

Université de Montréal

2m11.2715.2

Réaction de l'hôte contre les îlots de Langerhans microencapsulés; mise au point d'une
méthode pour l'analyse de l'expression des gènes des cytokines impliquées

par

Robert Robitaille

Département de médecine

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences biomédicales

Janvier, 1999

© Robert Robitaille, 1999



2011 2125

W
4
U58
1999
V. 110

Université de Montréal

Recherche en génétique moléculaire et cellulaire
méthode pour l'analyse de l'expression des gènes des virus

par
M. J. Robitaille
Département de microbiologie
Faculté de médecine

Mémoire présenté à l'École de maîtrise en sciences
en vue de l'obtention du grade de
Maître en sciences (M.Sc.)
en sciences biomédicales

juin 1999



Université de Montréal

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Réaction de l'hôte contre les îlots de Langerhans microencapsulés; mise au point d'une
méthode pour l'analyse de l'expression des gènes des cytokines impliquées

présenté par:

Robert Robitaille

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Pierre Maheux, président du jury

Jean-Pierre Hallé, directeur de recherche

Gérald J. Prud'homme, membre du jury

Mémoire accepté le: 26 mars 1999

Sommaire

La transplantation d'îlots de Langerhans est un traitement du diabète de type 1 qui permet de restaurer la sécrétion physiologique d'insuline selon les fluctuations de la glycémie. Cependant, ce traitement se heurte au rejet des îlots et à la récurrence du processus auto-immun à l'origine de la maladie. Il est possible de prévenir le rejet par l'utilisation d'immunosuppresseurs. Toutefois, ces médicaments possèdent des effets toxiques et ne sont pas efficaces pour prévenir la récurrence de la maladie qui est causée par un processus immunitaire différent du rejet.

La transplantation d'îlots microencapsulés est une solution qui permet d'éviter le rejet, la récurrence de la maladie et éliminer l'utilisation d'immunosuppresseurs. En effet, les îlots sont protégés par une membrane semi-perméable, constituée d'alginate et de poly-L-lysine, qui permet la libre diffusion des nutriments, du glucose et de l'insuline tout en empêchant les attaques du système immunitaire. La survie des îlots microencapsulés transplantés est cependant compromise par le développement d'une réaction de l'hôte contre les microcapsules (RHM). Cette réaction implique plusieurs types cellulaires et se caractérise par le développement d'une réaction de fibrose péricapsulaire.

Le but du présent travail était de développer une méthode pour évaluer le rôle des cytokines dans la pathogénèse de la RHM. Nous avons choisi d'étudier l'expression des gènes des cytokines par RT-PCR car il s'agit d'une méthode de choix pour la quantification d'ARNm rares. Le modèle utilisé fut l'implantation de microcapsules dans les coussins graisseux épидидymaires (CGE) de rats Wistar. Cependant, les résultats d'études préliminaires ont montré que la mise au point d'une méthode de RT-PCR à l'aide de ce modèle présentait des difficultés particulières: 1)- la présence des microcapsules dans les CGE étudiés provoquait une interférence au niveau de la réaction de RT-PCR et 2)- la forte proportion de lipides interférait dans la procédure d'isolement de l'ARN total. Une méthode de digestion enzymatique des CGE a donc été développée pour permettre la séparation des microcapsules, des cellules adipeuses et des cellules impliquées dans la RHM. Ainsi, la réaction de RT-PCR a pu être effectuée, sans interférence de la part des microcapsules, à partir de l'ARN total des cellules isolées.

Cette technique a permis d'isoler, d'identifier et de quantifier les différentes populations cellulaires impliquées dans la RHM. Ainsi, des décomptes cellulaires, effectués sur une fraction des cellules isolées, 14 jours après-implantation de microcapsules dans les CGE, ont permis d'observer l'augmentation significative de la proportion des macrophages, éosinophiles, neutrophiles et lymphocytes. De plus, à l'aide des conditions optimales de réaction, une différence significative dans l'expression relative du TGF- β_1 , entre des cellules provenant des CGE implantés et des cellules des CGE contrôles ($p < 0,01$), a pu être observée.

La méthode développée pourra être utilisée pour étudier le rôle des autres cytokines impliquées et définir les mécanismes de la RHM. La compréhension de ces mécanismes est essentielle pour la conception de méthodes pour l'évaluation, la sélection et le développement de matériaux plus biocompatibles ou pour concevoir des traitements, locaux ou systémiques, pour contrôler la réaction péri capsulaire.

Mots clés: microcapsules, biocompatibilité, réaction de l'hôte, RT-PCR, TGF- β_1

Table des matières

Sommaire	iii
Liste des sigles et abréviations	vii
Dédicace	ix
Remerciements	x
1- Introduction	1
1.1- Diabète de type 1	1
1.1.1- Étiologie du diabète de type 1	1
1.1.1.1- Auto-immunité	2
1.1.2- Complications du diabète de type 1	3
1.1.2.1- Complications aiguës du diabète de type 1	3
1.1.2.2- Complications chroniques du diabète de type 1	3
1.1.2.2.1- Hyperglycémie comme facteur de risque dominant	3
1.1.2.2.2- Hyperglycémie et autres facteurs de risque	4
1.1.2.3- Contrôle métabolique de la glycémie et prévention des complications	5
1.2- Traitements du diabète de type 1	5
1.2.1- Insulinothérapie	5
1.2.2- Pancréas artificiel	7
1.2.3- Transplantation de pancréas	8
1.2.4- Transplantation d'îlots de Langerhans	9
1.2.4.1- Autogreffe d'îlots de Langerhans	10
1.2.4.2- Allogreffe d'îlots de Langerhans	10
1.2.4.3- Xénogreffe d'îlots de Langerhans	11
1.2.4.4- Rejet et récurrence du processus auto-immun	11
1.3- Immunoprotection	12
1.3.1- Immunosuppression	12
1.3.2- Immunoaltération	13
1.3.3- Induction de la tolérance	13
1.3.4- Immunoisolation	13
1.4- Pancréas endocrine bioartificiel	14

1.4.1- Dispositifs vasculaires	14
1.4.2- Chambres de diffusion	14
1.4.3- Capsules biologiques	15
1.4.4- Microcapsules	15
1.5- Biocompatibilité des îlots microencapsulés	17
1.5.1- Définitions et généralités	17
1.5.2- Réaction de l'hôte contre les microcapsules (RHM)	18
1.5.2.1- Mécanismes	18
1.5.2.1.1- Réaction contre un corps étranger	18
1.5.2.1.2- Réaction humorale	19
1.5.2.1.3- Mécanismes de la mort du greffon	20
1.5.2.2- Composantes des microcapsules impliquées dans la RHM	21
1.5.2.3- Évaluation <i>in vitro</i> de la biocompatibilité des microcapsules	21
1.5.3- Fibrose	21
1.5.3.1- Pathogénèse de la fibrose	22
1.5.3.2- Modèles de fibrose	22
1.5.3.2.1- Granulome	22
1.5.3.2.2- Cicatrisation	23
1.5.4- Cytokines	23
1.5.4.1- Cytokines inflammatoires	24
1.5.4.2- Cytokines fibrogéniques	24
1.5.4.3- Cytokines anti-fibrogéniques	25
1.6- Objectifs	26
1.6.1- Objectif général	26
1.6.2- Objectifs spécifiques	26
2- “Alginate-poly-l-lysine microcapsule biocompatibility: a novel RT-PCR method for cytokine gene expression analysis in pericapsular infiltrates”	27
3- Discussion	55
4- Conclusions	60
Bibliographie	61
Annexe	xi

Liste des sigles et abréviations

°:	Degré
>:	Plus grand que
<:	Plus petit que
%:	Pourcentage
ACV:	Accidents cérébraux-vasculaires
ADN:	Acide désoxyribonucléique
ADNc:	Acide désoxyribonucléique complémentaire
APA:	Alginate-poly-L-lysine-alginate
ARN:	Acide ribonucléique
ARNm:	Acide ribonucléique messenger
BB, rat	“Bio Breeding rat” (modèle de diabète auto-immun)
C:	Celsius
CD:	“Cluster of differentiation” (classe de différenciation)
CGE:	Coussins graisseux épидидymaires
CSII:	“Continuous subcutaneous insulin infusion”
Da:	Dalton
DCCT:	“Diabetes Control and Complications Trial”
DR:	Sous-région D des gènes HLA de classe II
ELISA:	“Enzyme-linked immunosorbant assay”
etc.:	Et cetera
FGF:	“Fibroblast growth factor” (facteur de croissance des fibroblastes)
G:	Monomère d’acide guluronique
GAD:	Acide glutamique décarboxylase
GAPDH:	Glycéraldéhyde 3-phosphate déhydrogénase
GRO:	“Growth-regulated oncogene”
HbA _{1c} :	Hémoglobine glycosylée A _{1c}
Hg:	Mercure
HLA:	“Human leukocyte antigens” (complexe majeur d’histocompatibilité humain)
IFN:	Interféron

IL:	Interleukine
L:	Litre
Lys:	Lysine
M:	Monomère d'acide mannuronique
MCP:	"Monocyte chemotactic protein"
MIP:	"Macrophage inflammatory protein"
µm:	Micromètre
mm:	Millimètre
mmol:	Millimole
nm:	Nanomètre
NO:	Monoxyde d'azote
NOD, souris:	"Non Obese Diabetes mice" (modèle de diabète auto-immun)
NPH, insuline:	"Neutral protamin Hagedorn insulin"
PCR:	"Polymerase chain reaction" (réaction d'amplification en chaîne)
PDGF:	"Platelet-derived growth factor" (facteur de croissance dérivé des plaquettes)
PLL:	Poly-L-lysine
Pro:	Proline
RANTES:	"Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted"
RHM:	Réaction de l'hôte contre les microcapsules
RPA:	"Ribonuclease protection assay" (technique de protection contre les ribonucléases)
RT:	"Reverse transcription" (réaction de transcription inverse)
<i>scid</i> , souris:	"Severe combined immunodeficiency mice"
STZ:	Streptozotocine
TCR:	"T cell receptor" (récepteurs d'antigène des lymphocytes T)
TGF:	"Transforming growth factor" (facteur de croissance transformant)
Th:	"T helper" (cellule T-auxiliaire)
TNF:	"Tumor necrosis factor" facteur nécrosant les tumeurs)
UKPDS:	"United Kingdom Prospective Diabetes Study"
USD:	Dollar des États-Unis

À la mémoire de Robert Robitaille (1931-1998)

Papa, tu as été pour moi le plus bel exemple de courage.

Je suis très fier d'être ton fils.

Remerciements

Je tiens à remercier premièrement et sincèrement mon directeur scientifique, le Dr Jean-Pierre Hallé, pour m'avoir permis d'entreprendre ce stage de maîtrise dans son laboratoire. Le Dr Hallé m'a initié à la démarche scientifique en m'apportant la profondeur et la rigueur essentielles à cette démarche. De plus, ses précieux conseils, ses grandes connaissances, sa vaste expérience et son sens critique aiguisé ont grandement aidé à la réalisation de ce travail et à faire de moi un meilleur chercheur.

Je veux remercier également Nathalie Henley, coordinatrice du laboratoire, et le Dr François Leblond, du Centre de Recherche Guy-Bernier, d'avoir pris le temps de m'initier au travail en laboratoire. De plus, leurs nombreux conseils et nombreuses critiques m'ont beaucoup aidé et continueront à m'aider dans mes expériences futures.

Je tiens à souligner la grande contribution du Dr Gérald J. Prud'homme, de l'Université McGill, et du Dr Elliot Drobetsky, du Centre de Recherche Guy-Bernier. Ce sont eux, grâce à leur vaste expérience et nombreux conseils, qui m'ont initié au monde de la biologie moléculaire.

Je veux remercier l'Association Diabète Québec pour m'avoir accordé un soutien financier. Les bourses d'été se seront avérées essentielles pour la poursuite de mes études et la réalisation de ce travail.

Je réserve un merci spécial à mes parents, Robert et Denise, ainsi qu'à mes deux soeurs, Isabelle et Myriam. Ils ont été pour moi le meilleur exemple de courage et de persévérance. Ils m'ont toujours épaulé et encouragé à poursuivre des études universitaires. Leur soutien a été pour moi un atout important dans la réussite de mes objectifs.

Finalement, je remercie ma conjointe, Sabrina, de m'avoir supporté financièrement et moralement depuis le début de notre vie commune. Elle a partagé mes joies, mes peines, mes succès et mes échecs. De plus, elle m'a apporté beaucoup d'affection et de réconfort et m'a toujours encouragé à persévérer. C'est grâce à elle que j'ai continué jusqu'au bout.

1- Introduction

1.1- Diabète de type 1

Le diabète est après le cancer et l'artériosclérose, la plus grande cause de morbidité dans les pays industrialisés (Bach, 1989). En 1997, 2,1 % (124 millions) de la population mondiale est atteinte de diabète et la projection pour l'an 2010 est de plus de 3 % (Amos, 1997). En Amérique du Nord, en 1997, la proportion de la population atteinte de diabète est de 4,4 % (Amos, 1997). Aux États-Unis, les dépenses reliées au traitement des patients diabétiques ont atteint 77,7 milliards USD soit 12,6 % du budget national de santé (American Diabetes Association, 1998).

Le diabète se manifeste par l'incapacité de maintenir une glycémie à jeun inférieure à 7,0 mmol/L. La forme la plus grave est le diabète de type 1, antérieurement appelé diabète insulino-dépendant, diabète juvénile ou diabète maigre. Le diabète de type 1 survient en général avant 40 ans, et souvent chez l'enfant entre 8 et 12 ans. En 1997, 2,9 % (3,5 millions) de la population diabétique mondiale est atteinte de diabète de type 1 (Amos, 1997). En Amérique du Nord, la proportion de la population diabétique atteinte de diabète de type 1 est de 6,6 % (Amos, 1997). Les symptômes cliniques sont nombreux: l'individu urine abondamment, boit et mange plus que de coutume, maigrit et ressent une intense fatigue. Le diabète de type 1 est la conséquence d'une longue et lente destruction des cellules bêta du pancréas, sécrétrices d'insuline et regroupées en amas nommés îlots de Langerhans.

1.1.1- Étiologie du diabète de type 1

Le diabète de type 1 est une maladie multifactorielle émanant de l'association de facteurs génétiques multiples et de facteurs environnementaux (Bach, 1997). La susceptibilité génétique sert de terrain de base sur lequel des agents environnementaux peuvent induire la maladie (Tomer, 1997).

1.1.1.1- Auto-immunité

L'étiologie auto-immune de la maladie est suggérée par plusieurs évidences:

1)- l'infiltration des îlots de Langerhans de patients et d'animaux diabétiques par des lymphocytes T et des macrophages (Bottazzo, 1984; Bottazzo, 1985; Bach, 1994). Les cellules CD4 apparaissent en premier et sont nécessaires à la migration des cellules CD8 (Thivolet, 1991). Les cellules CD4 synthétisent des cytokines de type Th-1 qui induisent une inflammation locale avec production de monoxyde d'azote (NO) (Bendtzen, 1986; O'Reilly, 1991; Kroncke, 1993). **2)**- La détection d'anticorps anti-îlots (Bottazzo, 1974) et de lymphocytes T spécifiques aux îlots de Langerhans chez 80 % des patients atteints de diabète de type 1 (Cahill, 1981). Les diabétiques produisent des auto-anticorps dirigés contre l'acide glutamique décarboxylase (GAD) (Baekkeskov, 1990), la tyrosine phosphatase IA-2 (Bonifacio, 1995), l'insuline et les gangliosides. **3)**- Le diabète est prévenu par des traitements inactivant sélectivement les cellules T. Ainsi, l'ablation du thymus à la naissance chez le rat BB (Like, 1982), un modèle de diabète auto-immun, l'administration de cyclosporine (Bougnères, 1982; Laupacis, 1983; Feutren, 1986), d'anticorps anti-TCR, anti-CD4 et anti-CD8 chez la souris NOD (Hutchings, 1992; Chatenoud, 1994), un autre modèle de diabète auto-immun, préviennent ou renversent le diabète. De plus, des souris *scid* qui sont immunoincompétentes ou sévèrement immunodéficientes ne deviennent pas diabétiques (Christianson, 1993). **4)**- L'injection à une souris saine, d'un nombre limité de lymphocytes T purifiés à partir de cellules spléniques d'une souris diabétique provoque l'apparition du diabète (transfert passif) (Bendelac, 1987). Chez l'humain, le diabète de type 1 peut être transmis à des patients ayant reçus une greffe de moelle osseuse provenant d'un donneur diabétique (Lampeter, 1993; Vialettes, 1993). **5)**- L'association génétique du diabète de type 1 et la présence de marqueurs HLA. Ainsi, il existe une association entre la maladie et les antigènes HLA B8 (Singal, 1973), DR3, DR4 (Spielman, 1980; Nerup, 1987) mais pas avec DR15 (Kockum, 1993). De plus, lorsqu'en position 57 d'un antigène HLA on retrouve un acide aspartique sur les deux allèles, il n'y a pas de diabète (Todd, 1987). Il faut mentionner qu'il existe d'autres marqueurs, hors de la région HLA, qui sont associés de façon génétiquement positive avec le développement de la maladie (Bell, 1984; Davies, 1994).

Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer le déclenchement de l'expression anormale des peptides immunogéniques: **1)-** infection virale (Adams, 1987); **2)-** exposition à un agent toxique (Campbell, 1988); **3)-** dérégulation ou perturbation de la fonction des lymphocytes T suppresseurs (qui protègent contre le diabète) (Yasunami, 1988; Boitard, 1989; Dardenne, 1989) et **4)-** facteurs modulant l'expression de gènes contrôlant l'apoptose des lymphocytes (Garchon, 1994).

1.1.2- Complications du diabète de type 1

1.1.2.1- Complications aiguës du diabète de type 1

Les complications aiguës du diabète de type 1 sont: **1)-** l'acidification du sang ou acidose, provoquée par l'absence d'insuline qui stimule la lipolyse entraînant une augmentation de la production des corps cétoniques responsables de l'acidification du sang; **2)-** l'état hyperosmolaire; **3)-** l'état hyperglycémique et **4)-** les infections. L'acidose et l'état hyperosmolaire peuvent provoquer un coma dont l'issue peut être fatale (Krane, 1985). Cependant, les thérapies actuelles sont satisfaisantes pour la prévention et le traitement de ce type de complications.

1.1.2.2- Complications chroniques du diabète de type 1

En absence d'insuline, le glucose se retrouve en excès dans le sang et s'accumule de façon anormale dans différents tissus. Ce phénomène entraîne, à long terme, des complications dites dégénératives ou chroniques. L'hyperglycémie prolongée peut être un facteur dominant dans le développement des complications chroniques ou être en association avec d'autres facteurs de risque.

1.1.2.2.1- Hyperglycémie comme facteur de risque dominant

Les complications où l'hyperglycémie prolongée est un facteur presque exclusivement dominant sont: **1)-** les microangiopathies et **2)-** la polyneuropathie. Les microangiopathies sont très importantes et impliquent des changements spécifiques aux diabétiques. Le risque

de développer une rétinopathie est 50 fois plus élevé chez les diabétique que chez la population normale (Aiello, 1996). La néphropathie diabétique est la cause première d'insuffisance rénale chronique au monde (Friedman, 1996). La polyneuropathie, complication la plus fréquente, est caractérisée par des atteintes distales et périphériques du système nerveux (Harati, 1996). L'hyperglycémie est directement responsable de plusieurs autres complications neurologiques, dont les mononévrites et les accidents cérébraux-vasculaires (ACV; section 1.1.2.2.2), et autres complications oculaires, comme les cataractes et les glaucomes.

1.1.2.2.2- Hyperglycémie et autres facteurs de risque

Les complications où l'hyperglycémie prolongée est associée à d'autres facteurs de risque sont: **1)-** les macroangiopathies, **2)-** les déficits neurologiques, **3)-** les maladies de la peau et **4)-** les maladies du tissu conjonctif interstitiel. Les maladies coronariennes qui conduisent à l'infarctus et à l'insuffisance cardiaque (Arauz-Pacheco, 1996), les ACV (Harati, 1996), les maladies vasculaires des extrémités inférieures, qui provoquent des lésions aux pieds pouvant aller jusqu'à la gangrène et l'amputation des membres inférieurs (Levin, 1996; LoGerfo, 1996), et l'hypertension, observée 2 fois plus fréquemment chez les diabétique que chez les individus normaux (Arauz-Pacheco, 1996), sont toutes des macroangiopathies qui jouent un rôle important dans la morbidité et la mortalité des patients diabétiques. Le diabète est une maladie systémique qui affecte le système nerveux central, le système nerveux périphérique ainsi que toutes les structures associées à ceux-ci (Harati, 1996). Ce déficit peut provoquer des entéropathies (dysphagie, brûlures d'estomac, nausées, douleurs abdominales, constipation, diarrhée et incontinence fécale) (Camilleri, 1996) et une dysfonction sexuelle (Hakim, 1996). Les manifestations du diabète au niveau de la peau sont nombreuses et affectent une majorité sinon tous les diabétiques (Sibbald, 1996). Les diabétiques sont aussi sujets aux problèmes d'articulation, d'ossature et de tissu périarticulaire (Rosenbloom, 1996). Ces complications peuvent réduire la qualité de la vie et abrégé la vie des patients diabétiques.

1.1.2.3- Contrôle métabolique de la glycémie et prévention des complications

Le but ultime des traitements du diabète est de reproduire le plus fidèlement possible la sécrétion physiologique d'insuline de façon à restaurer le contrôle métabolique de la glycémie et de prévenir les complications aiguës et chronique du diabète. Les résultats du DCCT (Diabetes Control and Complications Trial) ont démontré que l'insulinothérapie intensive (> 3 injections d'insuline par jour; > 4 mesures de glycémie par jour; régimes alimentaires et d'exercices contrôlés) ne peut pas normaliser la glycémie. Cependant, elle permet d'améliorer le contrôle glycémique et de retarder l'apparition des complications à long terme (DCCT Research Group, 1993; Tamborlane, 1997).

Les résultats de l'UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study), une étude échelonnée sur 20 ans et regroupant 5102 patients, ont clairement démontré l'effet bénéfique du contrôle intensif (polypharmaco-thérapie) de l'hypertension et de l'hyperglycémie sur les complications microvasculaires, alors que l'effet sur les complications macrovasculaires est moindre. Ainsi, une baisse de la pression artérielle de 10 mm Hg a provoqué une réduction de 32 % des morts liées au diabète, une réduction de 44 % des infarctus ainsi qu'une réduction de 37 % des microangiopathies (UKPDS Group, 1998b, d). Une baisse de 1 % du taux HbA_{1c} a provoqué une réduction importante de 25 % des complications microvasculaires (surtout au niveau des rétinopathies avec une baisse de 21 %, et des néphropathies avec une baisse de 34 %) (UKPDS Group, 1998a, c). Cependant, ces traitements intensifs ne font que ralentir la progression de la maladie et retarder l'apparition des complications.

1.2- Traitements du diabète de type 1

1.2.1- Insulinothérapie

Les diabétiques de type 1 furent traités uniquement par des insulines d'origine animale (porc et boeuf) jusqu'en 1982 (Burge, 1997). La séquence en acides aminés des insulines de porc et de boeuf est très proche de la séquence humaine. Ces insulines sont absorbées dans

la circulation après injection sous-cutanée et fournissent un contrôle glycémique raisonnable. Cependant, plusieurs limitations existaient, de la réaction allergique jusqu'à la production d'anticorps anti-insuline, et altéraient la biodisponibilité de l'insuline (Chance, 1976; Davidson, 1978).

Au début des années 1980, les insulines humaines biosynthétiques, produites grâce au raffinement des techniques de génie génétique, firent leur apparition (Burge, 1997). L'insuline humaine est plus hydrosoluble et est, par conséquent, absorbée plus rapidement (Heinemann, 1993). L'effet physiologique de l'insuline régulière (à courte durée d'action), commence 30 à 60 minutes après l'injection sous-cutanée, atteint un maximum 2 à 4 heures après l'injection et possède une durée de 6 à 8 heures (Heinemann, 1993). L'action des insulines NPH et lente (durée d'action intermédiaire) commence 1 à 3 heures après l'injection, atteint un maximum 4 à 8 heures après l'injection et a une durée de 13 à 20 heures (Starke, 1989). L'insuline ultralente (action de longue durée) possède un effet physiologique qui commence 2 à 4 heures après l'injection, atteint un maximum 8 à 10 heures après l'injection et dure 18 à 20 heures (Heinemann, 1993). La pratique de mélanger l'insuline régulière à l'insuline NPH ou ultralente est courante car elle réduit le nombre d'injections nécessaire au cours d'une journée (Burge, 1997). L'insuline humaine est aussi immunogénique (à un degré moindre que l'insuline animale) à cause de la présence de protamine et de zinc dans les préparations et la formation d'agrégats dans les tissus sous-cutanés après l'injection (Schernthaner, 1993).

Des analogues de l'insuline à courte et à longue durée d'action ont été développés dans le but d'améliorer le processus d'absorption (Barnett, 1997). L'insuline lispro (la Pro B28 et la Lys B29 de l'insuline humaine sont inversées) possède une auto-association réduite qui lui permet d'être absorbée plus rapidement. Son action commence 5 à 15 minutes après l'injection, atteint un maximum 1 à 2 heures après l'injection et dure 4 à 5 heures (Howey, 1994). D'autres analogues à action rapide, comme l'insuline aspart, font l'objet d'études cliniques. Des analogues d'insuline à action de longue durée, comme l'insuline HOE 901, sont en développement dans le but de fournir un niveau basal d'insuline plus stable et prolongé, ainsi qu'une absorption moins variable (Burge, 1997).

La structure de l'insuline nécessite une voie d'administration qui court-circuite l'appareil gastro-intestinal (Burge, 1997). L'injection sous-cutanée est présentement la voie d'administration. Des alternatives sont à l'étude: **1)**- injecteur à pression ou "jet injector" (Lindmayer, 1986); **2)**- administration intranasale; **3)**- intrapulmonaire et **4)**- orale avec un enrobage pour éviter la digestion dans l'estomac (Saudek, 1993, 1997; Burge, 1997).

De nos jours, l'insulinothérapie est individualisée, flexible et adaptée au style de vie du patient dans le but d'atteindre des objectifs métaboliques précis (Franz, 1997; Skyler, 1997).

1.2.2- Pancréas artificiel

Le pancréas artificiel possède 3 composantes: **1)**- une pompe à insuline pour entreposer et distribuer l'insuline; **2)**- un détecteur de glucose pour ajuster les niveaux d'insuline en fonction de la glycémie et **3)**- un dispositif de contrôle qui calcule les doses et qui ordonne la sécrétion d'insuline (Jaremko, 1998). Certains appareils déjà commercialisés ne possèdent que la première composante, soit la pompe à insuline.

Les pompes externes pour infusion d'insuline (CSII), administrent l'insuline de façon continue (Savinetti-Rose, 1997). Les niveaux de base d'insuline ne s'estompent pas et le patient peut décider en tout temps d'ajuster l'infusion et de s'administrer en bolus une quantité accrue d'unités d'insuline (en prévision d'un repas par exemple) (Saudek, 1993). Cependant, certains désavantages sont associés avec cette thérapie: **1)**- formations d'abcès causées par les changements fréquents d'aiguilles; **2)**- fuites occasionnelles de la tubulure; **3)**- dérèglements électroniques occasionnels et **4)**- coûts élevés (Saudek, 1993). Ces pompes peuvent également être implantées (Blackshear, 1979). Les risques d'infection sont réduits et le besoin de changer l'aiguille et la tubulure est éliminé. L'inconfort associé avec la pompe extérieure est absent. De plus, l'absorption de l'insuline se fait directement dans le système porte-hépatique (Duckworth, 1992) ou dans la cavité intrapéritonéale. Cependant, bien que le problème de fiabilité des pompes a été résolu, la tubulure peut s'obstruer et affecter le rendement de l'appareil. De plus, le patient s'expose à une chirurgie et aux coûts élevés reliés à cette méthode (Saudek, 1993). L'inconvénient majeur demeure l'absence de système de rétroaction. Finalement, aucune étude n'a démontré que l'utilisation de ces pompes est

plus efficace que l'insulinothérapie par injections multiples.

Le détecteur de glucose est un appareil qui mesure la glycémie automatiquement et en continu. Des détecteurs de type enzymatiques, qui consistent en une enzyme immobilisée (glucose oxydase) et une interface reliée à un transducteur électronique, sont en développement (Shults, 1994; Jaremko, 1998). Les problèmes majeurs à régler sont la biocompatibilité et la fiabilité de ces détecteurs. Des détecteurs optiques, qui ne nécessitent pas de chirurgie, sont aussi à l'étude (Arnold, 1996; Jaremko, 1998). Ils mesurent l'absorption du glucose entre 700 et 1300 nm à travers les vaisseaux sanguins du doigt. Le problème réside dans l'interférence de plusieurs substances, qui absorbent aux mêmes longueurs d'onde, lors du dosage du glucose. D'autres types de détecteurs, qui font appel à la microdialyse sous-cutanée et à l'extraction du glucose à partir de l'avant-bras, sont aussi en développement (Sternberg, 1995; Tamada, 1995).

Un système de contrôle miniature, implantable et capable d'interpréter les données du détecteur est en conception (Brunetti, 1993). Ce système devra opérer correctement, en tout temps, pour ordonner à la pompe de libérer la bonne quantité d'insuline pour éviter les épisodes d'hyper et d'hypoglycémie.

1.2.3- Transplantation de pancréas

La transplantation de pancréas est la seule thérapie du diabète de type 1 qui rétablit la normoglycémie, la sécrétion d'insuline et qui maintient la normoglycémie sur plusieurs années (Kendall, 1997). Au 31 décembre 1996, 9012 transplantations de pancréas ont été effectuées à travers le monde (Gruessner, 1998). La survie des patients, 1 an après la transplantation simultanée pancréas-rein, 1 an après la transplantation rénale suivie d'une transplantation du pancréas et 1 an après la transplantation du pancréas seul, est de 94, 95 et 93 % respectivement (Gruessner, 1998). Dans le même ordre, la survie du greffon est de 82, 70 et 74 % (Gruessner, 1998).

La transplantation du pancréas nécessite une chirurgie majeure. Deux types de drainage des sécrétions sont utilisés: **1)**- drainage dans la vessie et **2)**- drainage entérique. La

mortalité et la morbidité à court terme sont associées aux complications de la chirurgie (Eisenbarth, 1996). Le risque élevé de rejet et de la récurrence du processus auto-immun font en sorte que l'emploi d'immunosuppresseurs est essentiel (Sutherland, 1984). Bien que de nouveaux immunosuppresseurs soient utilisés, les risques associés aux effets secondaires de l'immunosuppression demeurent significatifs (Kendall, 1997). De plus, certains immunosuppresseurs (corticostéroïdes) augmentent la résistance à l'insuline, alors que d'autres (tacrolimus, cyclosporine, azathioprine) diminuent la sécrétion d'insuline. Donc, la transplantation de pancréas est presque exclusivement réservée aux diabétiques en attente d'une greffe rénale (Kendall, 1997). Aucune donnée ne démontre, sans équivoque, que la procédure retarde le développement ou la progression des complications secondaires au diabète (Kendall, 1997). Finalement, le manque de donneurs est un obstacle important à l'application à grande échelle de ce traitement.

1.2.4- Transplantation d'îlots de Langerhans

La transplantation d'îlots de Langerhans est une alternative à la transplantation de pancréas. Plusieurs avantages apparents y sont associés: **1)**- la taille réduite de l'implant permet une chirurgie mineure et l'accès à de nouveaux sites de transplantation (Calafiore, 1997); **2)**- elle permet l'utilisation des techniques d'immunoprotection (section 1.3); **3)**- elle permet de réduire la dose d'immunosuppresseurs et **4)**- elle permet l'utilisation de la cryopréservation qui donne accès à des banques de tissus et réduit le problème du manque de donneurs (Calafiore, 1997). La technique d'isolement d'îlots fait appel à la digestion du tissu pancréatique à l'aide de la collagénase et la purification via un gradient de séparation (Lacy, 1967). De nos jours des appareils automatisés facilitent l'isolement. Plusieurs sites de transplantation peuvent être utilisés, mais l'infusion des îlots dans le foie via l'injection dans la veine porte est la technique la plus utilisée (Farney, 1991; Gores, 1993).

Cependant, le taux de succès est très faible et, contrairement à la transplantation de pancréas, le greffon fonctionne rarement plus d'un an (Eisenbarth, 1996). Plusieurs hypothèses sont émises pour expliquer ce phénomène: **1)**- les îlots sont plus vulnérables qu'un organe entier dans les périodes pré et post-implantation (Davalli, 1996); **2)**- la perte

de contact physique entre les îlots et le tissu exocrine perturbe l'axe exocrine-endocrine et prive l'îlot de facteurs biologiques importants pour sa survie (Williams, 1985); **3)**- le rejet et la récurrence du processus auto-immun (Remuzzi, 1994) et **4)**- l'îlot est plus vulnérable aux effets toxiques de l'immunosuppression.

1.2.4.1- Autogreffe d'îlots de Langerhans

L'excellent taux de succès de l'autotransplantation d'îlots contraste avec celui de l'allogreffe. Ainsi, l'autogreffe d'îlots chez des patients pancréatectomisés pour des pancréatites chroniques, a permis d'éliminer ou de réduire le diabète. L'autotransplantation d'îlots non-purifiés dans le foie préserve la sécrétion phasique de l'insuline en réponse au glucose, la réponse insulémique à l'arginine, la glycémie normale ainsi que les niveaux HbA_{1c} normaux et ce pour une période allant jusqu'à 7 ans (Pyzdrowski, 1992). Le nombre minimal d'îlots nécessaire pour réussir une transplantation est estimé à 300 000. Ainsi, 60 % des individus ayant reçu plus de 300 000 îlots ont atteint l'insulino-indépendance (Wahoff, 1995). Bien que la qualité de la sécrétion d'insuline soit normale, la quantité est réduite par rapport aux individus normaux et diminue avec le temps (Pyzdrowski, 1992). Les risques d'hyperglycémie en conditions basales ou lors d'un stress demeurent présents.

