Belgacem, P. Cinquin, and D.K. Martin, "Chitosan improves stability of carbon nanotube biocathodes for implantable biofuel cells," *Chem. Comm.*, under revisions.
- [16] A.G. Rapsang, and P. Bhattacharyya, "Pacemakers and implantable cardioverter defibrillators – general and anesthetic considerations," *Rev Bras Anesthesiol*, vol. 64, pp. 205–214, October 2013.
- [17] Isabel Cristina Celerino de Moraes Porto (2012). *Polymer Biocompatibility, Polymerization*, Dr. Ailton De Souza Gomes (Ed.), ISBN: 978-953-51-0745-3, InTech, DOI: 10.5772/47786.
- [18] P.J. VandeVord, H.W.T. Matthew, S.P. DeSilva, L. Mayton, B. Wu, and P.H. Wooley, "Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice," *J. Biomed. Mater. Res.*, Vol. 59, No. 3, pp. 585–590, March 2002.
- [19] R.A.A. Muzzarelli, "Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids," *Carbohydr. Polym.*, vol. 77, pp. 1–9, May 2009.
- [20] J. Kawadkar, and M.K. Chauhan, "Intra-articular delivery of genipin cross-linked chitosan microspheres of flurbiprofen: Preparation, characterization, in vitro and in vivo studies," *European J. Pharma. Biopharma.*, vol. 81, pp. 563–572, August 2012.

► Une biopile enzymatique implantable est un dispositif produisant du courant uniquement à partir du glucose et de l'oxygène naturellement et constamment présents dans l'organisme. Les enzymes présentes aux électrodes oxydent le glucose et réduisent l'oxygène, ce qui génère un flux d'électrons dans un circuit électrique associé. Cette microcentrale électrique, qui peut fournir une tension de presque un volt, pourra alimenter sur une longue période la future génération de robots implantables. Tout dispositif médical implantable doit être stérilisé avant son implantation. Comme le principe actif de cette biopile est composé d'enzymes, la question de la stérilisation de ce nouveau type de dispositif s'est posée. ◀

Qu'est-ce qu'une biopile implantable ?

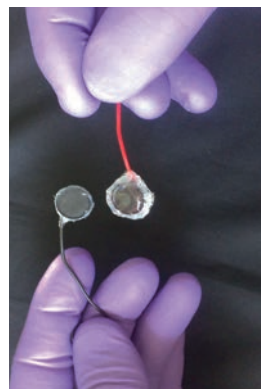
La biopile enzymatique implantable que nous développons permet de générer de l'énergie électrique grâce à des enzymes immobilisées sur des électrodes, à partir de glucose et d'oxygène, substrats présents dans l'organisme et potentiellement inépuisables. Tant que les enzymes fonctionnent, et que les substrats diffusent librement, il est possible de fournir du courant de façon quasi illimitée à des dispositifs médicaux électroniques pouvant suppléer des fonctions défaillantes chez l'homme. Le principe de fonctionnement est illustré par la *Figure 1*. Le glucose est oxydé à la bioanode par la glucose oxydase qui fournit des électrons au circuit. Après passage dans le circuit électrique, ces électrons sont récupérés au niveau de la biocathode. À ce niveau, la laccase¹ sert à réduire le dioxygène en eau. Ces bioélectrodes ont la forme d'une pastille contenant les enzymes immobilisées dans un réseau tridimensionnel de matériau nanostructuré. La preuve de concept *in vivo* a été réalisée par Cinquin *et al.* en 2010 [1]. Cette biopile fournit actuellement suffisamment d'énergie (40 µW) pour alimenter des dispositifs tels qu'un

¹ Oxydase avec du cuivre comme cofacteur.

La biopile enzymatique à glucose/oxygène

Quelques nuances de Grays...

Jean-Pierre Alcaraz¹, Sarra El Ichi-Ribault¹, Laurent Cortella², Catherine Guimier-Pingault³, Abdelkader Zebda¹, Philippe Cinquin¹, Donald K. Martin¹



¹Université Grenoble Alpes/CNRS/ Inserm/TIMC-IMAG UMR 5525, 38041 Grenoble, France ;

²ARC-Nucléart CEA-Grenoble, 17, rue des Martyrs, F38054 Grenoble Cedex 9, France ;

³Stérilisation centrale, CHU de Grenoble, 38700 La Tronche, France.

jean-pierre.alcaraz@imag.fr

pacemaker [2]. Notre équipe a récemment implanté chez le rat une bioélectrode modifiée qui a conservé son activité après une durée de 167 jours [3].

Utilisation de l'ionisation pour la stérilisation du dispositif

L'implantation d'un dispositif médical électronique alimenté par une biopile pose le problème de sa stérilisation. Pour les applications contenant du matériel biologique, ce qui est le cas de la biopile enzymatique, l'autoclavage est proscrit car les enzymes sont dénaturées par la chaleur. Deux types de stérilisation à froid restent alors possibles : l'une utilisant le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) sous vide d'air, l'autre les radiations ionisantes.

La stérilisation au H₂O₂ est un procédé couramment utilisé dans les hôpitaux pour les dispositifs médicaux implantables. Malheureusement, la structure des bioélectrodes est fortement dégradée sous l'effet du vide partiel. De plus, les enzymes sont presque totalement inactivées par la dose d'agent oxydant. Nous nous sommes donc intéressés à la stérilisation *via* les rayonnements ionisants (RI).

L'action des RI sur la cellule a été théorisée il y a un siècle grâce aux travaux de Marie Curie [4] et s'utilise couramment lors des traitements en radiothérapie. La réponse cellulaire aux RI permet d'appréhender les mécanismes de radiosensibilité [5] (→) et d'optimiser les traitements (radiothérapie FLASH [6]) (→).

(→) Voir la Synthèse de N. Foray *et al.*, *m/s* n° 4, avril 2013, page 397

(→) Voir la Nouvelle de V. Favaudon *et al.*, *m/s* n° 2, février 2015, page 121

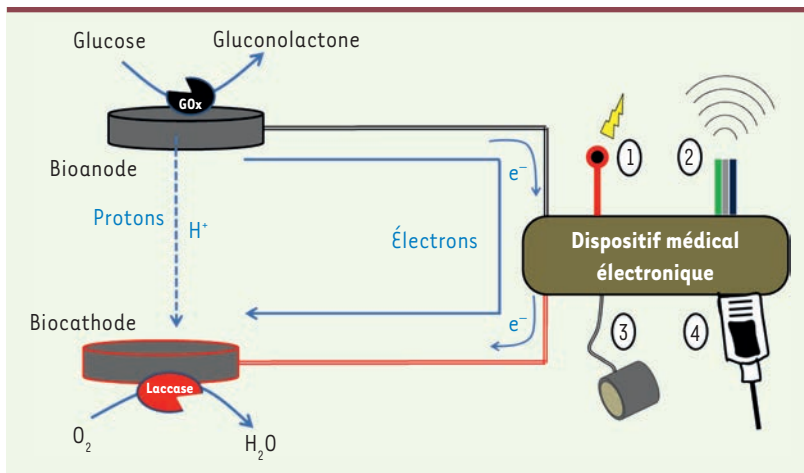


Figure 1. Principe de fonctionnement d'une biopile alimentant un dispositif médical électronique. Le dispositif est relié à des électrodes miniaturisées d'excitation (1), des biocapteurs physiologiques (2), des dispositifs gourmands en énergie comme un sphincter urinaire artificiel (3) ou un distributeur de drogues (4). GOx : glucose oxydase.

L'unité internationale de mesure de dose absorbée est le Gray (1Gy = 1J/kg). Alors que la dose moyenne lors d'une séance de radiothérapie est de 2Gy, la dose appliquée pour la stérilisation de dispositifs médicaux est 10 000 fois plus élevée, car les micro-organismes sont beaucoup plus résistants aux radiations ionisantes que nos cellules. Les photons de haute énergie interagissent avec la matière en ionisant les noyaux des atomes qu'ils rencontrent et en éjectant un électron. Les radicaux formés sont très réactifs et permettent de casser les liaisons chimiques ou d'en former de nouvelles. Les rayonnements ionisants sont couramment utilisés pour la stérilisation de dispositifs médicaux selon les normes ISO 11137 et EN 552 [7, 8].

La stérilisation de la biopile implantable a pour objectif de garantir un niveau d'assurance de stérilité de 10^{-6} (absence d'1 million de germe dans l'implant). À forte dose, c'est l'effet cumulé des RI sur les constituants cellulaires, en particulier les lipides membranaires, qui sont à l'origine de l'effet létal recherché sur les microorganismes. La radiolyse de l'eau, qui génère un grand nombre d'espèces réactives de l'oxygène, amplifie ce phénomène. Ces effets indirects sont loin d'être négligeables : la nature et l'état d'hydratation des échantillons peuvent mener à des résultats totalement différents. Les principales modifications observées sur les protéines concernent leurs structures tertiaire et quaternaire, les liaisons étant déstabilisées, voire rompues. Les conséquences sont dévastatrices pour l'activité des enzymes en solution.

La dose de 25 à 50 kGy utilisée en routine peut être diminuée si l'on peut toutefois garantir la stérilité du dispositif, en se basant sur la biomasse initiale et sa radiosensibilité. Dans notre application, un compromis est à trouver entre les différents paramètres influant la radiosensibilité des microorganismes (nature et quantité de la biomasse, hydratation, humidité, température, présence d'oxygène, etc.) et la sensibilité des composants de la biopile que les RI à forte dose pourraient altérer.