1.2.4.2- Allogreffe d'îlots de Langerhans

Au début de 1996, seulement 10 % des patients ayant reçu une allogreffe d'îlots (> 600 000 îlots) sont devenus insulino-indépendants (Calafiore, 1997). La majorité des patients ne l'est jamais devenue et requiert un traitement, réduit ou non, en insuline (Calafiore, 1997). Chez les patients insulino-indépendants allogreffés, des anomalies dans la glycémie et la sécrétion d'insuline sont souvent présentes. De plus, à cause du besoin d'une immunosuppression générale, l'allogreffe d'îlots, tout comme la transplantation de pancréas total, est presque exclusivement réservée aux patients en attente d'une autre greffe. Cependant, une allogreffe a permis, à une patiente souffrant de diabète de type 1, de retrouver l'insulino-indépendance pour une période de 2,5 ans (Warnock, 1991).

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer les échecs de l'allogreffe: **1)**- l'alloimmunité

(Khalil, 1996; Calafiore, 1997); **2)**- la récurrence du processus auto-immun (Khalil, 1996; Calafiore, 1997) et **3)**- une réponse inflammatoire non-spécifique induite lors de l'implantation (Khalil, 1996).

1.2.4.3- Xénogreffe d'îlots de Langerhans

L'utilisation d'îlots d'origine animale, dans le cadre d'une xénogreffe, pourrait pallier le problème du manque de donneurs. Avant de réaliser une xénogreffe, il faut s'assurer de l'activité de l'insuline animale chez l'humain. Les îlots canins et porcins pourraient être utilisés car leurs insulines ne diffèrent de l'insuline humaine que par 1 acide aminé. De plus, la transmission de micro-organismes et les risques de zoonose doivent être réduits au minimum.

La xénogreffe, de par sa nature, est rejetée de façon aiguë par des mécanismes différents (anticorps anti-îlots préformés) des mécanismes sous-jacents au rejet d'une allogreffe (Hammer, 1992). Même avec des traitements d'immunosuppression, les succès sont transitoires. Ainsi, suite à une xénogreffe d'îlots de porc, une amélioration de l'état diabétique de rats, traités à la streptozotocine et sous un régime d'immunosuppression, a été observée pendant 5 jours (Inoue, 1992). Finalement, plusieurs progrès devront être réalisés dans le domaine de l'immunoprotection avant que l'on puisse envisager l'utilisation de la xénogreffe.

1.2.4.4- Rejet et récurrence du processus auto-immun

Les mécanismes du rejet sont différents selon que l'on soit dans un contexte d'allo ou de xénogreffe. De plus, la récurrence du processus auto-immun fait aussi appel à des mécanismes différents de ceux du rejet. Ainsi, la transplantation d'une portion d'un pancréas, d'un jumeau homozygote sain à son jumeau diabétique, a permis de démontrer que l'auto-immunité persiste dans le temps, puisque les cellules bêta du greffon ont été sélectivement détruites. Des clones de cellules T de souris NOD, capables de reconnaître l'insuline, détruisent les cellules bêta d'îlots de rats transplantés dans des souris immunodéficientes. Dans le cadre d'allotransplantation, des îlots appariés pour tous les

antigènes majeurs du complexe d'histocompatibilité, mais incompatibles pour les antigènes mineurs, sont rejetés. Ainsi, l'échec de la transplantation d'îlots peut être expliqué par des phénomènes, encore inconnus, reliés à l'alloimmunité et à l'auto-immunité. Pour la réussite à court terme de la transplantation d'îlots, beaucoup d'efforts sont investis dans les techniques d'immunoprotection.

1.3- Immunoprotection

Le but ultime de la transplantation d'îlots est de réussir l'implantation de tissus avec un minimum d'immunosuppression non-spécifique. La transplantation cellulaire, d'îlots de Langerhans par exemple, se prête bien à l'utilisation de stratégies pour protéger le greffon contre le système immunitaire du receveur.

1.3.1- Immunosuppression

L'efficacité des immunosuppresseurs lors des transplantations d'organes est bien reconnue. Ils agissent en supprimant l'activité immunitaire de l'hôte. Ces agents entraînent cependant des effets secondaires au niveau du rein, du foie et du pancréas (Duncan, 1988; Leonard, 1989; Whiting, 1991). De plus, les patients immunosupprimés sont beaucoup plus sensibles aux infections.

Certains immunosuppresseurs, tel la cyclosporine, l'azathioprine, le tacrolimus, le FK506 et la rapamycine sont toxiques pour les îlots et diminuent la sécrétion d'insuline (Ricordi, 1991; Whiting, 1991). D'autres comme les glucocorticoïdes augmentent la résistance à l'insuline (Rilo, 1994). De nouveaux immunosuppresseurs, comme la 15-déoxyspergualine, n'ont pas d'effets néfastes sur la fonction des îlots (Xenos, 1993).

Avant de recourir à la transplantation de pancréas total et d'îlots, qui nécessitent la prise d'immunosuppresseurs, ou d'employer des immunosuppresseurs pour traiter le diabète, il faut s'assurer que les complications secondaires à la maladie sont ou seront plus importantes que les complications reliées à la thérapie immunosuppressive.

1.3.2- Immunoaltération

L'immunoaltération consiste à atténuer l'immunogénicité des îlots avant la transplantation (Calafiore, 1997). Plusieurs moyens ont été utilisés pour réduire l'immunogénicité: **1)**- la culture à 22° C pendant 5 jours (Lacy, 1979); **2)**- la cryopréservation (Flesch, 1991); **3)**- l'irradiation aux rayons ultraviolets ou gamma (Lau, 1984; Hardy, 1991; Dellagiacom, 1992); **4)**- la culture à haute concentration d'oxygène (Bowen, 1980); **5)**- l'utilisation d'anticorps anti-antigènes de classe I ou II (Lacy, 1993; Faustman, 1994) et **6)**- masquer les molécules d'adhésion (Guymer, 1992). À ce jour, ces interventions se sont révélées efficaces chez les rongeurs. L'application chez les mammifères supérieurs peut être envisagée dans un avenir rapproché.

1.3.3- Induction de la tolérance

On peut induire chez l'hôte une tolérance au greffon et ainsi éviter les problèmes immunologiques de base associés à la transplantation d'organes ou de tissus. Quelques méthodes ont été utilisées à cette fin: **1)**- la préimmunisation par injection de splénocytes et d'îlots dans le thymus du receveur (Vojtiskova, 1968; Posselt, 1990; Qian, 1993) et **2)**- la création d'un microchimérisme par infusion périphérique de moelle osseuse du donneur (Ricordi, 1992; Fontes, 1994; Li, 1994). À ce jour, ces stratégies n'ont pas encore été testées chez des mammifères supérieurs.

1.3.4- Immunoisolation

Le principe de l'immunoisolation est de séparer les cellules transplantées de l'environnement immunologique hostile du receveur, par une membrane semi-perméable (Lanza, 1997). Les substances de petits poids moléculaires comme les nutriments, les électrolytes, l'oxygène et les agents biothérapeutiques (glucose, insuline, etc.) peuvent traverser la membrane, alors que les cellules immunitaires (Soon-Shiong, 1990a, b), les anticorps (Hallé, 1993), le complément (Darquy, 1985) et les autres effecteurs du rejet sont exclus.

Cette approche est la seule stratégie d'immunoprotection au stade des essais cliniques préliminaires dans l'allogreffe de pancréas chez des patients de type 1 non-immunosupprimés (Calafiore, 1997). Cependant, les faiblesses de l'immunoisolation sont: **1)-** la perte d'innervation et **2)-** de vascularisation qui diminuent la réponse insulinaire et **3)-** la difficulté de la mise au point de membranes totalement biocompatibles.

1.4- Pancréas endocrine bioartificiel

La plupart des travaux portant sur l'immunoisolation ont été effectués avec des îlots de Langerhans. Ainsi, la greffe de pancréas a donné naissance au terme pancréas endocrine bioartificiel (Reach, 1981). À ce jour, il existe 4 catégories de pancréas bioartificiels: **1)-** les dispositifs vasculaires; **2)-** les chambres de diffusion; **3)-** la capsule biologique et **4)-** les microcapsules.

1.4.1- Dispositifs vasculaires

Ces dispositifs utilisent une membrane tubulaire anastomosée directement au système vasculaire au moyen d'une dérivation entre une artère et une veine (Chick, 1975). Les îlots sont déposés dans une chambre qui entoure la membrane tubulaire. Le sang passe dans celle-ci et les échanges entre le sang et les îlots se font via la membrane semi-perméable. Ces dispositifs ont été utilisés avec succès lors d'allogreffes chez l'humain et lors de xénotransplantations chez le chien (Reach, 1981; Monaco, 1991; Colton, 1995). Un tel dispositif permet une oxygénation maximale des îlots.

Cependant, certains problèmes limitent le potentiel thérapeutique de cette approche: **1)-** la géométrie de l'appareil restreint la quantité d'îlots greffés (Colton, 1995; Lanza, 1997) et **2)-** les risques de thrombose sont élevés (Tze, 1976). De plus, la procédure d'implantation se fait lors d'une chirurgie majeure avec bris du système vasculaire.

1.4.2- Chambres de diffusion

Les chambres de diffusion ou macrocapsules peuvent être planaires (Jager, 1990;

Lanza, 1992c) ou tubulaires (Zekorn, 1990; Colton, 1991; Lanza, 1992b, d; Tze, 1994). Elles renferment une grande quantité d'îlots. Ces dispositifs sont généralement implantés en sous-cutané ou dans la cavité péritonéale. La grande taille des macrocapsules permet de les récupérer facilement. Les chambres de diffusion ont été utilisées avec succès chez des rats traités à la streptozotocine (STZ) et des rats BB, lors de xénogreffes d'îlots de porc, de chien et de boeuf (Lanza, 1992b, c). Des xénogreffes d'îlots chez la souris et chez le chien ont aussi été effectuées (Lacy, 1991; Lanza, 1992a).

Cependant plusieurs désavantages limitent l'utilisation courante de ces appareils: **1)**- la fragilité des chambres de diffusion (surtout du type tubulaire) (Lanza, 1997); **2)**- la déficience en oxygène et en éléments nutritifs causée par la grande distance de diffusion (Lanza, 1992d); **3)**- le choix restreint des sites de transplantation à cause de la taille des macrocapsules et **4)**- la bioincompatibilité (réaction à corps étranger et fibrose) (Woodward, 1982).

1.4.3- Capsules biologiques

L'encapsulation biologique des îlots de Langerhans consiste à utiliser du matériel biologique autologue comme membrane semi-perméable. La rationnelle derrière cette approche est de réduire l'inflammation et la réaction à corps étranger dirigées contre les membranes artificielles. Une barrière de cartilage composé de chondrocytes a permis la survie d'une xénogreffe d'îlots de rats dans une souris nude (Pollok, 1997). L'implantation d'un treillis métallique dans la cavité dorsale de rats, traités à la STZ, provoque la formation d'une capsule de collagène. Des îlots transplantés à l'intérieur de cette capsule ont permis la normalisation de la glycémie. Le concept d'encapsulation biologique est encore en développement (Valdes, 1998).

1.4.4- Microcapsules

Chang a été le premier à décrire l'immunoisolation par encapsulation de cellules dans des microcapsules sphériques (Chang, 1964). Le principe de la fabrication des microcapsules est simple; des gouttelettes d'une solution renfermant un polyélectrolyte faible sont

précipitées dans un bain renfermant un polyélectrolyte de charge opposée (Lim, 1980; Colton, 1995). Les microcapsules ont, en général, un diamètre de 500 à 1000 μm (Colton, 1991).

Sun a été le premier à démontrer le fonctionnement d'îlots microencapsulés lorsque transplantés chez des rongeurs traité à la STZ (Lim, 1980; O'Shea, 1986), des rats BB (Fan, 1990) et des souris NOD (Lum, 1991b). Des xénogreffes ont également été couronnées de succès (O'Shea, 1986; Fan, 1990; Lum, 1991b). Des allotransplantations ont permis de normaliser la glycémie chez des chiens immunosupprimés spontanément diabétiques (Soon-Shiong, 1992). L'insulino-indépendance a même été démontrée chez un patient diabétique de type 1 immunosupprimé ayant reçu une allogreffe d'îlots microencapsulés (provenant de 12 donneurs) (Soon-Shiong, 1994). Plus récemment, des xénogreffes d'îlots microencapsulés ont permis la normalisation de la glycémie, pour une durée moyenne de 10 mois, chez des singes *cynomologus* (Sun, 1996).

Différents matériaux ont été utilisés pour la fabrication des microcapsules: **1)**- l'agarose (Iwata, 1989); **2)**- le méthacrylate (Stevenson, 1988); **3)**- le chitosan (McKnight, 1988); **4)**- l'alginate de barium (Zekorn, 1992). Mais les microcapsules d'alginate-poly-L-lysine-alginate sont les plus utilisées et les mieux caractérisées.

Les avantages de la microencapsulation, comparativement aux autres méthodes d'immunoisolation, sont multiples: **1)**- augmentation de la viabilité des îlots grâce à une meilleure diffusion de l'oxygène et des nutriments (Dionne, 1989); **2)**- amélioration de la réponse insulinique au glucose (Chicheportiche, 1988) et **3)**- accroissement de la résistance comparativement aux chambres de diffusion à cause du petit volume des microcapsules. Cependant, la résistance structurale et la biocompatibilité à long terme restent à être démontrées. De plus, la petite taille des microcapsules limite la récupération suite à une dysfonction du greffon.

La taille des microcapsules est un facteur très important. À l'aide d'un générateur d'impulsions électrostatiques à haut voltage, des petites microcapsules d'un diamètre < 350 μm peuvent être produites (Hallé, 1992, 1994). La réduction du diamètre des

microcapsules comporte plusieurs avantages: **1)**- réduction du volume total de l'implant; **2)**- accès à de nouveaux sites de transplantation comme le foie (Leblond, 1999); **3)**- résistance améliorée; **4)**- biocompatibilité améliorée (Robitaille, 1999b); **5)**- meilleure diffusion de l'oxygène, du glucose, de l'insuline et des nutriments.

Notre laboratoire a développé plusieurs méthodes *in vivo* et *in vitro* afin d'évaluer et améliorer les caractéristiques des petites microcapsules: **1)**- méthode d'identification et de quantification des paramètres du générateur d'impulsions électrostatiques à haut voltage, qui affectent la taille des microcapsules (Hallé, 1994); **2)**- méthode d'évaluation de la perméabilité membranaire (Robitaille, 1999a); **3)**- méthode d'évaluation de la résistance mécanique (Leblond, 1996) et **4)**- méthode d'évaluation de la biocompatibilité (Pariseau, 1995).

1.5- Biocompatibilité des îlots microencapsulés

L'évaluation de la biocompatibilité varie d'un laboratoire à l'autre. Ainsi, certains auteurs sont convaincus de la biocompatibilité de leurs implants, bien que des photomicrographies démontrent clairement une accumulation de cellules en périphérie des capsules (Zekorn, 1996; Klock, 1997).

1.5.1- Définitions et généralités

Suite à la transplantation d'îlots microencapsulés, plusieurs chercheurs ont observé une réaction au pourtour des microcapsules ou réaction péri capsulaire (Ricker, 1986b; Lum, 1991a, 1992; Soon-Shiong, 1991). Plusieurs termes ont été utilisés pour définir ce phénomène. Le terme fibrose péri capsulaire est employé pour décrire le stade tardif de la réaction, caractérisé par la prolifération des fibroblastes et la synthèse des protéines de la matrice extracellulaire. Les termes infiltration cellulaire et infiltration cellulaire excessive sont utilisés lorsque la déposition de collagène est minimale et que l'accumulation des cellules du système immunitaire est prédominante. Nous avons choisi d'utiliser un terme plus général, pour définir la réaction péri capsulaire, soit la réaction de l'hôte contre les microcapsules (RHM).

1.5.2- Réaction de l'hôte contre les microcapsules (RHM)

La dysfonction du greffon est toujours associée au développement d'une réaction de l'hôte contre les microcapsules (RHM). Ainsi, plusieurs chercheurs ont observé une corrélation inverse entre l'intensité de la RHM et la survie des îlots microencapsulés lors de xénotransplantations dans des souris NOD (Ricker, 1986a; Darquy, 1990; Weber, 1990, 1994), des souris BALB/c et C57BL/6J traitées à la STZ (Darquy, 1990) et lors d'allotransplantations dans des rats BB (Mazaheri, 1991), des rats AO/G (Fritschy, 1991; Horcher, 1994; De Vos, 1996a, b) et Lewis traité à la STZ (Horcher, 1994). Sun décrit une réaction péricapsulaire sur tous les îlots microencapsulés provenant des sujets ayant connu une récurrence des épisodes d'hyperglycémie (Lum, 1992). De Vos a observé un seuil au-dessus duquel la réponse inflammatoire est directement liée à la dysfonction de la greffe. Dans ses modèles, si plus de 10 % des microcapsules implantées provoquent une réaction, la survie de tous les îlots microencapsulés transplantés est compromise (De Vos, 1996a).

1.5.2.1- Mécanismes

Les causes de la RHM sont très controversées. Pour certains auteurs, la RHM est le fruit d'une réaction à corps étranger contre les matériaux utilisés dans la fabrication des microcapsules puisque des capsules vides provoquent la même réaction que des capsules renfermant des îlots (Cole, 1992; Fritschy, 1994). Pour d'autres, la RHM est le résultat d'une réaction humorale dirigée contre le greffon. Cette discordance d'idée peut être expliquée par l'absence de méthodes adéquates pour évaluer la biocompatibilité des microcapsules.

1.5.2.1.1- Réaction contre un corps étranger

La RHM implique des cellules qui sont aussi observées dans les réactions à corps étranger (fibroblastes, fibrocytes, cellules géantes, macrophages, granulocytes) (Fritschy, 1994). Une encapsulation inadéquate (terme général regroupant les microcapsules brisées, non-sphériques et dont la couche de PLL est seulement partiellement recouverte par

la deuxième couche d'alginate) (De Vos, 1996a, b) semble être une cause importante de cette réaction à corps étrangers puisque la sphéricité (Colton, 1991; Lum, 1991b; Lanza, 1992b; Fritschy, 1994), l'intégrité (Cole, 1992; Van Schilfgaarde, 1996) et le recouvrement de la couche de PLL par l'alginate externe (Fritschy, 1994; Van Schilfgaarde, 1996) sont des facteurs associés au développement de la RHM. La pureté et la composition chimique de l'alginate jouent aussi un rôle dans le développement de la RHM. L'alginate est un hétéropolymère composé de monomères d'acide mannuronique (M) et guluronique (G). Des alginates ayant de fortes proportions de monomères M et MG stimulent la sécrétion *in vitro* de TNF- α et IL-1 (Otterlei, 1991; Soon-Shiong, 1991; Pueyo, 1993) par des macrophages et des monocytes et induisent la RHM *in vivo* (Otterlei, 1991; Soon-Shiong, 1991). Des alginates de faibles poids moléculaires induisent aussi une forte réaction (Petruzzo, 1997). La pureté de l'alginate est un facteur important et plusieurs méthodes de purification ont été publiées (Zimmermann, 1992; Klock, 1994; De Vos, 1997). L'utilisation d'alginate purifiée a permis de réduire la RHM (Van Schilfgaarde, 1996) tout en améliorant les résultats de xénogreffes d'îlots (Sun, 1996; Korbitt, 1997) et de cellules parathyroïdiennes (Hasse, 1996).

1.5.2.1.2- Réaction humorale

Pour certains auteurs, la réaction péri capsulaire est le résultat final d'une réponse humorale dirigée contre le greffon puisque dans leurs expériences, des capsules vides ne provoquent aucune réaction (Weber, 1990, 1994; Wijsman, 1992; Hsu, 1995; Jesser, 1996; Kessler, 1996). Des lymphocytes T-auxiliaires ont été identifiés parmi les cellules impliquées dans la RHM (Weber, 1990, 1994; Wijsman, 1992; Petruzzo, 1997). Celle-ci serait dépendante des lymphocytes T et son développement se ferait selon la voie Th-1 dépendante (Weber, 1990). La réaction humorale peut être causée par une encapsulation incomplète (terme général désignant un îlot qui n'est pas parfaitement immunoprotégé par la membrane) (De Vos, 1994, 1996a, b) ou par le relâchement d'antigènes par les îlots (Lanza, 1994; Colton, 1995; Hsu, 1995) et/ou par des macrophages présents dans les îlots (Fraser, 1995).

Nous pensons que le rejet précoce est causé par une réaction à corps étranger, dirigée contre les composantes des microcapsules, et que le rejet à plus long terme est le résultat

d'une réaction humorale, dirigée contre le greffon.

1.5.2.1.3- Mécanismes de la mort du greffon

Les échanges de nutriments, d'oxygène et des déchets métaboliques se font par diffusion à travers la membrane des microcapsules, car le greffon n'est pas revascularisé après la transplantation. Une hypothèse pour expliquer la mort du greffon veut que les cellules et les protéines de la matrice extracellulaire, qui s'accumulent au pourtour des microcapsules, empêchent la libre diffusion et causent une famine (Fritschy, 1991; Mazaheri, 1991; Cole, 1992; Kessler, 1996; Maki, 1996; Pollok, 1997). Un autre mécanisme est le dommage direct par des cytokines et par le NO relâchés par des macrophages activés et d'autres cellules immunitaires (Mazaheri, 1991; Cole, 1992). Ainsi, certains auteurs ont démontré que les capsules d'alginate-poly-L-lysine-alginate (APA) provoquent la relâche d'IL-1 β , de TNF- α et d'IL-6 par des macrophages activés *in vitro* (Otterlei, 1991; Soon-Shiong, 1991; Pueyo, 1993). Ainsi, le NO (Mazaheri, 1991) et certaines cytokines comme le TNF- β (Weber, 1994), l'IL-6 (Kulseng, 1997) et l'IL-1 β (Mazaheri, 1991; Cole, 1992; Weber, 1994; Kessler, 1996) (poids moléculaires < 100 000 Da) pénétreraient à l'intérieur des microcapsules pour interférer avec la fonction des îlots et causer la mort du greffon. Pourtant, plusieurs études *in vitro* démontrent que les microcapsules protègent les îlots contre les dommages oxydants causés par le TNF- α (Tai, 1995; Kulseng, 1997), l'IL-1 β (Tai, 1995) et l'IFN- γ (Tai, 1995). Ces contradictions peuvent s'expliquer par une différence dans la perméabilité des microcapsules. De plus, la charge nette à la surface des microcapsules pourrait repousser des molécules dont la taille est plus petite que les pores des microcapsules (Tai, 1995). Des expériences *in vitro* ont démontré que les capsules d'APA peuvent activer le système du complément tout en protégeant les îlots d'une exposition directe aux molécules du complément (Darquy, 1994). Finalement, l'échec de la transplantation peut être causé par la destruction de l'intégrité structurale de la membrane, puisque des expériences *in vitro* ont démontré que le système fibrinolytique plasminogène-plasmine accélère la dégradation des microcapsules et que des macrophages activés peuvent stimuler ce processus (Hsu, 1997).

1.5.2.2- Composantes des microcapsules impliquées dans la RHM

En résumé, plusieurs causes possibles de la réaction de l'hôte contre les microcapsules ont été identifiées: **1)**- nature de l'alginate (ratio G/M); **2)**- pureté de l'alginate; **3)**- recouvrement insuffisant de la PLL; **4)**- manque de biocompatibilité des matériaux utilisés dans le recouvrement; **5)**- encapsulation incomplète et **6)**- relâche d'antigène par les îlots.

1.5.2.3- Évaluation *in vitro* de la biocompatibilité des microcapsules

Quelques tests *in vitro* ont été proposés pour évaluer la biocompatibilité de certains matériaux utilisés dans la fabrication des microcapsules. Pour évaluer la biocompatibilité de l'alginate purifiée, Zekorn coince les différentes fractions obtenues avec une préparation de splénocytes et élimine les fractions qui provoquent une prolifération cellulaire (Zimmermann, 1992). Soon-Shiong coince des macrophages et des alginates avec des ratios G/M différents. Il mesure par la suite la production de TNF- α , IL-1, IL-5 (Otterlei, 1991; Soon-Shiong, 1991). Il est important de spécifier que, dans ces expériences, les dosages de cytokines ont été utilisés seulement comme marqueurs d'activation des macrophages *in vitro*. Le rôle des cytokines dans le contrôle et le développement de la RHM *in vivo* n'est pas encore connu. De plus, tel que décrit dans les sections suivantes, d'autres cytokines, qui n'ont pas été étudiées dans le contexte de la microencapsulation, sont susceptibles de jouer un rôle très important dans la RHM.

1.5.3- Fibrose

La recherche sur les maladies fibromateuses a permis d'approfondir les mécanismes impliqués dans la réaction de fibrose. En particulier, le rôle de certaines cytokines a été clairement défini. En dépit de plusieurs similarités entre certaines maladies fibromateuses et la RHM, très peu d'efforts ont été effectués pour appliquer les stratégies, les méthodologies et les connaissances acquises sur la fibrose au domaine de la microencapsulation.

1.5.3.1- Pathogénèse de la fibrose

La pathogénèse des maladies fibromateuses est similaire peu importe les tissus impliqués (Kovacs, 1994). Premièrement, il y a une phase d'inflammation aiguë, caractérisée par une infiltration rapide de neutrophiles et de macrophages, médiée par des facteurs activateurs et chimiotactiques. La réaction d'inflammation devient chronique avec l'arrivée des lymphocytes. Les leucocytes, qui s'accumulent au site d'inflammation, relâchent des cytokines qui induisent directement ou indirectement la prolifération des fibroblastes et des cellules endothéliales et provoquent la déposition de protéines de la matrice extracellulaire. Si les stimuli sont maintenus, il y a une production aberrante de cytokines, lesquelles induisent des altérations irréversibles dans l'architecture et la fonction des tissus. Ceci mène à la prolifération excessive des fibroblastes et à l'accumulation, tout aussi excessive, de tissu conjonctif.

1.5.3.2- Modèles de fibrose

La fibrose est impliquée dans plusieurs pathologies dont la sclérodermie (Kawaguchi, 1992; LeRoy, 1994), fibrose du foie (Roeb, 1995; Takiya, 1995; Benyon, 1996; Brecher, 1996; Eghbali-Fatourech, 1996; Paradis, 1996), pancréatite chronique (Sanvito, 1995; Van Laethem, 1996), fibrose pulmonaire (Jordana, 1993; Khalil, 1996), fibrose rénale (Eddy, 1995; Davies, M., 1996; Yokoyama, 1996), maladie causée par les radiations (Langberg, 1994), athérosclérose (Hansson, 1992; Langberg, 1994; Davies, M., 1996; Yokoyama, 1996), réaction à corps étranger (Lammers, 1988) et cicatrisation excessive (Barr, 1988; Kovacs, 1991; Pierce, 1992; Desmouliere, 1995; Romer, 1996; Mutsaers, 1997). Les deux dernières pathologies sont probablement les deux modèles les plus apparentés à la réaction de fibrose péricapsulaire.

1.5.3.2.1- Granulome

Généralement, l'organisme réagit à un corps étranger en essayant de le dissoudre, de l'expulser ou, en dernier recours, de l'encapsuler. L'intensité de cette réaction dépend de la nature chimique, de la taille et de la forme du corps étranger. Ce dernier provoque une

inflammation transitoire qui est suivie par une phase de réparation tissulaire. Si le corps étranger persiste, les monocytes prolifèrent, se différencient en macrophages et peuvent se transformer en cellules géantes multinuclées (caractéristique histologique d'une réaction à corps étrangers). Par la suite, des fibroblastes entourent ces amas de macrophages et synthétisent du collagène pour envelopper le corps étranger dans une capsule dense et fibreuse formant ainsi un granulome.

1.5.3.2.2- Cicatrisation

La cicatrisation implique une série d'événements qui nécessitent une communication intense entre les cellules. Dans les minutes qui suivent un dommage, les cellules inflammatoires migrent, par chémoattractivité, au site endommagé. Dans les premiers stades de la guérison, les neutrophiles sont les cellules les plus abondantes. Après la dégranulation et la mort des neutrophiles, les macrophages prédominent et, de concert avec les neutrophiles, phagocytent les débris et les micro-organismes. Les macrophages sont aussi une source de facteurs mitogéniques et chémoattractifs pour les cellules endothéliales qui bordent la blessure. Les fibroblastes migrent le long de la matrice de fibrine dans la plaie et produisent une grande quantité de protéines de la matrice extracellulaire, particulièrement du collagène de type I et III. Ces événements mènent à la formation d'un granulome. Pendant la cicatrisation, il y a une phase où se déroule la synthèse et la dégradation rapide des protéines de la matrice extracellulaire, une phase de réparation tissulaire (où la synthèse de collagène est plus importante que sa dégradation) et une phase finale de résolution (taux de synthèse du collagène qui retourne à la normale). La fibrose survient lorsqu'il n'y a pas de résolution et que le taux de synthèse du collagène demeure plus élevé que le taux de dégradation.

1.5.4- Cytokines

Lors d'une réaction de fibrose, la réponse cellulaire implique la production et la sécrétion de médiateurs cellulaires solubles ou cytokines. Une production aberrante de ces dernières peut mener à la fibrose (Kovacs, 1991). Plusieurs des cytokines impliquées dans les processus inflammatoires et de fibrose sont sécrétées par des monocytes et des macrophages (Kovacs, 1994).

1.5.4.1- Cytokines inflammatoires

Les macrophages et les monocytes activés produisent des médiateurs qui stimulent l'inflammation. Ces cytokines proinflammatoires sont des facteurs chémotactiques qui attirent des leukocytes, fibroblastes, cellules musculaires lisses et des cellules endothéliales. De plus, ces cytokines peuvent induire la production de médiateurs additionnels. Les cytokines proinflammatoires peuvent aussi initier une cascade d'événements menant à la fibrose. L'IL-6, l'IL-8, MCP-1, MIP-1, GRO, RANTES, le TNF- α , l'IL-1 α et β sont tous des médiateurs de l'inflammation (Kovacs, 1994).

1.5.4.2- Cytokines fibrogéniques

Les cytokines fibrogéniques agissent directement sur la prolifération des fibroblastes et sur la stimulation de la production des protéines de la matrice extracellulaire. Ces cytokines sont généralement produites par des macrophages activés mais aussi par des lymphocytes, des cellules endothéliales et même par les fibroblastes. Le PDGF-aa et le TGF- β sont très fibrogéniques. Ils agissent directement comme inducteurs de la croissance des fibroblastes (Kovacs, 1991; Border, 1994; Kovacs, 1994; Mutsaers, 1997). À faible concentration, le TNF- α induit la prolifération des fibroblastes (Kovacs, 1991; Kovacs, 1994). Par contre, l'IL-1 α et l'IL-1 β n'agissent pas directement sur la croissance des fibroblastes mais induisent plutôt la sécrétion du PDGF-aa. Celui-ci, stimule les fibroblastes à entrer dans le cycle cellulaire (Kovacs, 1991; Kovacs, 1994). Le FGF1 et le FGF2 sont mitogéniques pour les cellules mésenchymales (Kovacs, 1991; Mutsaers, 1997). Le TGF- β est le plus puissant stimulateur de l'expression des gènes du collagène et de la fibronectine (Kovacs, 1991; Pierce, 1992; Border, 1994; Mutsaers, 1997). L'IL-1 β et l'IL-1 α peuvent aussi induire la transcription des gènes du collagène type I et III (Kovacs, 1994). De plus, ces cytokines peuvent influencer l'accumulation des protéines de la matrice extracellulaire par l'induction ou l'inhibition des activités collagénases (Kovacs, 1991; Kovacs, 1994). L'action du TNF- α sur la synthèse du collagène est controversée car quelques auteurs décrivent une induction alors que d'autres font état d'une inhibition (Kovacs, 1991; Kovacs, 1994). Le PDGF-aa régule de façon positive l'expression du gène de la fibronectine, la synthèse du procollagène

et augmente l'activité des collagénases (processus essentiel pour le remodelage de la matrice extracellulaire) (Mutsaers, 1997).

1.5.4.3- Cytokines anti-fibrogéniques

Certaines cytokines possèdent une activité anti-fibrogénique. L'IL-4, l'IL-10, l'IFN- β et l'INF- γ ont un effet inhibiteur sur la prolifération des fibroblastes et/ou sur la synthèse du collagène (Kovacs, 1994). Par exemple, chez les fibroblastes, l'INF- γ supprime la transcription du gène du collagène tout en n'ayant aucun effet sur la transcription du gène de la fibronectine (Kovacs, 1991; Kovacs, 1994). Cette cytokine jouerait un rôle endogène dans la suppression de la synthèse du collagène dans les processus de fibrose.

1.6- Objectifs

1.6.1- Objectif général

Le but du présent travail était de développer une méthode semi-quantitative pour mesurer l'expression des cytokines afin d'étudier leur rôle dans la pathogénèse de la réaction de l'hôte contre les microcapsules (RHM). Nous avons choisi d'étudier l'expression des gènes des cytokines par RT-PCR car il s'agit d'une méthode de choix pour la quantification d'ARNm rares. Le modèle utilisé fut l'implantation de microcapsules d'alginate-poly-L-lysine-alginate dans les coussins graisseux épидидymaires (CGE) de rats Wistar. Des études antérieures ont validé ce modèle pour l'étude de la biocompatibilité des microcapsules. Cependant, les résultats d'études préliminaires ont montré que la mise au point d'une méthode de RT-PCR à l'aide de ce modèle présentait des difficultés particulières: **1)**- la présence des microcapsules dans les CGE étudiés provoquait une interférence au niveau de la réaction de RT-PCR et **2)**- la forte proportion de lipides interférait dans la procédure d'extraction de l'ARN total.

1.6.2- Objectifs spécifiques

La mise au point de la méthode comprenait les objectifs spécifiques suivants:

- 1)**- Développer une technique de digestion enzymatique des CGE pour séparer les microcapsules des cellules impliquées dans la RHM, et ce avant la réaction de RT-PCR.
- 2)**- Développer, à partir des cellules impliquées dans la RHM, une méthode de mesure semi-quantitative de l'expression du TGF- β_1 par RT-PCR.

La validation de la méthode comprenait les objectifs spécifiques suivants:

- 1)**- Étudier les populations cellulaires impliquées dans la RHM.
- 2)**- Valider la méthode de mesure de l'expression des gènes des cytokines.
- 3)**- Appliquer la méthode développée pour évaluer le taux d'expression relatif du TGF- β_1 , 14 jours après l'implantation de microcapsules dans les CGE de rats Wistar.

2- “Alginate-poly-l-lysine microcapsule biocompatibility: a novel RT-PCR method for cytokine gene expression analysis in pericapsular infiltrates.”