Les effets des RI sont plus rapidement visibles sur les enzymes en solution (Figure 2). À la dose faible de 6 kGy, la laccase en solution perd déjà la moitié de son activité. Par contre, lorsque la laccase est immobilisée dans une électrode, elle est beaucoup plus résistante. La délivrance d'une dose de 12 ou 42 kGy aux électrodes permet en effet de conserver une activité résiduelle de 70 %. Ces résultats valident donc notre choix de cette méthode pour la stérilisation. D'après la littérature, les doses de RI utilisées ont peu d'impact sur la structure des autres composants de l'électrode : le silicone est inerte [7], le chitosan² peu réactif [9] et les nanotubes de carbone ont même une action anti-radicalaire [10]. En revanche, l'effet des RI est important lorsque l'électrode est stérilisée en milieu aqueux : après une ionisation à une dose de 42 kGy, la perte d'activité est alors de presque 80 %. Il est donc primordial de tenir compte de la radiolyse de l'eau et d'éviter la présence d'eau au sein des électrodes au cours de l'ionisation.

Une dose minimale de RI pour garantir une biopile implantable stérile

Afin de tester l'efficacité de la stérilisation des bioélectrodes, nous avons utilisé des spores de *Geobacillus stearothermophilus* (bactérie à Gram positif). Les spores de bactéries contiennent moins d'eau (10-15 %) que les formes végétatives des bactéries (80 %), et sont donc plus résistantes aux radiations ionisantes. Nous avons utilisé ces spores pour évaluer la relation dose-effet des RI. La D_{10} (c'est-à-dire la dose nécessaire pour réduire la quantité d'un microorganisme d'un facteur 10) a été évaluée à 2,4 kGy. Une dose de 10 fois la D_{10} est préconisée pour stériliser un implant contaminé avec des spores bactériennes, soit 25 kGy. Une dose de 12 kGy est cependant suffisante pour à la fois éviter la dégradation de certains composants de l'électrode et garantir la stérilité de l'implant. Cette dose a été choisie pour stériliser des bioélectrodes implantées dans la cavité intra-abdominale de trois modèles animaux (rat, lapin, brebis). Les études de biocompatibilité des bioélectrodes réalisées [3] ou en cours de publication chez ces trois espèces montrent l'absence d'infection des implants.

² Polymère linéaire de glucosamine obtenu à partir de la désacétylation de la chitine.

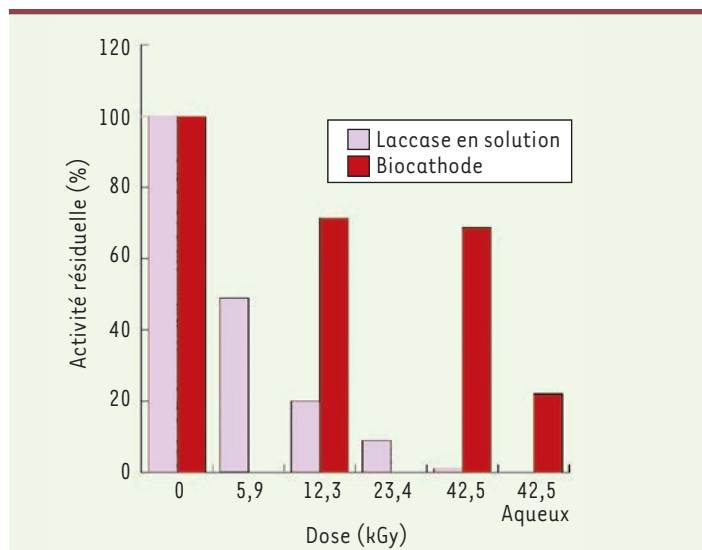


Figure 2. Activité résiduelle de la laccase en solution ou immobilisée dans la biocathode en fonction de la dose de rayonnements ionisants.

Conclusion

Cette étude fait sauter un verrou important pour l'implantation de ce dispositif complexe. Une stérilisation à forte dose de radiation permet non seulement de stériliser efficacement la biopile mais également de conserver une activité biologique suffisante pour continuer son développement. Nous utilisons à l'heure actuelle une capsule électronique pour collecter les données de la biopile. Les rayonnements ionisants étant incompatibles avec les dispositifs électroniques, notamment les semi-conducteurs par passage d'électrons dans la bande de conduction, les deux parties du dispositif sont stérilisées séparément : la partie électronique par une stérilisation à basse température avec H_2O_2 et la partie biopile par une ionisation au rayonnement gamma. Les deux parties stérilisées sont ensuite connectées dans un environnement stérile par des fils isolés.

Cette méthode de stérilisation représente une étape importante dans l'optimisation de l'implantation de dispositifs médicaux de nouvelle génération. Le suivi du dispositif *in vivo* est en cours... affaire à suivre ! ♦

SUMMARY

Shades of grays for implanting an enzymatic biofuel cell

An implanted biofuel cell (IBFC) is a novel device that provides the means to create electricity from glucose and oxygen, using an original

architecture for the IBFC that provides efficient work inside a living organism. In the future these IBFCs will be required to power implanted devices to assist failing physiological functions in humans. The active ingredients of such IBFCs are glucose oxidase at the anode and laccase at the cathode. These enzymes are entrapped in a 3D network of conductive and insulated materials. This publication solves the issue of the sterilization of such a complex device, using gamma irradiation. A 12kGy dose was sufficient to show absence of implant infection in all the implantations performed. We also prove *in vitro* functioning of both bioelectrodes with a high dose of 42kGy.

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Cinquin P, Gondran C, Giroud F, *et al.* A glucose biofuel cell implanted in rats. *PLoS One* 2010 ; 5 : e10476.
2. Zebda A, Cosnier S, Alcaraz JP, *et al.* Single glucose biofuel cells implanted in rats power electronic devices. *Sci Rep* 2013 ; 3 : 1516.
3. El Ichi S, Zebda A, Alcaraz JP, *et al.* Bioelectrodes modified with chitosan for long-term energy supply from the body *Energy Environ Sci* 2015 ; 8 : 1017-26.
4. Gluszewski W, Zagórski ZP, Tran QK, Cortella L, Maria Skłodowska Curie: the precursor of radiation sterilization methods. *Anal Bioanal Chem* 2011 ; 400 : 1577-82.
5. Foray N, Colin C, Bourguignon M. Radiosensibilité : l'évidence d'un facteur individuel. *Med Sci (Paris)* 2013 ; 29 : 397-403.
6. Favaudon V, Fouillade C, Vozenin MC. La radiothérapie FLASH pour épargner les tissus sains. *Med Sci (Paris)* 2015 ; 31 : 121-3.
7. Borejka AJ, Kaluska IM. Materials used in medical devices. In : International atomic energy agency, eds. *Trends in radiations sterilization of health care products*. Vienna, Austria : International Atomic Energy Agency, 2008 : 159-74.
8. Da Silva Aquino KA. Sterilization by gamma irradiation. In : Adrovic F, ed. *Gamma radiation*. InTech, 2012.
9. Tahtat D, Mahlous M, Benamer S, *et al.* Effect of molecular weight on radiation chemical degradation yield of chain scission of γ -irradiated chitosan in solid state and in aqueous solution. *Radiat Phys Chem* 2012 ; 81 : 659-65.
10. Ghosh SK, Chaki TK, Khastgir D, Pinto R. Gamma irradiation effects on optical, thermal, and mechanical properties of polysulfone/MWCNT nanocomposites in argon atmosphere. *J Appl Polym Sci* 2015 ; 132 : 42017.

TIRÉS À PART

J.P. Alcaraz



Tarifs d'abonnement m/s - 2016

Abonnez-vous
à **médecine/sciences**

> Grâce à m/s, vivez en direct les progrès des sciences biologiques et médicales

Bulletin d'abonnement
page 724 dans ce numéro de m/s



Biomimetic Membrane System Composed of a Composite Interpenetrating Hydrogel Film and a Lipid Bilayer

Barry Stidder, Jean-Pierre Alcaraz, Lavinia Liguori, Nawel Khalef, Aziz Bakri, Erik B. Watkins, Philippe Cinquin, and Donald K. Martin*

A simple way to form an interpenetrating hydrogel (IPH) by combining a layer-by-layer polyelectrolyte membrane with agarose is reported. The formed IPH membrane is more robust and easily manipulated compared to a polyelectrolyte membrane with the same number of layers. The IPH has good diffusion characteristics and retains the advantageous surface charge from the polyelectrolyte composition that facilitates the adsorption of a stable lipid bilayer. The stable adsorption of a lipid bilayer on the IPH creates a biomimetic membrane system that is optimized for utilization in a diffusion chamber.

1. Introduction

In this work we aim to fabricate a biomimetic membrane system that includes a stable lipid bilayer and is optimized for utilization in a diffusion chamber. The novelty in this report is the adaptation of polyelectrolyte multilayer films to fabricate an interpenetrating hydrogel that is permeable, of nanoscale thickness and sufficiently rigid to manipulate as a film to function as a free-standing biomimetic membrane planar support. The concept of producing semipermeable films utilizing polyelectrolytes,^[1] notably with polystyrene sulfonate, was introduced in 1960 but the development of the layer-by-layer (LbL) technique of assembling polyelectrolyte films by Decher and Hong in 1991 stimulated investigation of the use of the films for many applications.^[2,3] The LbL manufacturing process involves the

alternate adsorption of polyelectrolytes of opposite charge onto surfaces including plastic, glass, latex, colloidal particles, bacterial or mammalian cells. Polyelectrolyte multilayer films have provided a permeable substrate to support lipid bilayers, but initially were adsorbed onto a solid supporting structure and were not free-standing.^[4,5] However, the production of free-standing LbL multilayer films has definite advantages for diffusion membranes.^[6] For example, a free-standing multilayer film of montmorillonite and polyelectrolyte has been formed on a cel-

lulose acetate substrate which was then dissolved away by acetone.^[7] A robust clay nanocomposite was produced by LbL assembly of PVA and montmorillonite.^[8] Also, a novel approach for the fabrication of non-covalent and free-standing biopolymer assemblies has also been reported.^[9] Other examples that utilize a sacrificial substrate during manufacture include the use of pH-responsive multilayer film between a substrate and the PEM, that disintegrates when the pH is adjusted to neutral^[10] and the use of ion-triggered exfoliation, which breaks the electrostatic interaction between the PEM and substrate whilst keeping the integrity of the resultant films.^[11]

Although black lipid bilayers have been used extensively as biomimetic membranes in physicochemical and bilayer diffusion studies since their introduction^[12] in the 1960s, they have the disadvantages of relatively short lifetimes and traces of solvent residual remaining in the bilayer. The stability of a lipid bilayer can be greatly enhanced by covalently tethering the lipid molecules to a solid substrate, with the tethered layer creating a nanoscale reservoir spacer layer between the bilayer and solid substrate and removing the need for solvents during formation of the bilayer.^[13] Such bilayers stabilized on solid gold surfaces are often used in electrical investigations of the bilayer properties and transport of molecules through protein channels, but the impermeability of the gold substrate does not make that tethered membrane system easily adaptable for diffusion chambers. The use of a polyelectrolyte film to support a lipid bilayer provides a membrane system that is permeable. Examples of previous reports of such a system include a lipid bilayer which was assembled onto polyelectrolyte-coated colloidal particles^[14] or planar polyelectrolyte membranes coated onto glass.^[15] Conversely, the LbL coating of liposomes provides the encapsulation of lipophilic particles inside a system named capsosomes.^[16]

The simplicity and versatility of the LbL technique, especially when modified to produce hollow microcapsules,^[17] allows for

Dr. B. Stidder, Dr. L. Liguori, Prof. D. K. Martin
Fondation RTRA Nanosciences
Université Joseph Fourier-Grenoble 1/ CNRS/
TIMC-IMAG UMR 5525
Grenoble, F-38041, France
E-mail: don.martin@imag.fr



J. P. Alcaraz
Université Joseph Fourier-Grenoble 1/ CNRS/ TIMC-IMAG UMR 5525
Grenoble, F-38041, France

Dr. N. Khalef, Prof. A. Bakri
Université Joseph Fourier-Grenoble 1/ CNRS/
TIMC-IMAG UMR 5525/ TheREx/ Formulation and Pharmaceutical
Formulation Engineering
Grenoble, F-38041, France

Dr. E. B. Watkins
Institut Laue-Langevin
6, rue Jules Horowitz, Grenoble, F-38042, France

Prof. P. Cinquin
Université Joseph Fourier-Grenoble 1/ CNRS/ TIMC-IMAG UMR 5525
Grenoble, F-38041, France

DOI: 10.1002/adfm.201200751

many potential biomedical applications such as micro-encapsulation, controlled drug release, biosensors as well as for tissue engineering. We have recently published a biological application with our approach utilizing the LbL technique to create a free-standing hollow microcapsule scaffold to support an ion-transporting lipid bilayer for application in an artificial cell.^[18]

We present here a novel way of forming a free-standing planar polyelectrolyte multilayer film using a sacrificial substrate of low melting point agarose to produce an interpenetrating hydrogel (IPH). Our method for producing this IPH provides additional stability to the free-standing planar polyelectrolyte multilayer film by the incorporation of agarose during the fabrication of the film (**Figure 1**). The sacrificial agarose substrate is first pre-coated with a layer of poly(ethyleneimine) (PEI) which acts as a precursor to enhance the stability of the subsequent alternating polyelectrolyte multilayers.^[19] Alternating layers of poly(sodium 4-styrenesulfonate) (PSS) and poly(allylamine hydrochloride) (PAH) are then deposited onto the agarose substrate using the layer-by-layer technique. Prior to the final formation of the IPH, the sacrificial substrate provides strength during manipulation and transference of pre-formed PEM films onto a range of other substrates.

2. Results and Discussion

The robust nature of the IPH film is demonstrated in **Figure 2**, which shows a sequence of frames from a video of the removal of the bulk agarose by dissolution with hot water. For the purpose of this demonstration, the unconstrained IPH film is allowed to float in response to thermal convection currents. The remainder of the results quantify the composite nature and enhanced thickness of the IPH film compared to a classical LbL polyelectrolyte membrane. Both an elemental analysis and a thermal analysis were performed on the IPH and compared to the same mixed ratio of the pure polyelectrolytes. Tracer studies were performed to measure the diffusion coefficient of the IPH. The IPH was able to support a stable lipid bilayer, which was confirmed by impedance spectroscopy.

2.1. IPH Film Thickness Characterization

We compared the thickness of IPH films transferred onto a silicon wafer to classically prepared polyelectrolyte (PEM) films adsorbed directly onto a silicon wafer using the layer-by-layer method. Both types of films comprised 18 layers of polyelectrolytes (PEI, PSS and PAH). We utilized ellipsometry to measure the thickness of the IPH or PEM films on the silicon wafers. Both the IPH and PEM samples were dried partially at room temperature following an identical protocol before the ellipsometry measurements. The thickness of the PEM film adsorbed directly on silicon was 32 ± 1 nm ($n = 8$). Neutron reflectivity measurements were performed on fully hydrated PEM films and indicated that the thickness of the PEM films was 33 ± 1 nm (**Figure 3**), with the error on the thickness based on the amount of change in the chi-square by 1 in the modelling. The neutron reflectivity measurement of thickness confirmed that the procedure for the ellipsometry

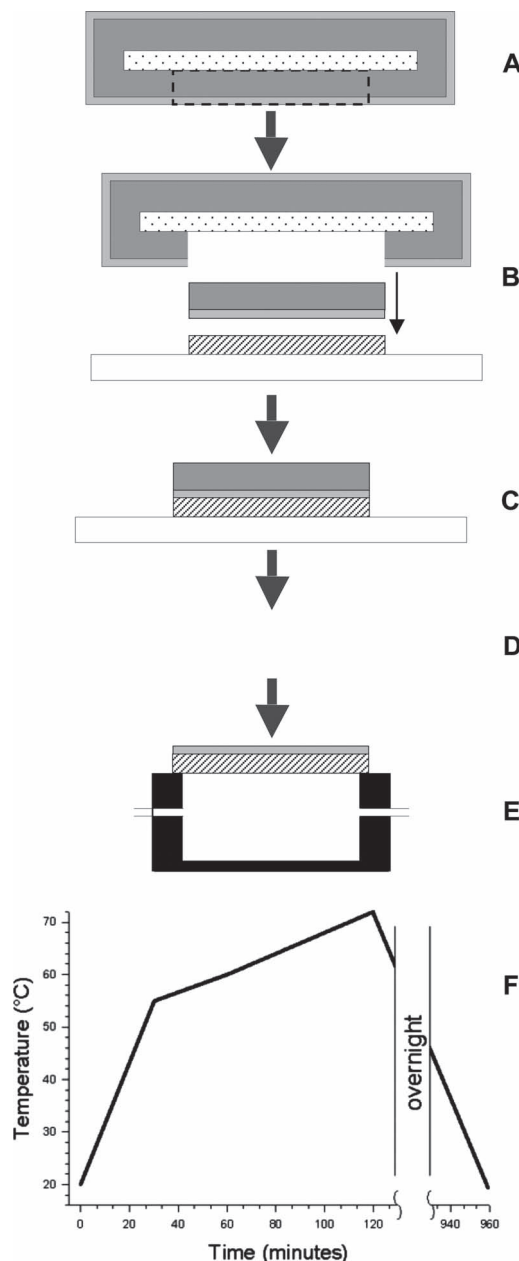


Figure 1. Schematic of the fabrication method for the free-standing polyelectrolyte film using the sacrificial agarose support. The various materials are identified by the different shadings, as polystyrene microscope slide (stippled), agarose (dark gray), polyelectrolyte film (light gray), and track-etched polycarbonate (diagonal lines). The larger unfilled rectangle in B, C, and D represents the glass microscope slide used as a base during the fabrication procedures. A) The polyelectrolyte film is adsorbed using the LbL method onto agarose, which has been coated onto a polystyrene microscope slide. The LbL adsorption process is assisted by a robot to control the reproducibility of formation of the polyelectrolyte film between batches. B) A section of agarose+polyelectrolyte is cut from the coated microscope slide. C) The section of agarose+polyelectrolyte is placed onto a piece of track-etched polycarbonate. D) The bulk agarose is removed from the polyelectrolyte film by a slow heating protocol in a water bath. E) The polyelectrolyte+polycarbonate is placed into the diffusion chamber (black). F) The slow heating protocol to remove the bulk agarose. The heat was turned on at 0 min and turned off at 120 min, to allow cooling of the water bath overnight.

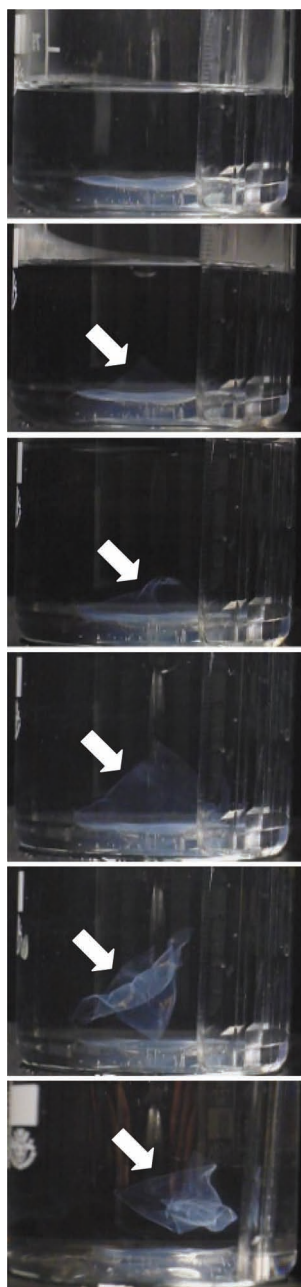


Figure 2. Demonstration of the robust nature of the composite agarose/polyelectrolyte membrane. The following sequence of frames from a video demonstrates that the unconstrained membrane floats from the bulk agarose in response to sequential aliquots of hot (90 °C) Milli-Q water. This was achieved by placing a portion of the polyelectrolyte-coated agarose PEM film side up in a glass beaker containing 60 °C Milli-Q water. In this demonstration no polyvinylchloride mask was used to restrain the PEM film. The PEM film is indicated by the white arrows and it keeps its integrity, but is prone to folding in response to the thermal convection currents from the addition of the hot aliquots of Milli-Q water.

measurements produced an accurate measurement of the film thickness. The thickness of the IPH film, using ellipsometry, was found to be much thicker having an average value of 278 ± 2 nm ($n = 8$).