ALGINATE-POLY-L-LYSINE MICROCAPSULE BIOCOMPATIBILITY: A NOVEL
RT-PCR METHOD FOR CYTOKINE GENE EXPRESSION ANALYSIS IN
PERICAPSULAR INFILTRATES*

Robert Robitaille[†], François A. Leblond[†], Nathalie Henley[†], Gérald J. Prud'homme[‡],
Elliot Drobetsky[†] and Jean-Pierre Hallé^{†,§}

[†]Centre de Recherche Guy-Bernier, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Montréal, Québec,
H1T 2M4, Canada

[‡]Department of Pathology, McGill University, Lyman Duff Medical Sciences Building,
Montréal, Québec, H3A 2B4, Canada

Running Title: Study of microcapsule biocompatibility by semi-quantitative RT-PCR.

*No benefit of any kind will be received either directly or indirectly by the authors.

§To whom correspondence should be addressed:

Dr. Jean-Pierre Hallé

Director of Research Laboratory on Diabetes and Bioartificial Organs

Centre de Recherche Guy-Bernier

Hôpital Maisonneuve-Rosemont

5415, boulevard de l'Assomption

Montréal, Québec, H1T 2M4

Canada

Fax: (514) 252-3430

Resume

Transplantation of microencapsulated islets of Langerhans is impaired by a pericapsular host reaction which eventually induces graft failure. Our goal is to study the role of cytokines in the pathogenesis of this reaction, using the model of alginate-polylysine microcapsule implantation into rat epididymal fat pads. The objectives were: 1) to develop a method to measure, by semi-quantitative PCR, TGF- β ₁ gene expression in fat pad pericapsular infiltrates, and 2) to use this method to evaluate TGF- β ₁ gene expression 14 days after microcapsule implantation. TGF- β ₁ mRNA level was significantly higher in pericapsular infiltrate cells than in non-implanted tissue cells and saline-injected tissue cells ($p < 0.0001$ and $p < 0.01$ respectively). There was no significant difference between the TGF- β ₁ mRNA level of the two types of controls ($p = 0.0945$). These results suggest that TGF- β ₁ plays a role in the pathogenesis of the pericapsular reaction. The method developed can be used to study the role of other fibrogenic cytokines potentially involved. This will shed light on the mechanisms underlying the pericapsular reaction, and will serve as a basis for the development of strategies to control this reaction.

Key words: microcapsules, biocompatibility, host reaction, semi-quantitative RT-PCR, TGF- β ₁

Introduction

Transplantation of immunoisolated islets of Langerhans is a promising experimental treatment for insulin dependent diabetes¹⁻⁴. Microencapsulation of islets within semipermeable alginate-poly-L-lysine membranes has been proposed to prevent their immune destruction following transplantation^{1, 5}. One of the major obstacles to the successful application of this method is the occurrence of a pericapsular fibrosis which eventually induces graft failure⁶. Since a pericapsular reaction has been observed following implantation of empty as well as islet-containing microcapsules⁷, this reaction is evidently not related to the presence of islets, but rather caused by microcapsule materials. Microcapsule biocompatibility is therefore a major issue in the development of an endocrine bioartificial pancreas, as well as in other types of encapsulated cell transplantation.

A thorough understanding of the mechanisms involved in the host reaction to microcapsules is important to design methods for the evaluation, selection, and development of biomaterials of enhanced biocompatibility or, alternatively, to design systemic or local treatments to control this reaction. Attempts have been made to identify the components which induce the microcapsular reaction⁸⁻¹². *In vitro* tests have been developed to evaluate the biocompatibility of various biomaterials¹³⁻¹⁵. These *in vitro* methods allow the study of a specific immune cell type (e.g. macrophages), and the evaluation of a wide range of biomaterials^{16, 17}. However, they do not reflect the complex interactions between different cell types, nor the evolution of the host reaction to microcapsules over time, which are possible to investigate only with *in vivo* methods.

Most *in vivo* studies on alginate-poly-L-lysine microcapsule biocompatibility have focused on intraperitoneal transplantation of microencapsulated islets into diabetic rats. In the peritoneal cavity, microcapsules are unevenly distributed. Free floating microcapsules, which are easily recovered, are less likely to show pericapsular fibrosis than unretrievable microcapsules. We have developed and carefully validated a method for the *in vivo* comparative evaluation of microcapsule biocompatibility^{18, 19}. Microcapsules are implanted into rat epididymal fat pads, retrieved at different times post implantation, and evaluated using histological techniques and a fibrosis score. Microcapsule recovery rate from this implantation site is > 90%. There is no selection bias and the pericapsular reaction is uniform within one fat pad, and between fat pads, allowing random sampling and comparative studies¹⁸. An additional advantage is that the contralateral fat pad can be used as a non-

implanted control.

Histological studies of the cell types involved in pericapsular infiltrates represent the obvious first step in the investigation of the *in vivo* reaction^{6, 7, 10, 20}. However, the knowledge acquired and, most importantly, the potential for interventions derived from this methodology, are limited. Cytokines play a key role in communications between cells. Several act as chemoattractants for immune cells and fibroblasts; they can stimulate or inhibit cell proliferation, the production and/or release of other cytokines, extracellular matrix components and enzymes involved in connective tissue remodeling²¹. The characterization of the cytokine profile and time-course following microcapsule implantations would be very useful for the understanding of the mechanisms involved in the host reaction to microcapsules, and could form the basis of diagnostic tests to identify microcapsule components or characteristics inducing this reaction. Furthermore, cytokines may be targets for interventions to control the host reaction to microcapsules.

Transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) is one of the most potent fibrogenic cytokines. It acts directly as an inducer of fibroblast cell growth²¹⁻²⁴. It stimulates the expression of collagen and fibronectin genes as well as the synthesis and release of these matrix proteins^{21, 23-25}. It is a powerful stimulator of tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMPs) release by fibroblasts²⁶. The inhibition of metalloproteinases, such as collagenase, affects the balance between collagen deposition and clearance, and promotes the formation of fibrotic scar tissue.

Our goal is to study the role of cytokines in the pathogenesis of the host reaction to microcapsules, using the model of alginate-poly-L-lysine microcapsule implantations into rat epididymal fat pads. We have chosen to initially study cytokine gene expression by RT-PCR because this method is more sensitive than northern blot or ribonuclease protection assay, and is currently the method of choice for quantification of rare transcripts. The development of RT-PCR on epididymal fat pad pericapsular infiltrates presented particular difficulties, related to interference by microcapsule components and the use of a lipid-rich adipose tissue. The specific objectives of the present study were: 1) to develop a method to measure, by semi-quantitative RT-PCR, TGF- β_1 gene expression in epididymal fat pad pericapsular infiltrates, and 2) to use this method to evaluate TGF- β_1 gene expression 14 days after microcapsule implantation.

In preliminary experiments, RT-PCR amplification could not be attained using total

RNA from microcapsule implanted tissues, whereas this was possible with capsule-free fat pads. The use of different methods for total RNA isolation did not improve these results. A systematic investigation revealed that microcapsules interfered with both the reverse transcriptase reaction and the PCR amplification. To overcome this problem, we developed a technique to separate microcapsules from the implanted tissue prior to cell breakage (homogenization) and RT-PCR analysis. This technique allows the study of cytokine gene expression in microcapsule implanted tissues. It also permits standardization of the results for the number of capsules and cells per sample, and the study of the cell types involved. The use of an RT-PCR technique with radiolabelled primers and radioactivity counting of the PCR products excised from agarose gels improved the sensitivity, precision, specificity, efficiency and cost-effectiveness of the method, and allowed the processing of a higher number of samples. The results of the present study demonstrate that TGF- β ₁ mRNA is increased in pericapsular infiltrates 14 days after microcapsule implantations, suggesting that this cytokine is involved in the host reaction to microcapsules.

Materials and method

Microcapsule preparation

Alginate beads were produced by extruding 1.8% sodium alginate^a-0.5% dextran blue (M.W. 2×10^6) into a 1.45% CaCl₂ solution. The droplets were produced with the use of an electrostatic pulse generator²⁷ allowing the production of calcium alginate beads of approximately 250 μ m. Microcapsules were prepared according to procedure described by Sun's group²⁸. Briefly, alginate beads were successively soaked in decreasing concentration of CaCl₂ (from 1.45% to 0.36% in buffered saline). The beads were subsequently incubated in a 0.05% poly-L-lysine solution (M.W. 23.8kD)^b to produce the membrane. After washes in saline, the capsules were incubated in a dilute (0.18%) alginate solution then soaked into citrate to liquefy the alginate inner core of the capsules. Microcapsule diameter ranged from 325 \pm 5 μ m to 351 \pm 17 μ m.

Implantation Procedure

The implantation procedure was performed as previously described¹⁸ using male Wistar rats weighting 333 to 532g. Under isoflurane anesthesia, a midline incision was made and the testicles were gently pushed out through the incision. The order of exit of the fat

pads was at random. The epididymal fat pads were gently pulled out, and 1000 small microcapsules were implanted into one fat pad, cautiously avoiding major blood vessel perforation. The contralateral fat pad received a mock injection of saline. The fat pads and the testicles were returned into place; then the abdominal wall and the skin were sutured. Fourteen days after implantation, fat pads were retrieved and animals were sacrificed. Implanted and non-implanted epididymal fat pads were excised and snap frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until total RNA isolation and cDNA synthesis. Protocols were reviewed and stated conformed to the ethical guidelines of the Canadian Council for Animal Care by an institutional committee and these guidelines were observed throughout the study.

Preliminary RT-PCR experiments

In an initial attempt, we failed to obtain RT-PCR amplification from microcapsule implanted fat pads. A systematic investigation suggested that the problem was caused by the presence of the microcapsules themselves. To determine the effect of microcapsules on different steps of RT-PCR, tissue from capsule-free fat pads were processed, and the homogenate of 1000 microcapsules was added to the preparation immediately before the reverse transcriptase reaction. A control RNA consisting of an 891bp *in vitro* transcribed RNA from the chloramphenicol acetyltransferase (CAT) gene that has been engineered to contain a 3' poly(A) tail^c was also used. In order to identify the microcapsule component(s) responsible for the interference, 5 μL of 0.05% poly-L-lysine, 0.18% alginate or both were added to Cat control RNA before the reverse transcription or PCR reactions. The primers^c used for the amplification of the control CAT gene cDNA yielded a prominent 523bp band. One tenth of the cDNA samples were used for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and CAT PCR. PCR reactions were performed in a DNA Thermal Cycler 480^d in duplicate. The ethidium bromide stained products were analysed by 1% agarose gel electrophoresis. All PCR products were of the expected size, and their identity was confirmed by performing nested PCR with specific oligonucleotide primers internal to the original primers.

Fat pad enzymatic digestion and immune cell isolation

Since preliminary experiments confirmed that the presence of microcapsules interfered with both reverse transcription and PCR amplification, a method was developed to remove microcapsules from the preparation before cell breakage (homogenization) and

reverse transcriptase reaction, thus preventing RNA binding to microcapsule components. The method also allowed separation of adipocytes for which lipid content could interfere with nucleic acid isolation. Retrieved fat pads were kept in ice-cold HBSS and minced on ice. The minced tissue was diluted to 10mL with ice-cold HBSS in a 50mL tube and was digested with 75mg Collagenase P^e and 25mg Trypsin^e at 37°C for 2 to 3min. To stop the digestion, the cellular suspension was diluted to 50mL with ice-cold HBSS + 10% fetal calf serum (FCS) and kept on ice for 3min. The supernatant was then transferred to a new 50mL tube, leaving behind the microcapsules. The suspension was then centrifuged at 500g for 10min at 4°C, and the adipocytes floating on the top layer were then removed. Two additional washes with ice-cold HBSS + 10% FCS were performed. The microcapsules were retrieved and then counted.

Histological analysis

Total cell counts and viable cell number were determined by Trypan Blue exclusion procedure using a hemocytometer. Approximately 300000 cells from the cellular suspension were used to make a cytocentrifuge preparation or cytopsin. For each sample, 2 to 3 cytopsin were made. Cells were then stained with Wright-Giemsa^b.

Total RNA isolation

Total RNA was isolated with the TriPure Isolation Reagent^e according to a modified procedure of the single-step RNA isolation method developed by Chomczynski and Sacchi²⁹. One mL of TriPure Isolation Reagent was used for each 5×10^6 dissociated cells. Total RNA concentration and purity was determined by UV-light absorbance at 260 and 280nm using a Spectronic 1001 Plus spectrophotometer^f. Genomic DNA contamination of the total RNA samples was removed by treatment with 10U DNase I RNase-free^e at 37°C for 15min in presence of 20U of RNase Inhibitor^e. Total RNA was stored at -80°C prior to use in first strand cDNA synthesis.

Reverse Transcription

First-strand cDNA synthesis was carried out using 1µg of total RNA. Prior to the reverse transcription, the RNA and 0.5µg Oligo(dT)₁₅₋₁₈^g were denatured for 10min at 65°C. Reverse transcription was performed at 42°C for 60min in a total volume of 20µL using 50U of Expand Reverse Transcriptase^e, 1mM of each dNTP^c, 10mM DTT, 20U

RNase Inhibitor and 1X Expand Reverse Transcriptase buffer (50mM Tris-HCl, 40mM KCl, 5mM MgCl₂, 0.5% Tween 20 (v/v), pH 8.3). Samples were heated at 70°C for 10min to inactivate the reverse transcriptase. cDNA samples were stored at -20°C prior to use in PCR.

PCR Primers

Using data available through GeneBank, 2 sets of oligonucleotide primers were designed for TGF-β₁ herein designated as original and internal primer pairs yielding 273 and 235bp products respectively:

original sense: 5'-CTTCAGCTCCACAGAGAAGAAGACTGC-3'

original antisense: 5'-CACGATCATGTTGGACAAGCTGCTCC-3'

internal sense: 5'-ACGGCAGCTGTACATTGACTT-3'

internal antisense: 5'-GCTTGCGACCCACGTAGTAGA-3'

The constitutive gene product of GAPDH was used as an internal control in semi-quantitative RT-PCR. Original and internal primer pairs were designed for GAPDH according to data available through GeneBank, yielding 515 and 398bp products respectively:

original sense: 5'-ATGGAGAAGGCTGGGGCTCAC-3'

original antisense: 5'-GTAGCCCAGGATGCCCTTTAG-3'

internal sense: 5'-GTGATGGGTGTGAACCACGAG-3'

internal antisense: 5'-CTGCTTCACCACCTTCTTGAT-3'

Semi-quantitative PCR

One hundredth of the cDNA samples were used for GAPDH and TGF-β₁ PCR in 100μL final volume reactions containing 1X PCR Buffer (20mM Tris-HCl, 50mM KCl, pH 8.4), 0.2mM of each dNTP, 1.5mM MgCl₂, 0.5μM of each primer and 2.5U of *Taq* DNA polymerase^c. Primers for GAPDH and TGF-β₁ were used in the same reaction (multiplex PCR) to compensate for variations in RNA isolation, initial quantification errors and tube-to-tube variations in RT and PCR reactions. Sense primers were ³²P-radiolabeled with T4 polynucleotide kinase^c. The PCR reactions were performed in duplicate on the GeneAmp PCR System 9600^d with the following profile: 30s denaturation at 94°C, 15s annealing at 55°C, 25s extension at 72°C. An initial denaturation step at 94°C for 2.5min and a final extension step at 72°C for 7min were also performed. Products were analyzed by

2% agarose gel electrophoresis and stained with ethidium bromide. All PCR products were of the expected size, and their identity was confirmed by performing nested PCR with specific oligonucleotide primers internal to the original primers. Bands were excised from gel and the relative amount of amplified cDNA was then determined by liquid scintillation counting^h. To determine the exponential phase (when the amplification efficiency is at its maximum and remains constant and in which the amount of products increases linearly related to the number of cycle), the amount of radioactivity recovered from the excised bands was plotted in a log scale against the number of cycles. To determine semi-quantitative PCR sensitivity, experiments were performed in which variable amounts of TGF- β_1 and GAPDH control cDNA were used. The radioactivity values in cpm were plotted against cDNA initial copy numbers. Then, by using optimal PCR conditions, amplification of TGF- β_1 and GAPDH from controls, saline-injected controls and microcapsule-implanted tissues was performed to detect differences in gene expression levels.

Statistical analysis

One-way analysis of variance with 3 levels (controls, saline-injected controls and microcapsule-implanted fat pads) was performed. The homogeneity of variance between the 3 levels was confirmed using the Bartlett test, and the average results were compared by the Fisher's Protected Least Significant Difference multiple range test (significance level of 5%).

Results

In preliminary experiments, we found that no RT-PCR amplification was possible using total RNA from microcapsule-implanted tissues (data not shown). This problem was caused by the presence of microcapsules, since no RT-PCR amplification was possible with total RNA from capsule-free epididymal fat pads when microcapsules were added prior to total RNA isolation (Figure 1a, lane 2). The addition of 5 μ L of 0.18% alginate to either control CAT RNA or control CAT cDNA had no effect on PCR amplification (Figure 1b, lanes 3 and 6). The addition of 5 μ L of 0.05% of poly-L-lysine to either control CAT RNA or control CAT cDNA prevented PCR amplification (Figure 1b, lanes 2,4,5 and 7), indicating that poly-L-lysine was the microcapsule component responsible for the interference with both cDNA synthesis and PCR amplification.