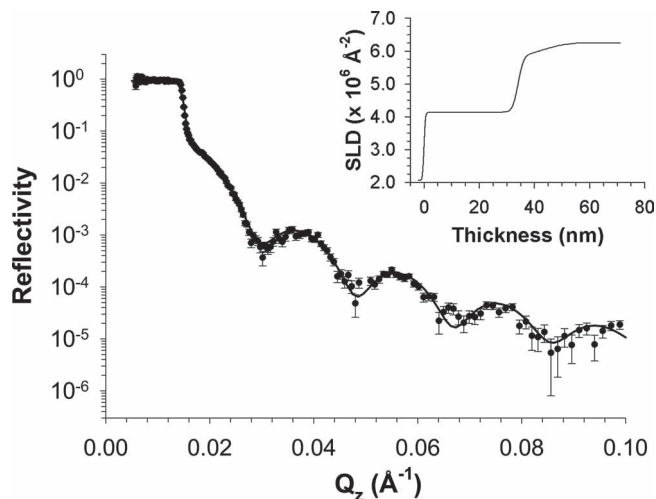


Figure 3. Neutron reflectivity data and corresponding model fit for 18 layers of PSS/PAH polyelectrolyte at the silicon/D₂O interface. Data was modeled using a single, homogeneous layer to describe the polyelectrolyte film and an additional diffuse layer representing the outermost solvated polyelectrolyte layer. The inset displays the scattering length density profile corresponding to the model. The thickness of the homogeneous region of the film was 34.5 nm.

2.2. Elemental Analysis

Elemental analysis confirmed the presence of agarose in the IPH film. The agarose enters the IPH film either during the heating process to remove the bulk sacrificial agarose layer or during the layer-by-layer dipping process and interpenetrates the polyelectrolytes to produce the IPH film. The elemental monomeric composition of the polyelectrolytes are C₈H₇O₃SNa for PSS, C₃H₈NCl for PAH, C₂₄H₅₉N₁₁ for PEI and C₁₂H₁₈O₉ for agarose. The elemental analysis of a control mixture of PSS, PAH and PEI (ratio 9:8:1), low melting point agarose and of the IPH film formed from 18 LbL PEM are shown in **Table 1**. The carbon and oxygen content of the IPH film is considerably higher than that of the control mixture of polyelectrolytes. It is likely that the increased carbon content is due to the residual agarose that is incorporated with the PEM to form the IPH film after the water bath treatment. This aspect of the elemental

Table 1. Elemental analysis of the IPH film, agarose, and of control mixtures of polyelectrolytes. The values are presented as weight-percentage composition of the material. The column “other” represents the combined weight-percentage of Na and Cl present in the samples. There is a greater amount of Na and Cl present in the Control PE Mix because this is the solution that results from combining PAH, PSS, and PEI. In that case each PAH molecule brings one Cl and each molecule of PSS brings one Na. Conversely, the NaCl is leached from the IPH film during the process of manufacture and the low level of Na and Cl in the agarose is insignificant compared to the C and O.

	Carbon	Oxygen	Nitrogen	Sulphur	Hydrogen	Other
IPH film	48.8	24.3	5.2	8.3	6.6	6.8
Control PE mix	37.8	19.8	6.9	7.7	6.2	21.6
Agarose	44.2	48.0	<0.1	<0.1	6.0	1.6

analysis suggests strongly that the increased thickness of the IPH film is due to the incorporation of agarose.

The higher content of oxygen in the IPH film could be due to the presence of bound water in the gel.^[20] This is consistent with the elemental analysis showing that the measured oxygen content of the control mixture of polyelectrolytes (PSS, PAH, and PEI) was higher than the predicted oxygen content based on the chemical formulae. Although the control mixture of polyelectrolytes was dried for 3 days at 45 °C it is likely that water molecules remain bound to the polyelectrolytes.^[20] The thermal analysis also confirmed the presence of water in the samples (see Section 2.3).

Nitrogen is exclusively present in PEI and PAH, and sulfur in PSS. Thus, as has been previously considered,^[21] the ratio of nitrogen to sulfur provides an estimation of the ratio between of the monomeric units of cationic polyelectrolytes (PEI and PAH) to the anionic polyelectrolyte (PSS). Taking into account that the IPH film comprises 9 layers of PSS, 8 layers of PAH and 1 layer of PEI, and assuming that each dip into each polyelectrolyte adsorbs the same amount of N and S atoms, then we calculate the N:S ratio to be 0.90. The measured N:S ratio is 0.9 for the control mixture of polyelectrolytes and thus agrees with the calculated value. However, the measured N:S ratio is 0.62 for the IPH film which provides further evidence that the IPH film contains agarose, and that the IPH comprises approximately 30% agarose.

2.3. Thermal Analysis

We confirmed the formation of an interpenetrating hydrogel with the technique of DSC and showed the IPH had a transition temperature different to either agarose or the polyelectrolytes alone. Three thermal events were observed for the measured samples, which occurred between 70 °C and 105 °C, between 130 °C and 190 °C and between 245 °C and 290 °C (Figure 4A). The expected endothermic gel-sol transition is observed for the agarose sample at 87 °C. The IPH is the only other sample that shows a similar endotherm at 82 °C (Figure 4B). An endotherm around 130 °C to 190 °C was observed for all the measured samples. The pure compounds PSS, PAH and the agarose free physical mixture of PSS-PAH showed small and broad endotherms while agarose and the IPH

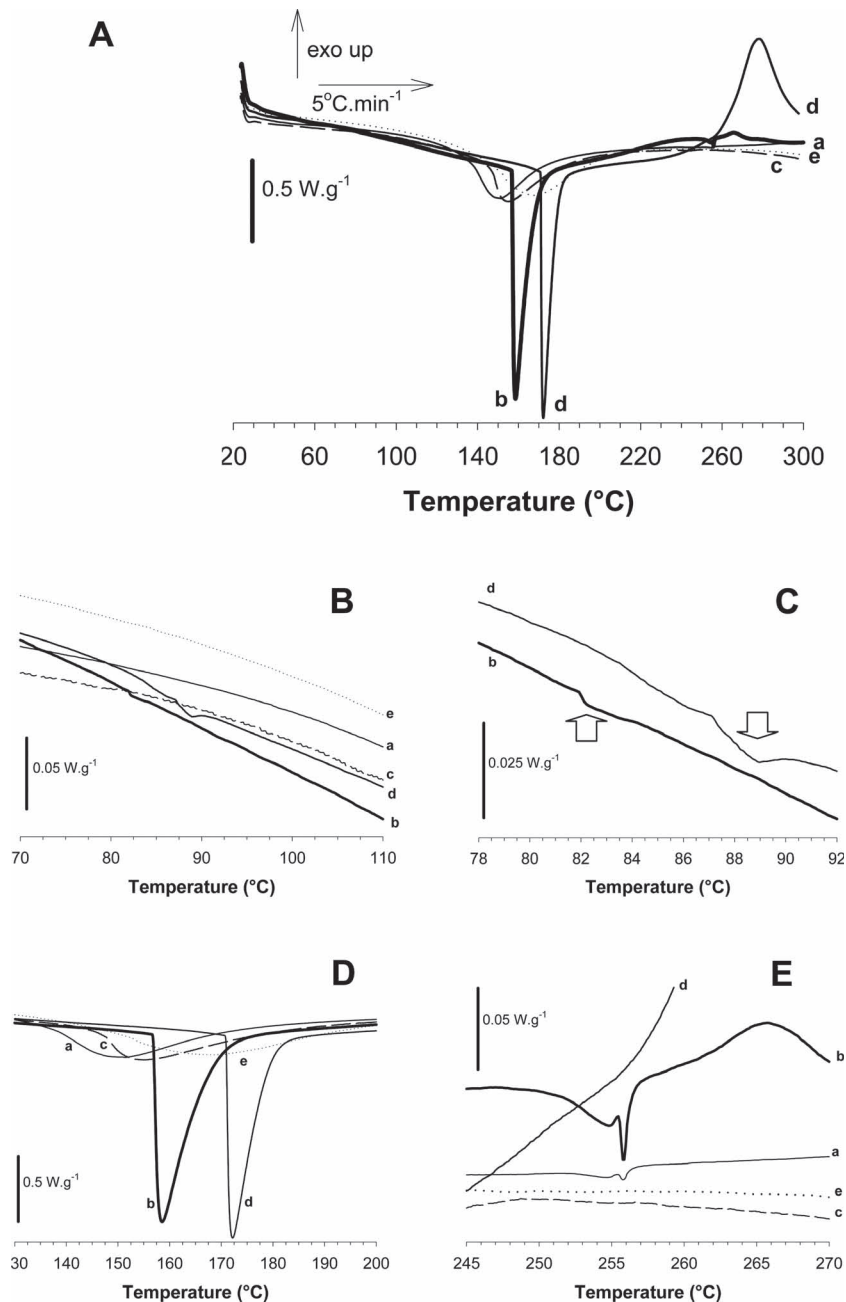


Figure 4. Thermal analysis of the IPH and related compounds. For all thermograms exothermic heat flux is in the upward direction and the scan rate was 5 °C min⁻¹. A) DSC thermograms of a) mixture PAH + PSS, b) IPH, c) PSS, d) agarose, and e) PAH, which show three main thermal events that occur between 70 °C and 110 °C, 130 °C and 200 °C and between 245 °C and 290 °C. B) Zoom on the thermograms between 70 °C and 110 °C, which indicates an endotherm due to agarose melting on the thermograms for the pure agarose and the IPH. C) Zoomed view of the thermograms between 78 °C and 92 °C to show more clearly the endotherm due to agarose melting for the pure agarose and the IPH. D) Zoomed view of the thermograms between 130 °C and 220 °C showing an endotherm due to the evaporation of the water in the samples. E) Zoomed view of the thermograms between 245 °C and 270 °C, which indicates a similar thermal behavior for the IPH and the mixture of PAH and PSS. Only the IPH and the mixture of PSS and PAH show a similar endotherm attributed to the interaction between PSS and PAH. At 256 °C only IPH and pure agarose show a similar exotherm due to the agarose decomposition.

showed similar bigger and sharper endotherms (Figures 4A,C). Those endotherms are attributed to evaporation of sorbed water from the samples, as samples were voluntarily not dried prior analysis. At 248 °C both IPH and the physical mixture of PSS-PAH undergo similar endotherms not observed in the pure compounds (Figure 4D). Commenting on this phenomenon is beyond the scope of this paper, however we attribute this to the interaction between solid PSS and PAH known to occur in the presence of bulk water. Further investigations will be carried out to clarify this hypothesis.

Between 256 °C and 290 °C, the pure agarose shows a large exotherm (Figure 4A) due to its decomposition (visual observation after the scanning showed that the sample was burned). A similar decomposition was also reported for Agar samples.^[22] The IPH was the only sample that showed a similar exotherm at the same onset temperature (Figure 4A,D).

The IPH prepared on the agarose substrate is the only analyzed sample that shows similar thermal behavior to the pure agarose sample. The observations of the thermal behavior to support that conclusion are a) at 81 °C, which is 5 °C below the pure agarose gel-sol transition, but such a shift to a lower value has been reported earlier for agarose-poly(acrylamide) based interpenetrating hydrogels,^[23] b) around 150 °C IPH showed a large and sharp endotherm which were similar to the agarose sample and attributed to the water content evaporation while PSS, PAH and the agarose free physical mixture of PSS-PAH showed much smaller and broader endotherms, and c) at 256 °C IPH showed a similar decomposition exotherm^[22] as the pure agarose sample while the other samples did not show such exotherm.

The thermal events indicate that agarose is present in the IPH. The similar onset decomposition temperature of pure agarose and IPH suggests that some remaining free agarose is present in the IPH. However, the shift in the gel-sol temperature suggests that polyelectrolyte polymers form an interpenetrating hydrogel with agarose, which is an interpretation supported by the work of Fernández et al.^[23]

2.4. Diffusion Through the IPH Film

The IPH film was supported by a porous polycarbonate membrane (track-etched 100 nm pores) for further utilization in diffusion chambers. In separate experiments we measured the flux of fluorescein through the polycarbonate supporting membrane and then the diffusion through the combined IPH film and the polycarbonate supporting membrane (Figure 5). For both samples the dead-volume in the tubing results in a

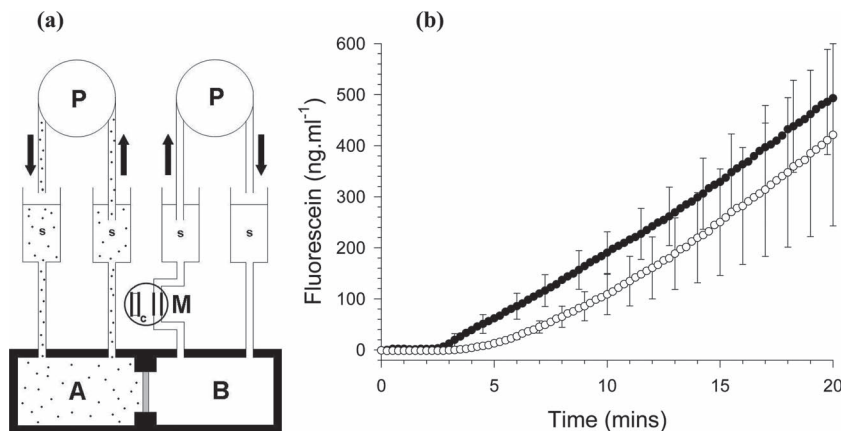


Figure 5. a) Method of conducting the diffusion experiment. Note that the lipid bilayer is not covering the IPH film for this diffusion experiment. The membrane is sandwiched between the two half-chambers of the diffusion apparatus (A and B). The same peristaltic pump (P) closed the system to provide a gravity-driven flow-rate of 800 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ simultaneously through both the chambers A and B from a bank of syringes (s). The solid arrows indicate the direction of flow of the test solutions in the diffusion apparatus. The tracer for the diffusion is fluorescein. The assay for the diffusion is the measurement of fluorescence in the solution from chamber B that flowed through a borosilicate glass microcapillary tube inserted in the tubing of the pump system. To control for signal variations on-the-fly the fluorescence of a blank solution (c) in a closed borosilicate glass capillary was measured simultaneously with the the solution flowing in chamber B. For that measurement the microcapillary tubes are fixed onto the stage of a fluorescence microscope, as illustrated in the diagram by the thicker lines inside the circle labelled M. The fluorescence of the solutions flowing through both glass microcapillary tubes are recorded continuously by a computer-controlled camera attached to the fluorescence microscope. At the start of each experiment the same buffer solution is pumped through both chambers A and B. The diffusion experiment is performed by first loading a high concentration (1 mg mL^{-1}) of fluorescein in the buffer solution of the pumping system for chamber A, which approximates an infinitely high supply concentration for the diffusion process. The permeability of the supported polyelectrolyte is calculated from the increase in fluorescence of the solution pumped through chamber B. b) Increase in fluorescein concentration in chamber B of the diffusion apparatus. The open symbols represent diffusion measurements with the combined IPH film and polycarbonate supporting membrane. The closed symbols represent diffusion measurements with the polycarbonate supporting membrane alone.

dead-time from the introduction of fluorescein into chamber A and the appearance of fluorescein under the microscope in chamber B. The dead-time is approximately 3 min (191 s) when measured with the polycarbonate membrane and 5 min (321 s) for the combined IPH film and polycarbonate membrane. The 2 min difference between the two samples is explained by the IPH film functioning as a delay compartment. After the IPH film is saturated with the fluorescein tracer then the diffusion continues through the combined membrane system. That type of response is unable to be observed in diffusion measurements using Na^+ as the tracer since that ion is already present in the polyelectrolytes during the fabrication process.

The permeability coefficient (P) of the IPH film was calculated from the measurements of the flux of fluorescein according to the expression of Fick's law on passive diffusion

$$P = \frac{V}{AC_a} \left(\frac{dC_b}{dt} \right) \quad (1)$$

where V is the volume of the receiving chamber B (0.15 mL), A is the surface area of the IPH film for diffusion in the chambers (0.385 cm^2), C_a is the concentration of fluorescein in the

donor chamber A (1000 ng mL^{-1}), and dC_b/dt is the slope of the linear portion of Figure 5.

The diffusion coefficient (D) for the IPH film was calculated from

$$D = Pl \quad (2)$$

where l is the thickness of the IPH film (278 nm).

The permeability coefficient for the IPH film is $P = 2.70 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$. The diffusion coefficient for the IPH film is $D = 7.51 \times 10^{-9} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$.

2.5. Formation of Lipid Bilayer on IPH

After the IPH on track-etched membrane had been sealed into the diffusion cell an additional layer of PSS was

absorbed onto the IPH to ensure the outer layer, for contact with the lipid bilayer, was negatively charged. The lipid bilayer was formed on the IPH by the addition of liposomes of DOPC:DOPE:DMPA:cholesterol in the molar ratio of 40:20:20:20. That ratio provides a model for the lipid and sterol types present in a typical plasma membrane. The formation of the lipid bilayer was followed by impedance spectroscopy via platinum electrodes in the upper and lower chambers of the diffusion cell.

Figure 6 shows that the lipid bilayer formed from the addition of the liposomes increased the impedance of the biomimetic membrane system and that it was predominately resistive in nature at frequencies less than 1 Hz. At 1 Hz the impedance of the IPH and the polycarbonate support is $1.41 \times 10^5 \Omega$, which interestingly is in the same order of magnitude