In order to circumvent this problem, we developed a technique that enables the

separation of implanted microcapsules from the fat pad tissue. Using a mixture of trypsin and collagenase, it was possible to dissociate the fat pad tissue and separate microcapsules from the resulting cell suspension. Total RNA isolated from the cellular suspension is suitable for RT-PCR analysis since interfering microcapsules are removed prior to the cell breakage and isolation procedure (Figure 1c, lanes 1 to 6). In addition, adipocytes, containing lipids that can interfere with phenol/chloroform RNA extraction, are removed from the cellular suspension by centrifugation before the total RNA isolation procedure. Finally, this technique allows the identification of cells involved in the reaction to microcapsules by simple histological analysis of the cellular suspension (Figure 2a and b).

The optimal conditions for RT-PCR of GAPDH and TGF- β were established. The linear range of amplification for both GAPDH and TGF- β_1 was from 30 to 35 cycles (Figure 3a). Using 33 amplification cycles, there was a direct correlation between PCR products and the initial cDNA concentration ($r=0.974$ and 0.983 for GAPDH and TGF- β_1 respectively; figure 3b), confirming that, for this number of cycles, the PCR is in the linear amplification range.

We then used this method to study the host reaction to microcapsules, 14 days after implantation of 1000 microcapsules in the rat epididymal fat pad. Table 1 depicts the characteristics of the different samples used in this study. Epididymal fat pads of non-implanted rats were used as controls. To distinguish the reaction to microcapsules from the reaction resulting from the implantation procedure, other control rats were injected with saline. Microcapsule recovery rate was 91%. There was a correlation between the amount of total RNA and the number of cells recovered after fat pad enzymatic digestion (Table 1).

The results of histological analysis of the cytocentrifuges are summarized in Table 2. Microcapsules induced a stronger reaction than saline injections. The percentage of monocyte/macrophages ($p<0.001$), eosinophils ($p<0.01$), neutrophils ($p<0.01$) and lymphocytes ($p<0.05$) was significantly higher in implanted fat pads than in saline-injected controls. The amount of fibroblasts, fibrocytes, Langerhans cells, keratinocytes, giant cells and other cells (all regrouped as others) were higher in saline-injected controls than in implanted fat pads ($p<0.0001$). There was no significant difference for the percentage of basophils.

The semi-quantitative RT-PCR gene expression analysis revealed an overexpression of the TGF- β_1 message in cells 14 days after microcapsule implantation which was

significantly higher than control tissue cells and in saline-injected tissue cells ($p < 0.0001$ and $p < 0.01$ respectively, Figure 4). There was no significant difference between the relative TGF- β_1 mRNA expression level of the two types of controls ($p = 0.0945$, Figure 4).

Discussion

Fourteen days after microcapsule implantations into rat epididymal fat pads, TGF- β_1 mRNA expression was increased in microcapsule implanted as compared to saline injected control fat pads. These results suggest that TGF- β_1 , a potent fibrogenic cytokine, plays a role in the development of pericapsular fibrosis. The method developed can be used to study the time-course of TGF- β_1 activation and can be applied to the investigation of other fibrogenic cytokines, potentially involved in the host reaction to microcapsule.

The development of a RT-PCR technique on microcapsule implanted fat pads presented particular difficulties, including interference by microcapsule components and by lipids released from adipocytes. The results of the present study clearly demonstrate that microcapsules strongly interfere with both cDNA synthesis and PCR amplification. Poly-L-lysine, an important microcapsule component, appears responsible for this effect. The outer sheet of microcapsules is composed of alginate, but during tissue homogenization and microcapsules breakdown, alginate is peeled off, thereby unfolding and releasing poly-L-lysine. To prevent the interaction between poly-L-lysine and nucleic acids, a method was developed to separate microcapsules from the tissue prior to cell homogenization and nucleic acid isolation. This method comprises enzymatic digestion of retrieved fat pads, centrifugation of the digested tissues, separation of the cellular suspension from microcapsules and elimination of the adipocytes floating on top of the supernatant. Since microcapsules are separated from the sample before cell breakage, nucleic acids cannot bind to microcapsule components. Moreover, the removal of adipocytes prevented the lipid rich content of these cells to interfere with phenol/chloroform RNA extraction. The cell types of the pericapsular infiltrates were identified and counted on cytocentrifuges, using simple staining techniques. This allowed the normalisation of the RT-PCR results for microcapsule and cell numbers in the sample, and the study of the cellular reaction.

The sensitivity of the method allowed the detection of significant differences in immune cell type percentage between saline injected and microcapsule implanted fat pads. Microcapsules induced a chronic inflammatory reaction with increased numbers of

macrophages, neutrophils and lymphocytes, persisting 14 days after microcapsule implantations. This was not unexpected, since, in our previous study¹⁸, macrophages have been the predominant immune cells in pericapsular infiltrates, 14 days after implantations.

Our aim is to investigate the role of many cytokines potentially involved in the host reaction to microcapsules, studying the time-course of their mRNA expression following microcapsule implantations. This requires a sensitive but relatively simple technique, which may be applied to a large number of samples. Relative RT-PCR is a simple method which is widely used for the quantitative analysis of gene expression. Several precautions were taken to maximize the precision and the reliability of the results. RT-PCR was performed using the same reagents, apparatus and protocols along the entire study. RT-PCR experimental conditions were optimized for each pair of primers. PCR reactions were terminated and products quantitated when all samples were in the linear range of amplification. Several semi-quantitative RT-PCR methods were evaluated in preliminary experiments. A method using densitometric analysis of RT-PCR products required large amount of starting material and was not sensitive enough to detect small variations in mRNA expression. A nested RT-PCR method³⁰ improved the specificity, but was not cost-effective because many PCR steps were needed. As an alternative, we developed a semi-quantitative RT-PCR method using radiolabelled oligonucleotide primers. The labelled primers increased the sensibility and small variations in mRNA levels could be detected using small amount of starting material. In addition, this efficient and cost-effective method allowed the processing of a higher number of samples.

We have previously shown that a pericapsular fibrosis reaction, with collagen accumulation, took place 2 weeks after microcapsule implantations into rat epididymal fat pad¹⁸. The present study demonstrated that microcapsules elicited a significant 4.3 fold increase of TGF- β ₁ mRNA expression 14 days after implantation into rat epididymal fat pad. The damage caused by the implantation procedure (i.e. saline injection) did not induce a significant increase of TGF- β ₁ mRNA levels. These results suggest that TGF- β ₁ plays a role in the development of pericapsular fibrosis.

The method developed will allow further studies on the role of cytokines in the host reaction to microcapsules. The time-course of TGF- β ₁ activation will be established. Although macrophages are likely to be the principal cell type producing TGF- β ₁, the actual contribution of different cell types will have to be defined. This can be done by separating

the different cell types implicated, using a FACS cell sorter, and repeating RT-PCR analysis on each cell population. The method developed may be used to study the time course of mRNA expression of other cytokines potentially involved in the host reaction to microcapsules. Finally, when cytokines presenting significant mRNA expression modulation are identified, and the time course of this modulation is determined, *in situ* hybridization or ELISA may be used to quantify the protein production at specific times. Cytokine inhibition and stimulation experiments could confirm the role of a specific cytokine.

In conclusion, a simple method was developed to measure, by semi-quantitative RT-PCR, cytokine gene expression on microcapsule implanted epididymal fat pads. Using this method, it was shown that TGF- β ₁ mRNA is overexpressed in pericapsular infiltrates, 14 days after microcapsule implantation. This suggests that TGF- β ₁ plays a role in the pathogenesis of the host reaction to microcapsules. The method highlighted here may be used to study the role of other fibrogenic cytokines potentially involved. This will shed light on the mechanisms underlying the host reaction to microcapsules, and will serve as a basis for the development of strategies to control this reaction.

Acknowledgements.

This work was supported by the Canadian Diabetes Association and the Medical Research Council of Canada (research grant award #MA-14435). Robert Robitaille received a student fellowship from the Association Diabète Québec.

References

1. F. Lim and A.M. Sun, "Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas," *Science*, **210**, 908-910 (1980.)
2. Mei-Y. Fan, Zhao-P. Lum, Xiao-W. Fu, L. Levesque, I.T. Tai and A.M. Sun, "Reversal of diabetes in BB rats by transplantation of encapsulated pancreatic islets," *Diabetes*, **39**, 519-522 (1990.)
3. Y. Sun, X. Ma, D. Zhou, I. Vacek and A.M. Sun, "Normalization of diabetes in spontaneously diabetic cynomolgus monkeys by xenografts of microencapsulated porcine islets without immunosuppression," *J. Clin. Invest.*, **98**, 1417-1422 (1996.)

4. P. Soon-Shiong, R.E. Heintz, N. Merideth, Q.X. Yao, Z. Yao, T. Zheng, M. Murphy, M.K. Moloney, M. Schmehl, M. Harris, R. Mendez, R. Mendez and P.A. Sandford, "Insulin independence in a type 1 diabetic patient after encapsulated islet transplantation," *Lancet*, **343**, 950-951 (1994.)
5. T.M.S. Chang, "Semipermeable microcapsules," *Science*, **146**, 524-526 (1964.)
6. C.J. Weber, S. Zabinski, T. Koschitzky, L. Wicker, R. Rajotte, V. D'Agati, L. Peterson, J. Norton and K. Reemtsma, "The role of CD4+ helper T cells in the destruction of microencapsulated islet xenografts in nod mice," *Transplantation*, **49**, 396-404 (1990.)
7. J. Wijsman, P. Atkinson, R. Mazaheri, B. Garcia, T. Paul, J. Vose, G. O'Shea and C. Stiller, "Histological and immunopathological analysis of recovered encapsulated allogenic islets from transplanted diabetic BB/W rats," *Transplantation*, **54**, 588-592 (1992.)
8. P. De Vos, B.J. de Haan, J. Pater and R. van Schilfgaarde, "Association between capsule diameter, adequacy of encapsulation, and survival of microencapsulated rat islet allografts," *Transplantation*, **62**, 893-899 (1996.)
9. P. De Vos, B. De Haan, G.H.J. Wolters and R. Van Schilfgaarde, "Factors influencing the adequacy of microencapsulation of rat pancreatic islets," *Transplantation*, **62** (7), 888-893 (1996.)
10. W.M. Fritschy, P. De Vos, H. Groen, F.A. Klatter, A. Pasma, G.H.J. Wolters and R. Van Schilfgaarde, "The capsular overgrowth on microencapsulated pancreatic islet grafts in streptozotocin and autoimmune diabetic rats," *Transpl. Int.*, **7**, 264-271 (1994.)
11. R. Van Schilfgaarde and P. De Vos, "Aspects of immunoprotection of islets," *Transplant. Proc.*, **28**, 3516-3517 (1996.)
12. D.R. Cole, M. Waterfall, M. MCIntyre and J.D. Baird, "Microencapsulated islet grafts in the BB/E rat: a possible role for cytokines in graft failure," *Diabetol.*, **35**, 231-237 (1992.)
13. M. Otterlei, K. Ostgaard, G. Skjak-Braek, O. Smidsrod, P. Soon-Shiong and T. Espevik, "Induction of cytokine production from human monocytes stimulated with alginate," *J. Immunother.*, **10**, 286-291 (1991.)
14. P. Soon-Shiong, M. Otterlie, G. Skjak-Braek, O. Smidsrod, R. Heintz, R.P. Lanza and T. Espevik, "An immunologic basis for the fibrotic reaction to implanted microcapsules," *Transplant. Proc.*, **23**, 758-759 (1991.)

15. M.E. Pueyo, S. Darquy, F. Capron and G. Reach, "In vitro activation of human macrophages by alginate-polylysine microcapsules," *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **5**, 197-203 (1993.)
16. U. Zimmerman, G. Klock, K. Federlin, K. Hannig, M. Kowalski, R.G. Bretzel, A. Horcher, A.H. Entenmann, U. Sieber and T. Zekorn, "Production of mitogen-contamination free alginates with variable ratios of mannuronic acid to guluronic acid by free flow electrophoresis," *Electrophoresis*, **13**, 269-274 (1992.)
17. S. Arita, K. Thompson, E. Stein, N. Matsuda, K. Cochrum, S. Jemtrud, S. Une, T. Kawahara, L. Shevlin, C. Trieu and Y. Mullen, "In vitro activation of human lymphocytes by crude and purified alginates," *Transplant. Proc.*, **29**, 2125 (1997.)
18. J.-F. Pariseau, F.A. Leblond, F. Harel, Y. Lepage and J.-P. Hallé, "The rat epididymal fat pad as an implantation site for the study of microcapsule biocompatibility. Validation of the method," *J. Biomed. Mater. Res.*, **29**, 1331-1335 (1995.)
19. R. Robitaille, J.-F. Pariseau, F.A. Leblond, M. Lamoureux, Y. Lepage and J.-P. Hallé, "Studies on small (<350 μ m) alginate-poly-L-lysine microcapsules: III- biocompatibility of smaller versus standard microcapsules," *J. Biomed. Mater. Res.*, **44**, 116-120 (1999.)
20. C. Weber, J. Ayres-Price, M. Constanzo, A. Becker and A. Stall, "NOD mouse peritoneal cellular response to poly-L-lysine-alginate microencapsulated rat islets," *Transplant. Proc.*, **26**, 1116-1119 (1994.)
21. E.J. Kovacs, "Fibrogenic cytokines: the role of immune mediators in the development of scar tissue," *Immun. Today*, **12**, 17-23 (1991.)
22. E.J. Kovacs and L.A. Dipietro, "Fibrogenic cytokines and connective tissue production," *FASEB J.*, **8**, 854-861 (1994.)
23. S.E. Mutsaers, J.E. Bishop, G. McGrouther and G.J. Laurent, "Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **29**, 5-17 (1997.)
24. W.A. Border and N.A. Noble, "Transforming growth factor B in tissue fibrosis," *N. Engl. J. Med.*, **331**, 1286-1292 (1994.)
25. G.F. Pierce, J.E. Tarpley, D. Yanagihara, T.A. Mustoe, G.M. Fox and A. Thomason, "Platelet-derived growth factor (BB homodimer), transforming growth factor-B1, and basic fibroblast growth factor in dermal wound healing," *Am. J. Pathol.*, **140**, 1375-1388 (1992.)

26. A.B. Roberts and M.B. Sporn, "The transforming growth factor- α s," in *Peptide growth factors and their receptors 1. Handbook of Experimental Pharmacology*, A.B. Roberts and M.B. Sporn, (eds.), Springer Verlag, New York, 1990, pp. 419-472.
27. Jean-P. Hallé, F.A. Leblond, Jean-F. Pariseau, P. Jutras, Marie-J. Brabant and Y. Lepage, "Studies on small (<300 μ m) microcapsules. II- Parameters governing the production of alginate bead by high voltage electrostatic pulses," *Cell Transplant.*, **3**, 365-372 (1994.)
28. A.M. Sun and G.M. O'Shea, "Microencapsulation of living cells - A long-term delivery system," *J. Contr. Rel.*, **2**, 137-141 (1985.)
29. P. Chomczynski and N. Sacchi, "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction," *Anal. Biochem.*, **162**, 156-159 (1987.)
30. F. Hetu, F. Coutlee and D.-C. Roy, "A non-isotopic nested polymerase chain reaction method to quantitate minimal residual disease in patients with non-Hodgkin's lymphoma," *Mol. Cell. Probes*, **8**, 449-457 (1994.)

Tables

Table 1: Characteristics of samples used for semi-quantitative TGF- β_1 gene expression analysis.

Samples	n	% retrieved microcapsules	# cells after digestion ($\times 10^5$ cells/mL)	Total RNA ($\mu\text{g/mL}$)
Controls	10	n/a	32.6 \pm 20.4	15.66 \pm 4.36
Saline-injected (14 days post-injection of saline)	6	n/a	2.19 \pm 1.04	2.77 \pm 1.03
Microcapsule-implanted (14 days post-implantation)	6	91 \pm 6	3.30 \pm 1.44	4.21 \pm 2.17

Table 2: Cells involved in host reaction to microcapsules at 14 days post-implantation.

Cell Types	Percentage (%)	
	Saline-injected controls	Microcapsule-implanted
Monocytes/Macrophages	32.8 \pm 3.9	43.5 \pm 4.5*
Eosinophils	0.3 \pm 0.3	1.4 \pm 0.5†
Basophils	2.4 \pm 0.4	1.7 \pm 0.6
Neutrophils	0.2 \pm 0.4	1.0 \pm 0.3†
Lymphocytes	1.8 \pm 1.2	3.4 \pm 1.2§
Others	62.5 \pm 4.8	49.0 \pm 5.4‡

§p<0.05

†p<0.01

*p<0.001

‡p<0.0001

Legend to figures

Figure 1: Microcapsule interference in RT-PCR. **A)**- GAPDH amplification from a control fat pad where 1000 microcapsules were added just before total RNA isolation. Thirty PCR cycles were performed. Lane 1: fat pad alone (GAPDH positive control); lane 2: fat pad + microcapsules; lane 3: -RT control and lane 4: PCR negative control. **B)**- CAT amplification where microcapsule components were added prior to cDNA synthesis (lanes 2-4) and PCR amplification (lanes 5-7). Thirty PCR cycles were performed. Lane 1: Cat control RNA (positive control); lane 2: Cat control RNA + 5 μ L of 0.05% poly-L-lysine; lane 3: Cat control RNA + 5 μ L 0.18% alginate; lane 4: Cat control RNA + 5 μ L of 0.05% poly-L-lysine + 5 μ L 0.18% alginate; lane 5: Cat control cDNA + 5 μ L of 0.05% poly-L-lysine; lane 6: Cat control cDNA + 5 μ L 0.18% alginate; lane 7: Cat control cDNA + 5 μ L of 0.05% poly-L-lysine + 5 μ L 0.18% alginate and lane 8: negative control. **C)**- GAPDH amplification from a digested fat pad 14 days after microcapsules implantation. The microcapsules were removed from the cellular suspension prior to RNA isolation. Twenty five PCR cycles were performed. Lanes 1 to 6: serial 10-fold dilutions of a microcapsule-implanted and digested fat pad cDNA preparation; lane 7: PCR negative control; lanes 8 to 11: serial 10-fold dilutions of a control fat pad cDNA preparation (positive controls).