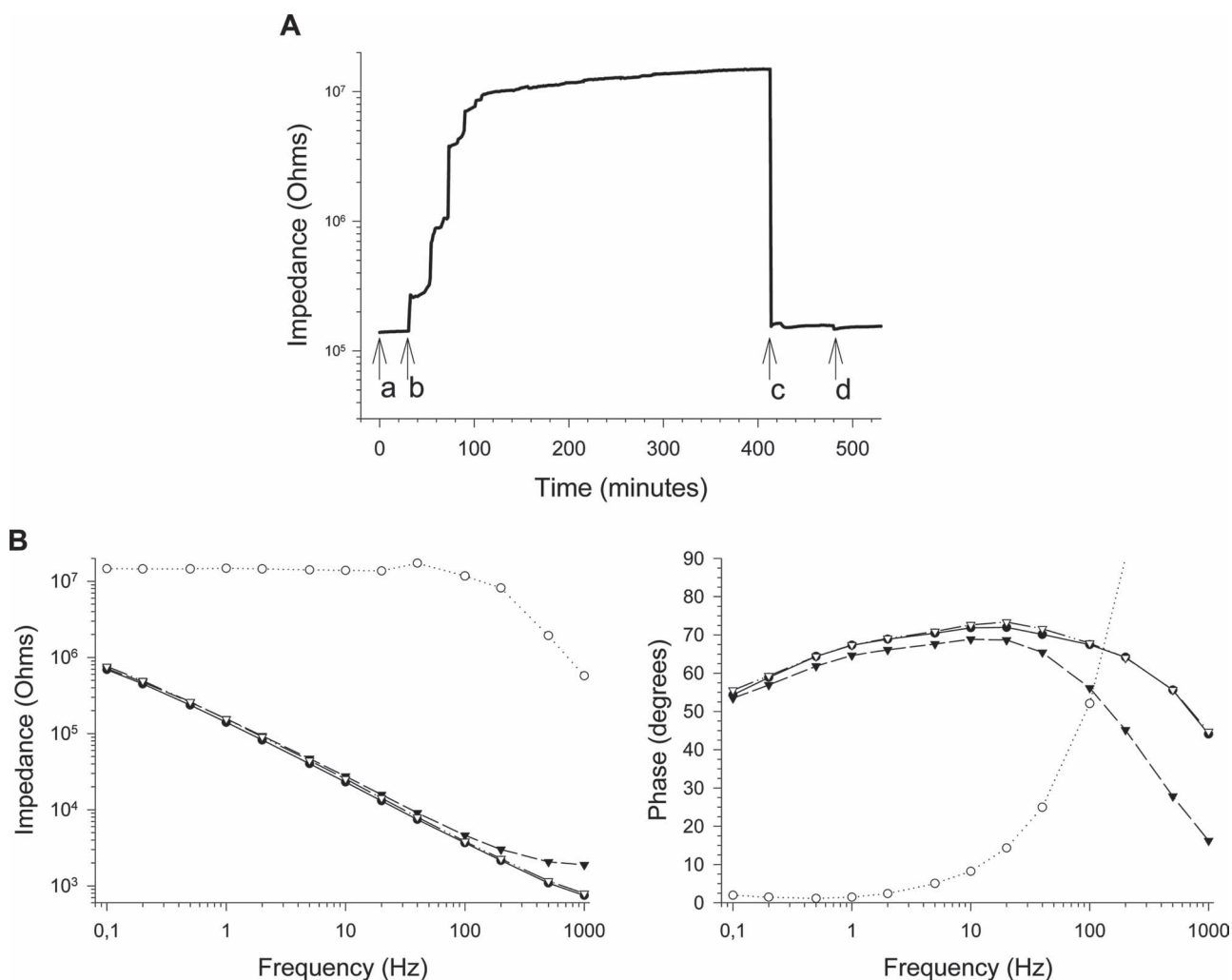


Figure 6. A) Electrical impedance of the composite biomimetic membrane system coated with a lipid bilayer measured at 1 Hz. a) Impedance of the composite biomimetic membrane superfused by NaCl buffer solution. b) Addition of liposomes to form a lipid bilayer. c) Addition of pure ethanol to remove the lipid bilayer from the composite biomimetic membrane system. d) Replacement of superfusing solution with original NaCl buffer solution (washout). B) Bode plots of the impedance and phase of the biomimetic membrane system, recorded when the impedance and phase had reached steady-state. In both plots the symbols represent the conditions of: ● impedance of the composite biomimetic membrane superfused by NaCl buffer solution, ○ addition of liposomes to form a lipid bilayer, ▼ addition of pure ethanol to remove the lipid bilayer from the composite biomimetic membrane system, and ▽ impedance of the composite biomimetic membrane superfused by NaCl buffer solution (washout).

as the impedance reported ($8 \times 10^5 \Omega$) for a hydrogel film of $5 \mu\text{m}$ in thickness.^[24] At 1 Hz, the impedance of the combined biomimetic system of the lipid, IPH and polycarbonate is $1.47 \times 10^7 \Omega$. The IPH support provides a system for a stable lipid bilayer to be used in a diffusion chamber. For example, the impedance recordings indicate the lipid bilayer was stable when we deliberately stopped the experiment after 5 h by removing the lipid bilayer using ethanol (Figure 6).

3. Conclusions

We report the production of an IPH membrane by combining polyelectrolyte films produced using the Layer-by-Layer technique with a sacrificial agarose substrate. The IPH membrane is sufficiently robust to be manually transferred to one side of a supporting porous scaffold membrane, such as a track-etched polycarbonate membrane, to enable construction of a biomimetic membrane system that includes a supported lipid bilayer for practical use in a diffusion chamber. By comparison, for the purpose of creating an equivalent continuous supporting polyelectrolyte membrane, the formation of layer-by-layer polyelectrolyte films directly on one side of track-etched polycarbonate membranes is not possible due to the high prevalence of nanopores that penetrate the polycarbonate membranes. In such a case the polyelectrolyte will coat the top and bottom surfaces and also the inside of the nanopores but not form a continuous membrane to span the pores. However, that type of utilization of polyelectrolytes can have an advantage for the alternative specific purpose of utilizing the pores of the track-etched membrane as a template for producing nanotubes of polyelectrolyte.^[25]

We chose agarose as the sacrificial substrate due to its simplicity of removal with no requirement for additional chemical solvents. Chemical solvents have been reported for other types of sacrificial substrates, including, for example, free-standing multilayer films of montmorillonite and polyelectrolyte that have been formed on a cellulose acetate substrate which was then dissolved away by acetone.^[26] Other examples are the use of pH-responsive multilayer film between a substrate and the polyelectrolyte membrane, that disintegrates when the pH is adjusted to neutral^[27] and the use of ion-triggered exfoliation, which breaks the electrostatic interaction between the polyelectrolyte membrane and the substrate whilst maintaining the integrity of the resultant films.^[28]

Using the agarose-sacrificial method we fabricated an IPH that comprised 18 single polyelectrolyte layers. The increased thickness due to the incorporation of the agarose in the IPH provides an advantageous production method compared to increasing the number of layers in the more classical layer-by-layer production technique. For example, to create a 280 nm thick film of pure polyelectrolyte would take hundreds of dips in oppositely charged solutions. The use of a sacrificial agarose substrate also overcomes the problems that would occur when trying to manoeuvre this type of membrane into a diffusion cell, especially for the requirement to keep it flat.

In our studies of the diffusive properties of IPH on a porous track-etched polycarbonate support fluorescein was used as a tracer to investigate the diffusion in the combined membrane system. For example, the kinetics of the charged fluorescein

diffusing through the system provided information about the extent to which the IPH provided a passive delay in the diffusion in the combined system. Our use of a sacrificial IPH membrane laid onto the porous track-etched polyelectrolyte scaffold allowed our diffusion experiments to directly compare the control sample of track-etched polycarbonate membrane (100 nm porosity) with a track-etched polycarbonate membrane with an IPH film on top of it. This differs from other diffusion studies of polyelectrolyte membranes in that the IPH is only on one side, the polyelectrolyte has not penetrated the nanopores of the supporting track-etched porous membrane, and the IPH is not attached to the membrane such as in the studies reported by Dirieh Egueh et al., who dipped both sides of a polyethersulfone anisotropic membrane.^[29] We chose fluorescein as the tracer molecule because it allows quantitative optical measurements of diffusion and is not present inside the IPH before the measurement. This provides a more direct observation that the IPH functions as a compartment in the diffusion pathway, unlike the electrical measurement of streaming potential used in a previous study,^[30] and that once saturated with the diffusing species the IPH membrane does not retard the diffusion of the species.

There is no disadvantage on restricting diffusion through the biomimetic membrane system we report due to the incorporation of the agarose in the IPH. The diffusion coefficient of $D = 7.51 \times 10^{-9} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ measured on the IPH compares favorably with previous reports of the diffusion properties of polyelectrolyte membranes and of agarose membranes. Indeed, although there is a low diffusion coefficient on the order of $10^{-15} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ for the transport of fluorescent molecules that are bound electrostatically to polyelectrolyte membranes,^[31] the diffusion coefficient of the redox molecule ferricyanide through a 10 bilayer PDADMA/PSS polyelectrolyte membrane at room temperature is around $2 \times 10^{-9} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$.^[32] The diffusion coefficient for KCl through a 6 bilayer PAH/PSS film adsorbed onto a polyethersulfone anisotropic membrane is $10.62 \times 10^{-9} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$.^[29] The diffusion coefficient of $4 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ for BSA protein through a 5% w/w agarose gel^[33] is larger than for the polyelectrolyte membrane, and is probably due to the uncharged nature of the agarose gel.

The IPH has the advantage of being more robust and easily manipulated compared to a polyelectrolyte membrane of the same number of layers, but the IPH retains the advantage of a surface charge from the polyelectrolyte composition in order to facilitate the adsorption of a lipid bilayer. The combination of the IPH and a supported lipid bilayer provides an impedance of a similar order to a tethered lipid bilayer of a similar area on a solid support^[34] or black lipid membranes suspended over micrometer-sized apertures in filter membranes.^[35] The distinct advantage of the IPH biomimetic membrane system we describe is the easy construction of a permeable biomimetic membrane system for use in diffusion chambers. For example, this biomimetic membrane system provides an alternative to a black-lipid-membrane system since the formation of the supported lipid membrane does not require specific solvents.

4. Experimental Section

Materials: Poly(ethyleneimine) (Sigma-Aldrich, P3143), poly(sodium 4-styrenesulfonate) (Sigma-Aldrich, 243051), poly(allylamine)

hydrochloride (Sigma-Aldrich, 283223), sodium chloride (Sigma-Aldrich, 10094482), Fluorescein sodium salt and cholesterol (Avanti Polar Lipids, 700000P) were purchased from Sigma-Aldrich, France and used as received. Low melting temperature agarose (Type LM-3, ref. 1670, lot H111221) was purchased from Euromedex, France and had a manufacturer's stated gelling temperature (1.5%) of 24.5 °C, a stated melting temperature (1.5%) of 65.3 °C and a stated gel strength (1.5%) of >400 g cm⁻². Ultrapure water was of Milli-Q grade. Polycarbonate track-etched membranes of 100 nm pore size (Whatman, 7060-2501) were purchased from Whatman International Ltd. 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (Avanti Polar Lipids, 850375), 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (Avanti Polar Lipids, 850725) and 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphate (sodium salt) (Avanti Polar Lipids, 830845) were purchased from Avanti Polar Lipids, USA and used as received.

Layer-by-Layer Fabrication of Polyelectrolyte Film on Agarose-Coated Substrates: The novel polyelectrolyte fabrication process is illustrated in Figure 1. The low melting temperature agarose was dissolved in Milli-Q water to a concentration of 5%. Polystyrene microscope slides were coated thoroughly on all sides with the agarose to a thickness of 1.5 mm. It is necessary to coat both sides of the slide to stop the agarose detaching from the slide. Polyelectrolyte solutions of PSS and PAH (1 mg mL⁻¹) were made with a NaCl salt solution (0.5 M) and PEI (1 mg mL⁻¹) with ultrapure water. The agarose-coated slides were then dipped for 20 minutes in the PEI solution, followed by rinsing in ultrapure water. To ensure reproducibility an Epson Accusemble robot was customized and programmed to perform the layer-by-layer procedures to adsorb 17 alternate single layers of PSS and PAH, with rinsing steps in between. The agarose-coated microscope slides were loaded into a custom-built slide holder for the Epson Accusemble robot, that contained 6 slides. The robot dipped the slide-holder alternatively in solutions of PSS and PAH for 5 minutes to form the required number of adsorbed layers. Between each dip the slides were rinsed for 5 min each and sequentially in two different containers of ultrapure water to remove excess polyelectrolyte and prevent contamination of the polyelectrolyte solutions. The finished samples were then stored in Milli-Q water until use. The time for storage before use was kept to a minimum, with the agarose typically removed within 4 days.

Removal of Agarose and Transferral of Polyelectrolyte Film onto Track-Etched Membranes: Track-etched membranes with a pore size of 100 nm were used as a passive support for the polyelectrolyte films. As illustrated in Figure 1, a section of the agarose coated with the polyelectrolyte film was placed on the track-etched membrane with the orientation PEM-film down. The section was cut so as to be larger than the surface area of the area for permeation in the diffusion apparatus. A polycarbonate mask fabricated from a 1 mm thick sheet of polyvinylchloride was used to constrain the edges of the PEM-film to avoid the film floating off the track-etched membrane during the following heating protocol. Note that the central area of the PEM-film, the target area for adsorption of the lipid bilayer in the diffusion apparatus, was not constrained. The agarose was removed from the PEM film by heating in a water bath filled with Milli-Q water according to the protocol shown in Figure 1. It is important that the water bath is heated slowly to minimize thermal convection currents that could disrupt the PEM film. The volume of the water-bath was infinitely greater than the volume of the bulk agarose attached to the PEM film, and the bulk of the agarose disperses in the water to leave an intact polyelectrolyte film on the membrane with the outer layer being the positively charged PEI. The composite nature of the remaining agarose/polyelectrolyte in the membrane provided it sufficient strength so that it did not tear (see also illustration of the membrane integrity in Figure 1). The agarose/polyelectrolyte membrane was kept immersed in Milli-Q water until being placed in the diffusion apparatus. This method can also be used to transfer the agarose/polyelectrolyte films to a range of substrates.

Formation of Lipid Bilayer on PEM: The PEM on track-etched membranes were transferred into the diffusion cell and an additional layer of PSS was adsorbed on top of the PEM to ensure a negative outer surface for lipid bilayer adsorption. The lipid bilayer was formed on one side of the PEM

via vesicle fusion. Vesicles of DOPC:DOPE:DMPA:cholesterol (molar ratio of 40:20:20:20) were made by first mixing the lipids in chloroform followed by evaporation. The lipids were then suspended in TRIS buffer (50 mM pH 7.5) and extruded through 100 nm diameter pores to form single unilamellar vesicles (SUV), which were added to the solution that superfused the PEM in the diffusion chamber.

Elemental Analysis of PEM Composite Film: 10 mg of PEM film was prepared by transferring PEM onto glass microscope slides from agarose sacrificial substrates, which were then dried at 45 °C for 3 days. The PEM was removed from the slides using a spatula. A control sample of pure PEI/PSS/PAH was made by mixing a ratio representative of the number of layers deposited in ultra pure water (9:8:1 of PSS/PAH/PEI). The sample was then treated in the same way as the PEM film. A pure sample of low melting agarose was also prepared. The samples were measured by the Service Central d'Analyse CNRS, Solaize, France using CNRS-built microanalysers according to the CNRS protocol RC-E2-01. The measurements were of the % composition by mass of the elements in the samples, to a precision of ±0.3%.

Thermal Analysis of PEM Composite Film: Thermal analysis was performed with differential scanning calorimetry (DSC, TA instrument 2920, France). The instrument was calibrated using pure indium. Separate thermal analysis was performed on samples of the PEM composite membrane, the original pure compound PSS, the original pure compound PAH, the original pure compound agarose, and a 50/50% (w/w) physical mixture of PSS and PAH prepared in the absence of agarose (Mix PAH-PSS). For each analysis a small amount of the typical 1 to 3 mg of sample (typically in the range 1 mg to 3 mg) was precisely weighed and scanned from 25 °C to 300 °C at 5 °C min⁻¹. Samples were stored under normal atmospheric RH conditions in order to detect any gel-sol transition for those samples containing agarose.^[23]

Diffusion Measurements Procedure: The diffusion apparatus is illustrated in Figure 5. The measurements were performed in a custom-built diffusion cell consisting of two half chambers, each of 150 µL volume. The sample (either track-etched membrane alone or with PEM film on top of it) was placed between the chambers under water to avoid disruption of the PEM film and formation of air bubbles. The sample was clamped with o-rings to seal the apparatus. Measurements were performed in two chambers concurrently as shown in Figure 5. The syringes were filled with water for chamber B and fluorescein (1 mg mL⁻¹) for chamber A. Gravity flow at a rate of 800 µL min⁻¹ was used to circulate and stir the 2 solutions in the same manner. Each half-chamber and tubing contained a total volume of 1800 µL ("dead-volume"). A peristaltic pump was connected to the syringes to close the circulation system. Fluorescence was read under an Axiovert 135 fluorescence microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) through a glass capillary connected to the chamber B. Data collection was performed with the MetaVue Imaging System which was programmed to collect an image of the sample capillary and reference capillary every 15 s. Analysis of the images was performed with ImageJ software. The output of the fluorescence camera (A.U. = absorption units) was calibrated using a 2-point calibration procedure by measuring the fluorescence of a blank solution (200 A.U.) and a solution containing fluorescein (10 µg mL⁻¹) to achieve the maximum fluorescence recordable (1500 A.U.).

Impedance Spectroscopy: The technique of electrical impedance spectroscopy was used to measure the conductance properties of the biomimetic membrane system placed in a diffusion apparatus. The impedance spectrum was obtained by applying to the tethered lipid bilayer membrane an AC excitation signal of 30 mV p-p amplitude in a frequency sweep from 0.1 Hz to 1 kHz over a period of 60 s (SDXTetheredMembranes Pty Ltd, Australia). The AC excitation signal was applied across platinum working and counter electrodes inserted in the two chambers of the diffusion apparatus, with no applied DC offset to the biomimetic membrane system.

Adsorption of Polyelectrolyte Layers Directly onto Silicon Wafers: The silicon wafers were cleaned by treatment with hot piranha solution (35 wt% H₂O₂/85 vol% H₂SO₄ (1:1) v/v, 80 °C) for 20 min. That cleaning procedure was performed with extreme caution under a

flow-hood. After removal from the piranha solution the silicon wafers were immediately rinsed extensively in ultrapure water. A precursor of PEI followed by the required number of PSS and PAH layers were adsorbed in using the method detailed above for the agarose slides. The samples were then stored under water until use, with the storage time typically of 4 days.

Ellipsometry: Two types of samples were measured. PEM deposited onto silicon directly using the layer-by-layer technique and PEM free floating film transferred by the sacrificial agarose method described in this article. Excess surface water was blotted from the films using lint-free tissue paper. Measurements of PEM thickness were performed in-air using a rotating quarter wave plate ellipsometer, operating at 660 nm and an angle of 75° (custom-built at ILL, software by Ellipso Technology). A refractive index of 1.47 was used for the PEM to calculate the thickness.^[36] For each sample studied, multiple measurements were taken randomly at different locations across the film.

Neutron Reflectivity: The thickness of 18 layers of PSS/PAH polyelectrolyte adsorbed directly on silicon's native oxide was measured at the solid/liquid interface in deuterated water using specular neutron reflectivity (SNR).^[37,38,39] For SNR, incident neutrons are elastically and specularly scattered from a planar sample at small glancing angles. Reflectivity is defined as the ratio of incident to reflected neutrons and is measured as a function of the momentum transfer vector (Q_z), with $Q_z = 4\pi \sin(\theta) \lambda^{-1}$. SNR is sensitive to the nuclear scattering length density of the sample and probes the in-plane averaged structure perpendicular to the surface. SNR is particularly sensitive to the thickness and composition of the layered structure, and the roughness of the interfaces. Measurements were performed on FIGARO, the time-of-flight horizontal reflectometer at the high flux reactor of the Institut Laue-Langevin (ILL, Grenoble, France). Using 2 Å to 20 Å wavelength range and two incident angles of 0.624° and 3.78°, data were collected up to 0.10 Å⁻¹ with a resolution of ≈6.5% dQ_z/Q_z . Data analysis was performed using the standard layered box-model,^[29] where the simulated reflectivity was fitted to the measured reflectivity using chi-square minimization in motoft software (WaveMetrics, Oregon, USA).

Acknowledgements

B.S. and J.P.A. contributed equally to this work. The authors thank the Institut Laue Langevin (ILL) for provision of beam-time and Dr. Giovanna Fragneto from the Partnership for Soft Condensed Matter (PSCM) for valuable discussions concerning the planning of the experiments. They also thank Ida Berts from the Partnership for Soft Condensed Matter (PSCM) for instruction on the use of the PSCM ellipsometer, and Dr. Cyrille Rochas from Centre de Recherches sur les Macromolécules (CERMAV, CNRS UPR 5301) who provided helpful discussions on agarose. The authors thank the Réseau Thématique Recherche Avancé (Fondation Nanosciences) and the Pôle CSVSB (Université Joseph Fourier) for financial support of this research. D.K.M. was supported by a Chaire d'Excellence from the Fondation Nanosciences, B.S. was supported by a Postdoctoral Fellowship from the Pôle CSVSB, and L.L. was supported by a Postdoctoral Fellowship from the Fondation Nanosciences.