Figure 2: A) and B)- Photomicrographs showing cells involved in the pericapsular infiltrates (Wright-Giemsa stain, 100X). These cells remain after digestion of a microcapsule-implanted fat pad and are used for cytokine gene expression analysis by semi-quantitative RT-PCR. M: monocytes/macrophages; B: basophils; E: eosinophils; L: lymphocytes; N: neutrophils. Note that other cells are visible and that no microcapsule are present.

Figure 3: Optimal conditions for semi-quantitative RT-PCR. **A)**- Determination of the linear amplification range of GAPDH and TGF- β ₁ from a control digested fat pad. **B)**- Linear regression of the PCR products of GAPDH and TGF- β ₁ against the initial number of cDNA copies used in the amplification. Thirty three PCR cycles were performed.

Figure 4: Relative TGF- β ₁ gene expression levels 14 days after implantation of microcapsules. Data of semi-quantitative RT-PCR are expressed as the ratio of TGF- β ₁ amplification products (in cpm) on the GAPDH amplification products (in cpm). Thirty three PCR cycles were performed.

Figure 1 A)

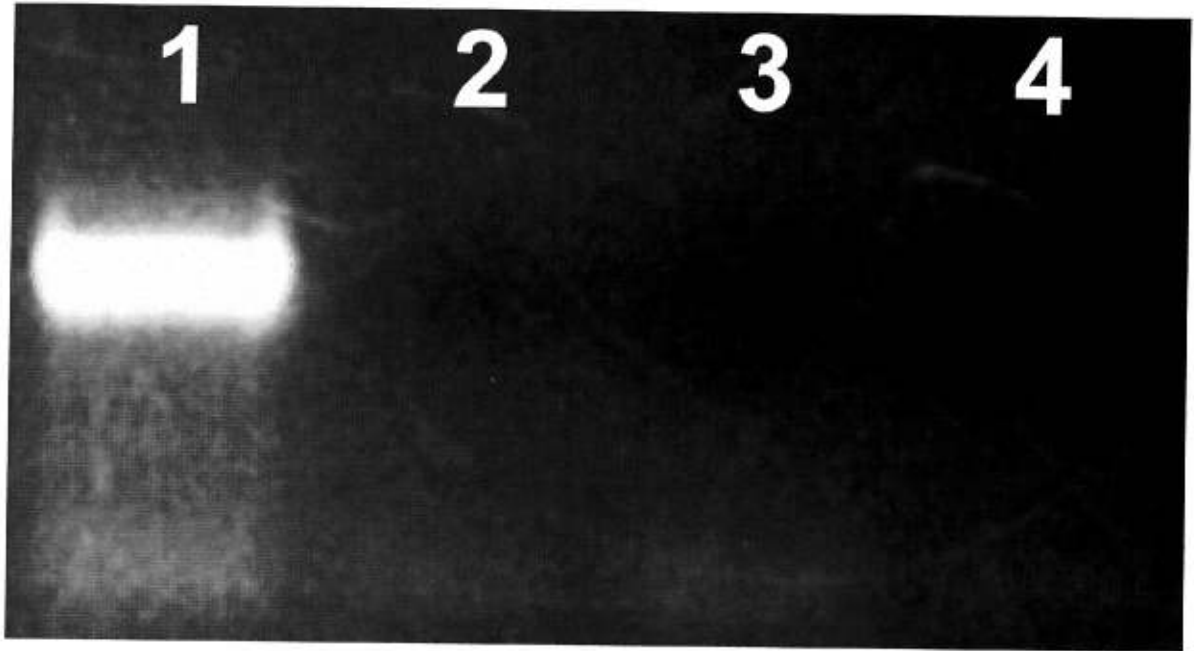


Figure 1 B)

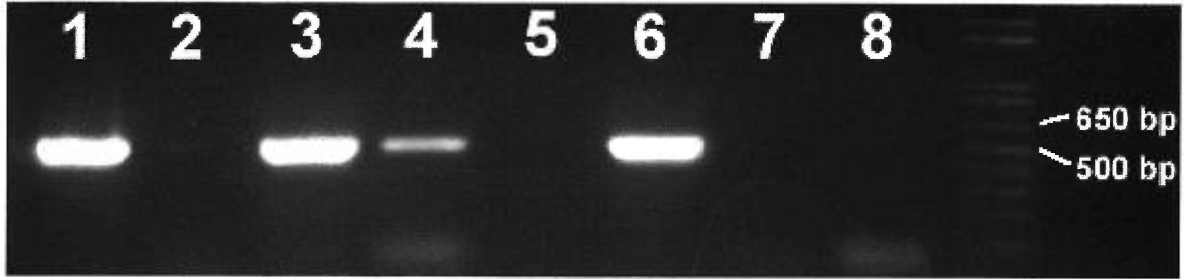


Figure 1 C)

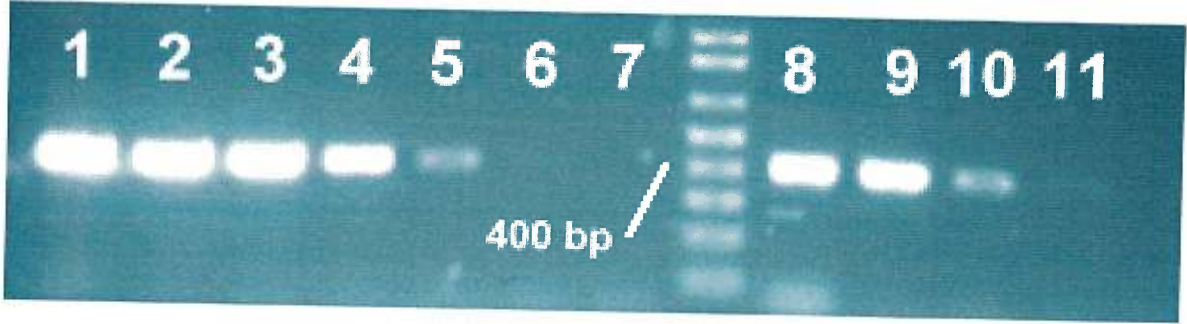


Figure 2 A)

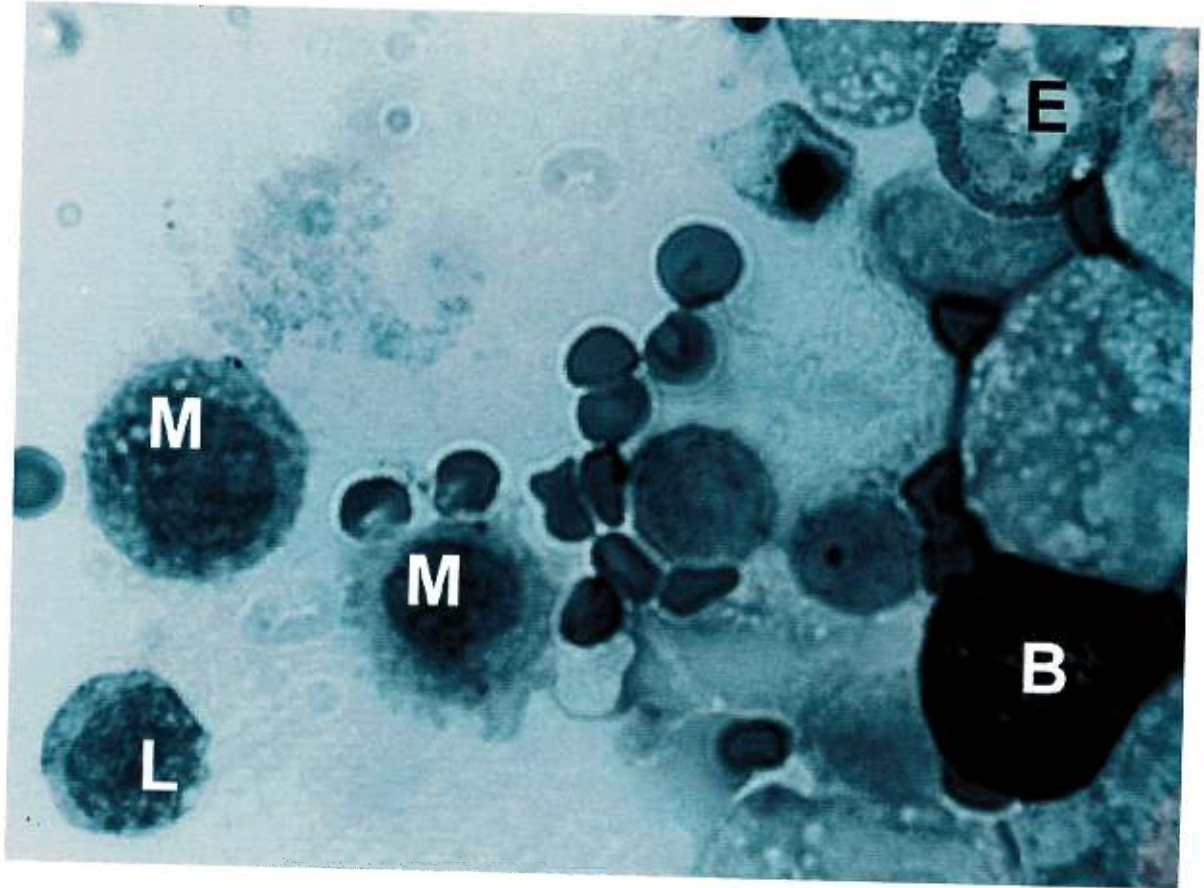


Figure 2 B)

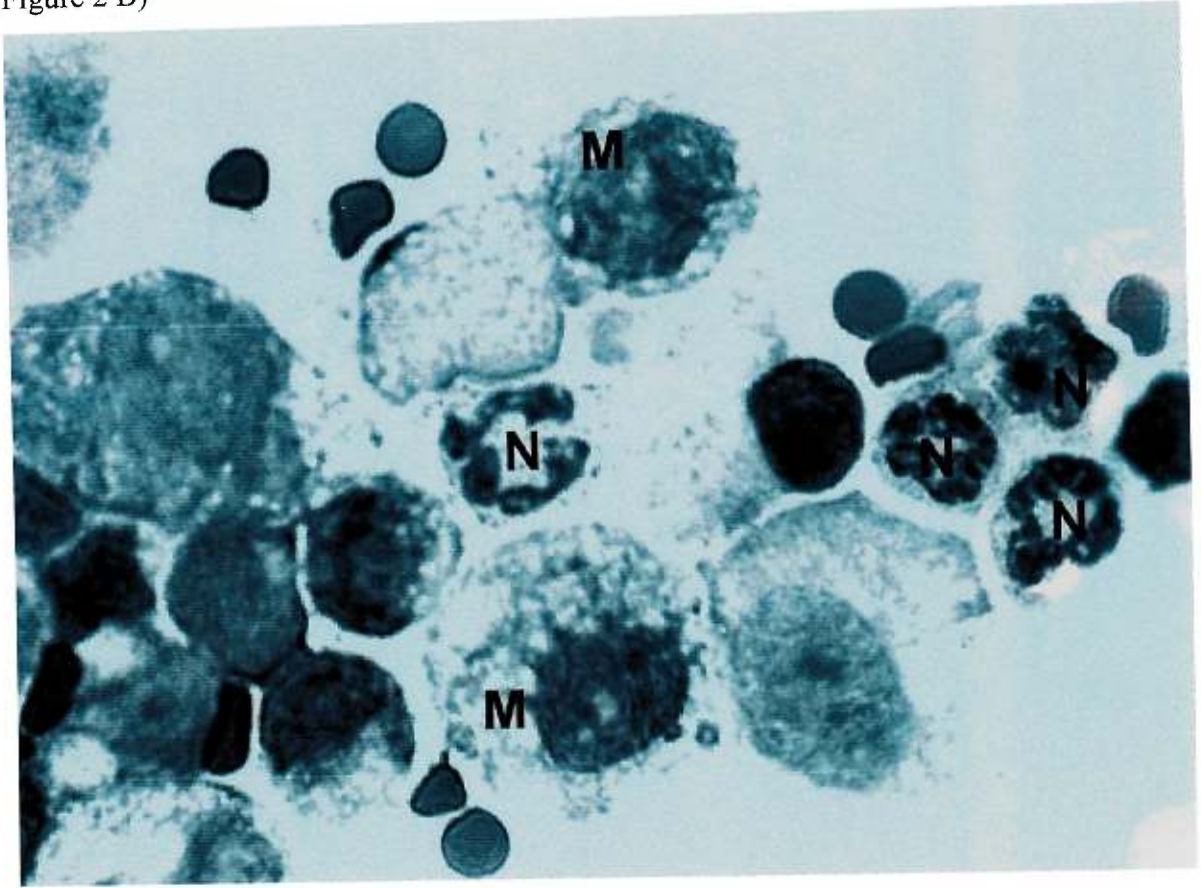


Figure 3 A)

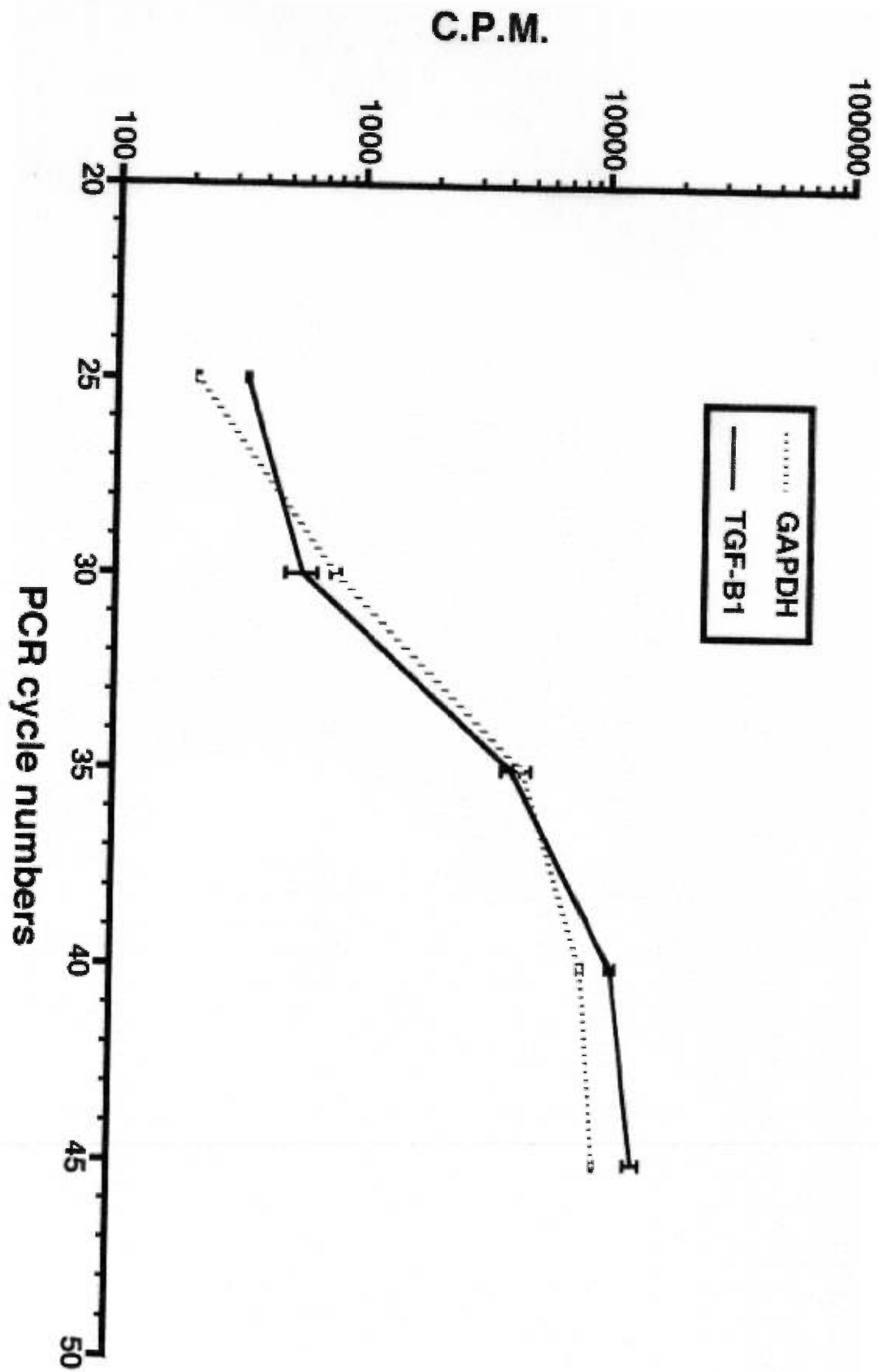


Figure 3 B)