Received: March 17, 2012

Published online: June 14, 2012

[1] M. Mindick, H. I. Patwelt, *US Patent 2957206* **1960**.

[2] G. Decher, J. D. Hong, *Makromol. Chemie-Macromol Symp.* **1991**, 46, 321.

[3] G. Decher, J. D. Hong, J. Schmitt, *Thin Solid Films* **1992**, 210/211, 831.

[4] R. Kügler, W. Knoll, *Bioelectrochemistry* **2002**, 56, 175.

[5] J. Chen, R. Köhler, T. Gutberlet, H. Möhwald, R. Krastev, *Soft Matter* **2009**, 5, 228.

[6] M. Nolte, A. Fery, *IEE Proc. Nanobiotechnol.* **2006**, 153, 112.

[7] A. A. Mamedov, N. A. Kotov, *Langmuir* **2000**, 16, 5530.

[8] P. Podsiadlo, A. K. Kaushik, E. M. Arruda, A. M. Waas, B. S. Shim, J. Xu, H. Nandivada, B. G. Pumplun, J. Lahann, A. Ramamoorthy, N. A. Kotov, *Science* **2007**, 318, 80.

[9] D. Mertz, P. Tan, Y. Wang, T. K. Goh, A. Blencowe, F. Caruso, *Adv. Mater.* **2011**, 23, 5668.

[10] S. S. Ono, G. Decher, *Nano Lett.* **2006**, 6, 592.

[11] Y. Ma, J. Sun, J. Shen, *Chem Mater.* **2007**, 19, 5058.

[12] P. Mueller, D. O. Rudin, H. T. Tien, W. C. Westcott, *Nature* **1962**, 194, 979.

[13] B. A. Cornell, V. L. B. Braach-Maksyvytis, L. G. King, P. D. J. Osman, B. Raguse, L. Wiczorek, R. J. Pace, *Nature* **1997**, 387, 580.

[14] S. Moya, W. Richter, S. Leporatti, H. Bäumlner, E. Donath, *Biomacromolecules* **2003**, 4, 808.

[15] G. Köhler, S. E. Moya, S. Leporatti, C. Bitterlich, E. Donath, *Eur. Biophys. J.* **2007**, 36, 337.

[16] L. Hosta-Rigau, R. Chandrawati, E. Saveriades, P. D. Odermatt, A. Postma, F. Ercole, K. Breheny, K. L. Wark, B. Städler, F. Caruso, *Biomacromolecules* **2010**, 11, 3548.

[17] E. Donath, G. B. Sukhorukov, F. Caruso, S. A. Davis, H. Möhwald, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 2201.

[18] A. R. Battle, S. M. Valenzuela, A. Mechler, R. J. Nichols, S. Praporski, I. L. di Maio, H. Islam, A. P. Girard-Egrot, B. A. Cornell, J. Prashar, F. Caruso, L. L. Martin, D. K. Martin, *Adv. Funct. Mater.* **2009**, 19, 201.

[19] C. Delajon, T. Gutberlet, R. Steitz, H. Möhwald, R. Krastev, *Langmuir* **2005**, 21, 8509.

[20] T. Hatakeyama, H. Hatakeyama, K. Nakamura, *Thermochim. Acta* **1995**, 253, 137.

[21] K. Köhler, D. G. Shchukin, H. Möhwald, G. B. Sukhorukov, *J. Phys. Chem. B.* **2005**, 109, 18250.

[22] T. J. Madera-Santana, M. Misra, L. T. Drzal, D. Robledo, Y. Freile-Pelegrin, *Polym. Eng. Sci.* **2009**, 49, 1117.

[23] E. Fernández, R. Hernández, M. T. Cuberes, C. Mijangos, D. López, *J. Polym. Sci. B* **2010**, 48, 2403.

[24] L. Yang, A. Guiseppi-Wilson, A. Guiseppi-Elie, *Biomed. Microdevices* **2011**, 13, 279.

[25] L. Dauginet, A. S. Duwez, R. Legras, S. Demoustier-Champagne, *Langmuir* **2001**, 17, 3952.

[26] A. A. Mamedov, N. A. Kotov, *Langmuir* **2000**, 16, 5530.

[27] S. S. Ono, G. Decher, *Nano Lett.* **2006**, 6, 592.

[28] Y. Ma, J. Sun, J. Shen, *Chem. Mater.* **2007**, 19, 5058.

[29] A.-N. Dirieh Egueh, B. Lakard, P. Fievet, S. Lakard, C. Buron, *J. Colloid Interface Sci.* **2010**, 344, 221.

[30] A. A. Antipova, G. B. Sukhorukov, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2004**, 111, 49.

[31] R. v. Klitzing, H. Möhwald, *Macromolecules* **1996**, 29, 6901.

[32] R. A. Ghostine, J. B. Schlenoff, *Langmuir* **2011**, 27, 8241.

[33] P. Roger, C. Mattisson, A. Axelsson, G. Zacchi, *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, 69, 654.

[34] P. Yin, C. J. Burns, P. D. J. Osman, B. A. Cornell, *Biosens. Bioelectron.* **2003**, 18, 389.

[35] D. M. Nikolelis, M. Mitrokotsa, *Biosens. Bioelectron.* **2002**, 17, 565.

[36] G. B. Sukhorukov, E. Donath, H. Lichtenfeld, E. Knippel, M. Knippel, A. Budde, H. Möhwald, *Colloids Surf. A.* **1998**, 137, 253.

[37] B. Stidder, G. Fragneto, R. Cubitt, A. V. Hughes, S. J. Roser, *Langmuir* **2005**, 21, 8703.

[38] B. Stidder, G. Fragneto, S. J. Roser, *Langmuir* **2005**, 21, 9187.

[39] H. P. Wacklin, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2010**, 15, 445.

Conception guidée par la physiologie de biopiles bioinspirées implantables

Résumé:

On peut imaginer dans un futur proche que des micro-robots implantés pourront suppléer la défaillance de certaines fonctions essentielles. C'est déjà le cas avec les stimulateurs cardiaques dont les piles au lithium sont bien adaptées à leur fonctionnement pendant des années de vie du patient. Cependant, pour des systèmes plus gourmands en énergie, il convient d'améliorer la longévité et la puissance volumique de ces piles.

La stratégie que nous avons choisie est basée sur une approche biomimétique et deux voies ont été suivies pour créer une biopile bioinspirée : les biopiles enzymatiques génèrent un courant électrique à partir de l'oxydation de molécules organiques et la réduction d'oxygène en eau. Les biopiles à base de membranes biomimétiques génèrent un potentiel électrique à partir du transfert d'ions au travers une membrane biomimétique.

Les biopiles enzymatiques, qui utilisent par exemple le glucose et l'oxygène, sont théoriquement capables de fonctionner indéfiniment car ces substrats sont toujours présents dans l'organisme. Cependant, la biocompatibilité et la performance à long terme de ces biopiles restent des verrous pour leur mise en œuvre chez l'homme. Cette thèse décrit la conception et l'implantation de nouvelles biopiles enzymatiques chez différents modèles animaux. Leur implantation constitue un véritable défi technologique et nous amenons des solutions guidées par la physiologie en abordant les problèmes de biocompatibilité mais aussi de techniques de mesure électrique. Nous sommes maintenant capables d'implanter ces biopiles chez de gros animaux en analysant en temps réel les performances de la biopile implantée.

Cette thèse développe également le concept de biopile à base de membranes biomimétiques. Il s'agit d'une biopile mettant en œuvre des protéines de transport (par exemple des canaux ioniques) insérées dans des membranes biomimétiques. Nous avons démontré la faisabilité de la transformation d'un gradient de NaCl en gradient de protons. Nous avons aussi réussi à générer une différence de potentiel de 20 millivolts avec une membrane plane de 38 mm². Cette membrane biomimétique, contenant l'échangeur sodium/proton NhaA, est stable pendant plus de 15 jours.

Abstract:

I believe in the near future that micro-robots or artificial implanted organs can replace failing essential organs. Lithium batteries of cardiac pacemakers are well adapted to operate for years when implanted in sick patients. However, for next generation energy-intensive implanted devices, the longevity and the volumic power of these batteries have to be improved.

I chose two biomimetic approaches to create bioinspired biofuel cells. The first was an enzymatic biofuel cell that generated electrical current from the oxidation and the reduction of organic or inorganic compounds. The second was a biomimetic biofuel cell that generated an electrical potential from ion transfer across a biomimetic membrane.

The enzymatic biofuel cell, utilizing glucose and oxygen, is theoretically able to work almost indefinitely as its substrates are always present in the body fluids. However, the biocompatibility and the long-term performance of this biofuel cell for a human implantation remains a real bottleneck. This thesis describes the design and the implantation of new enzymatic biofuel cells in different animal models. The implantation of such devices is challenging and a novel creative solution described in this thesis is to take a physiological point of view to address biocompatibility problems and electrical measurement techniques. We are now capable to implant these biofuel cells in large animals by analyzing the performance of the biofuel cells in real time. This thesis initiates the biomimetic biofuel cell concept. It consists of a membrane transport protein (i.e ion channels) incorporated in a biomimetic membrane, which transforms a gradient of salt into a proton gradient. We also generate a 20 mV voltage with a 38 mm² flat membrane. This biomimetic membrane containing the NhaA sodium/ proton exchanger is stable for more than two weeks.

Cette thèse est téléchargeable dans sa version couleur sur <https://hal.archives-ouvertes.fr/>
Ou sur simple demande par email à l'adresse jean-pierre.alcaraz@univ-grenoble-alpes.fr