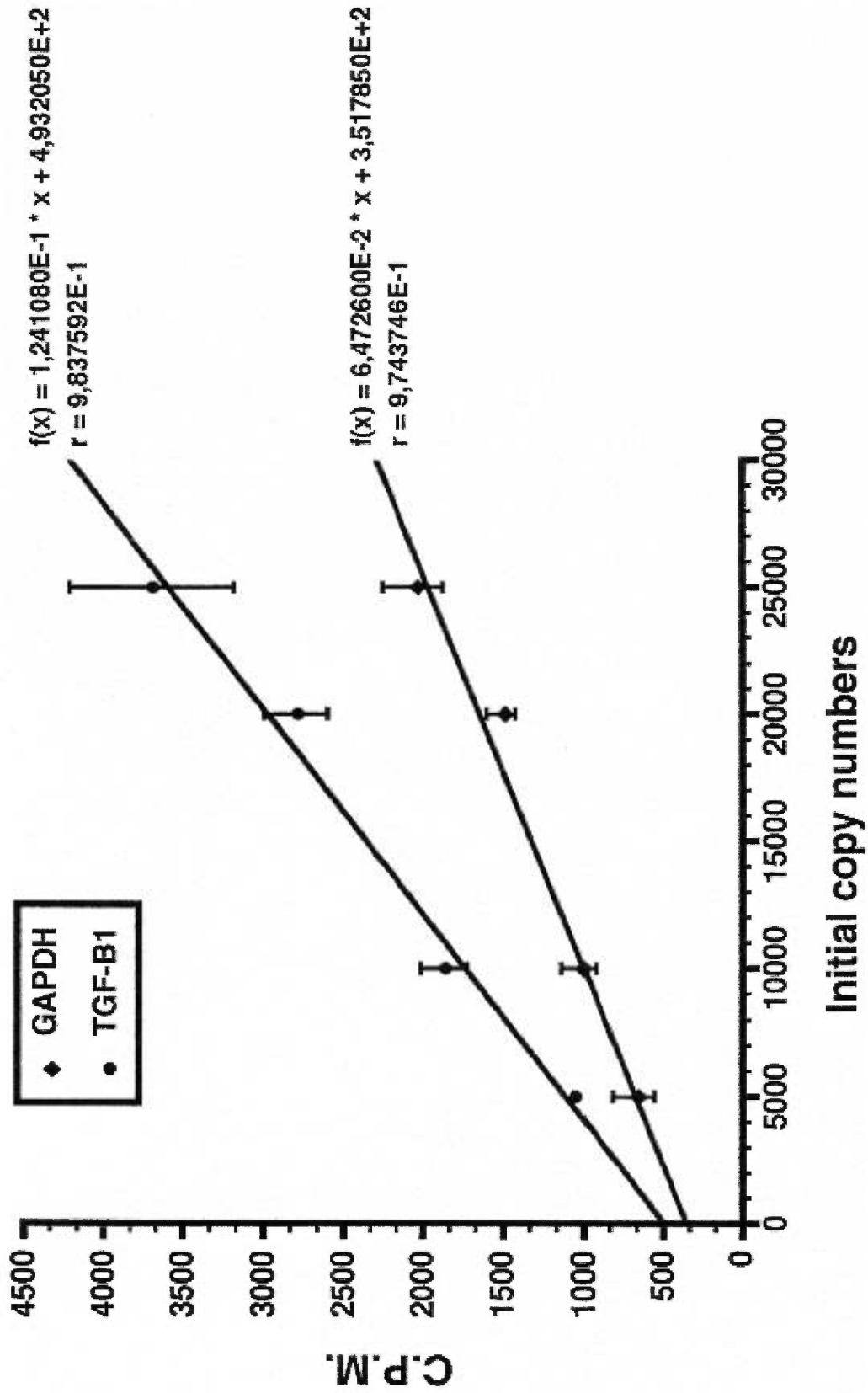
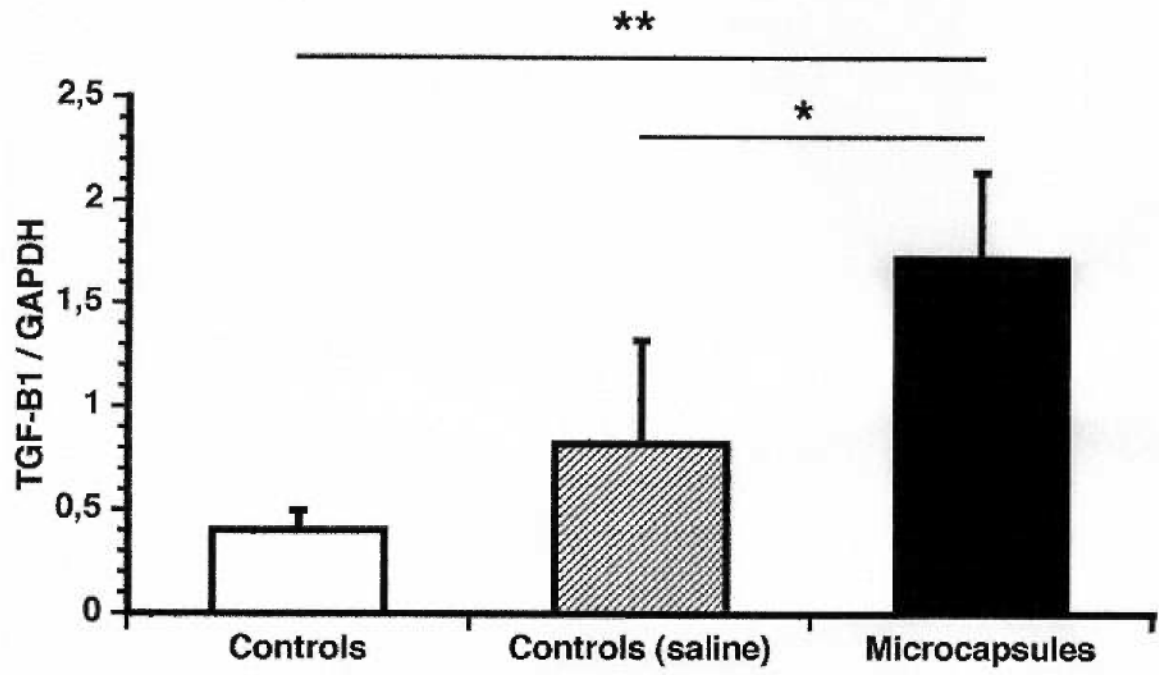


Figure 4



* $p < 0,01$

** $p < 0,0001$

Footnotes

^a Kelco, Clark, NJ

^b Sigma, St-Louis, MO

^c Life Technologies, Burlington, ON

^d Perkin Elmer Canada, Montréal, QC

^e Boehringer Mannheim, Laval, QC

^f Milton Roy, Rochester, NY

^g Pharmacia Biotech, Baie D'Urfé, QC

^h Wallace, Turku, Finland

3- Discussion

La plupart des observations sur la biocompatibilité des microcapsules a été effectuée dans le cadre d'expériences de transplantation intrapéritonéale d'îlots microencapsulés (Lum, 1992). Quelques méthodes pour étudier, *in vivo*, la biocompatibilité des microcapsules ont été développées: **1)**- l'observation histologique des microcapsules récupérées suite à l'implantation dans la cavité péritonéale (De Vos, 1996a); **2)**- l'implantation sous la capsule rénale (Klock, 1994) et **3)**- l'implantation dans les coussins graisseux épидидymaires (CGE) (Pariseau, 1995). Le choix du site d'implantation pour les études de biocompatibilité est très important. La cavité péritonéale et l'espace sous la capsule rénale ont l'avantage de représenter des sites de transplantation d'îlots microencapsulés. Cependant, la distribution des microcapsules dans la cavité péritonéale n'est pas uniforme (ce qui favorise un biais de sélection), le taux de récupération des microcapsules dans le péritoine est faible et la procédure d'implantation sous la capsule rénale est assez difficile. De plus, cette procédure implique que les îlots soient d'abord immobilisés dans un coagulum de plasma, lequel pourrait susciter une réaction de l'hôte. L'implantation des microcapsules dans les CGE représente une alternative intéressante puisque la méthode d'implantation est facile, efficace et le taux de récupération des microcapsules est $> 90 \%$ et ce, sans biais de sélection (Pariseau, 1995). De plus, dans ce site, un système quantitatif pour l'évaluation de la réaction de fibrose péri capsulaire a été développé et validé (Pariseau, 1995). La biocompatibilité de différents types de microcapsules a pu être étudiée et comparée (Robitaille, 1999b).

La première étape, dans l'étude de la réaction de l'hôte contre les microcapsules (RHM), est l'analyse histologique des différentes populations cellulaires impliquées (Weber, 1990, 1994; Wijsman, 1992; Fritschy, 1994). Cependant, les connaissances et le potentiel d'intervention, découlant de l'information acquise grâce à l'application de cette méthodologie, demeurent limités.

Les cytokines jouent un rôle important dans la communication intercellulaire. Certaines possèdent un pouvoir chémoattractant et mitogénique pour les cellules du système immunitaire et pour les fibroblastes; elles peuvent stimuler ou inhiber la prolifération

cellulaire, la relâche de médiateurs, la synthèse de composantes de la matrice extracellulaire et l'expression d'enzymes impliquées dans le métabolisme du tissu conjonctif (Kovacs, 1991). L'étude du profil d'expression des cytokines suite à l'implantation des microcapsules pourrait s'avérer très importante pour la compréhension des mécanismes de la RHM. Le but de nos travaux est d'étudier le rôle et la cinétique d'expression des cytokines impliquées dans la RHM. Cette recherche requiert l'emploi d'une technique sensible et relativement simple pouvant être appliquée à plusieurs échantillons. La méthode du RT-PCR semi-quantitatif est une technique simple et couramment utilisée pour l'analyse de l'expression des gènes. Cette technique est plus sensible que l'immunobuvardage de type "northern" et que la technique de protection contre les ribonucléases (RPA).

Bien que le modèle d'implantation dans les CGE se prête parfaitement à l'analyse histologique de la biocompatibilité des microcapsules, des difficultés particulières ont été rencontrées lors d'études préliminaires utilisant ce modèle pour l'analyse de l'expression, par RT-PCR, des cytokines impliquées dans la RHM: **1)**- les microcapsules d'alginate-poly-L-lysine-alginate inhibent la réaction de RT-PCR et **2)**- l'utilisation de tissus adipeux nécessite une étape supplémentaire dans l'isolement de l'ARN total pour éliminer le surplus de lipides. Dans le but de régler le problème de l'interférence des microcapsules dans la réaction de RT-PCR, nous avons d'abord évalué plusieurs techniques d'isolement de l'ARN sans réussir à obtenir un signal positif. Nous avons donc entrepris une étude systématique visant à identifier les étapes de la réaction de RT-PCR qui sont inhibées et la ou les composantes des microcapsules responsables de cette inhibition. Les résultats de cette étude ont clairement démontré que la poly-L-lysine (PLL), et non l'alginate, est responsable de l'inhibition de la réaction de synthèse de l'ADNc et de la réaction de PCR. Ces données confirment une caractéristique de la PLL qui a la particularité de lier fortement les acides nucléiques (Nicola, 1979). De plus, elle est utilisée pour lier des sondes d'ADN (Degols, 1992) et servir de véhicule pour le transfert d'ADN dans la thérapie génétique (Zhou, 1991).

Une méthode de digestion enzymatique des CGE a donc été développée pour permettre la séparation des microcapsules, des cellules adipeuses et des cellules impliquées dans la RHM. Ainsi, la réaction de RT-PCR a pu être effectuée, sans interférence de la part de la PLL, à partir de l'ARN total des cellules isolées. De plus, les cellules adipeuses et les lipides,

qui flottent à la surface de l'échantillon, sont facilement éliminés. La technique de digestion enzymatique permet d'isoler, d'identifier et de quantifier les différentes populations cellulaires impliquées dans la RHM. Ainsi des décomptes cellulaires, effectués sur une fraction des cellules isolées 14 jours après-implantation de microcapsules dans les CGE, ont permis d'observer l'augmentation de la proportion des macrophages, éosinophiles, neutrophiles et lymphocytes. Ces résultats confirment les observations histologiques qualitatives où les macrophages et les fibroblastes constituaient les principaux types cellulaires impliqués dans la fibrose péricapsulaire (Pariseau, 1995). Fritschy avait déjà démontré que des fibroblastes, fibrocytes, cellules géantes multinucléées, macrophages et granulocytes étaient impliqués dans la réaction péricapsulaire causant le rejet d'îlots microencapsulés transplantés dans la cavité péritonéale de rats diabétiques (Fritschy, 1994). Plusieurs groupes ont aussi démontré l'implication des lymphocytes T-auxiliaires dans la réaction péricapsulaire qui se développe suite à l'implantation de microcapsules dans la cavité péritonéale de souris NOD (Weber, 1990, 1994) et de rats BB (Wijsman, 1992). Dans un modèle de xénogeffe (îlots de porcs transplantés dans la cavité péritonéale de rats Lewis), une activation des lymphocytes T et des macrophages a été observée et la présence des microcapsules n'a fait que retarder cette activation de quelques jours (Siebers, 1998). L'étude des populations cellulaires impliquées dans les réactions péricapsulaires est essentielle car elle permet de déterminer si la RHM se rapproche d'une réaction à corps étrangers et/ou d'une réaction humorale.

Bien que la méthode du RT-PCR semi-quantitatif est une technique simple et couramment utilisée pour l'analyse de l'expression des gènes, plusieurs précautions ont été prises pour s'assurer de la précision et de la fiabilité des résultats: **1)**- utilisation des mêmes réactifs, appareils et protocoles; **2)**- optimisation des conditions de réaction pour chaque paire d'oligonucléotides (amorces pour la réaction de PCR); **3)**- utilisation d'un gène dont l'expression est constitutive et stable (GAPDH) comme standard interne et **4)**- quantification des produits de l'amplification alors que la réaction de PCR est dans la phase linéaire de l'amplification. Ainsi, une corrélation, entre le nombre initial de copies d'ADNc et la quantité finale de produits d'amplification, a pu être établie. De plus, grâce aux conditions optimales de réaction et à la précision des résultats, une différence significative dans l'expression relative du TGF- β_1 , entre des cellules provenant des CGE implantés et des cellules des CGE

contrôles, a pu être observée au temps étudié, soit 14 jours après l'implantation.

Dans le but d'évaluer les biomatériaux composant les microcapsules, certains chercheurs ont coincubé de l'alginate et des microcapsules avec des monocytes ou des macrophages provenant de lignées cellulaires. Dans ces essais, la mesure par ELISA de cytokines, tel que l'IL-1, l'IL-5, l'IL-6 et le TNF- α , libérées dans le surnageant, servait d'indice d'activation des monocytes et des macrophages (Otterlei, 1991; Soon-Shiong, 1991; Espevik, 1993; Pueyo, 1993). Ces méthodes *in vitro* permettent:

- 1)- l'étude d'une population cellulaire spécifique;
- 2)- l'étude d'un mécanisme particulier et
- 3)- l'évaluation de la biocompatibilité de plusieurs matériaux entrant dans la fabrication des microcapsules.

Cependant, ces méthodes ne peuvent pas être utilisées pour étudier les interactions complexes entre les différentes populations cellulaires et pour étudier l'évolution dans le temps de la RHM.

Les méthodes *in vivo* permettent d'observer globalement la réaction de l'organisme suite à l'implantation de microcapsules. De plus, les méthodes *in vivo* sont essentielles pour confirmer les résultats obtenus à l'aide des méthodes *in vitro*. En utilisant notre méthode *in vivo*, une augmentation significative de l'expression du TGF- β_1 a été observée suite à l'implantation de microcapsules dans les CGE. La surexpression du TGF- β_1 , un puissant stimulateur de l'expression du collagène (Kovacs, 1991; Pierce, 1992; Border, 1994; Mutsaers, 1997), pourrait expliquer les résultats histologiques qui démontrent l'accumulation du collagène en périphérie des microcapsules (fibrose péricapsulaire) (Fritschy, 1994; Pariseau, 1995).

Grâce à la méthode que nous avons mise au point, la cinétique d'expression du TGF- β_1 pourra être établie. L'initiation de la RHM pourra être étudiée en mesurant l'expression des cytokines proinflammatoires comme l'IL-1 et le TNF- α . La réaction plus tardive de fibrose pourra être caractérisée en étudiant l'expression des cytokines fibrogéniques comme le FGF et le PDGF. La contribution réelle des différentes populations cellulaires impliquées dans la RHM pourra être établie. En effet, la méthode de mesure de l'expression des cytokines, par RT-PCR semi-quantitatif, pourra être répétée sur les populations cellulaires isolées par cytométrie en flux ou sur des lignées cellulaires spécifiques. Pour compléter les études sur le

rôle des cytokines dans l'initiation et le développement de la RHM, des techniques d'hybridation *in situ*, d'immunohistochimie et/ou des tests ELISA pourront aussi être employés. Finalement, pour confirmer le rôle des cytokines dont l'expression de l'ARNm est modulée dans la RHM, des expériences d'inhibition et de stimulation de l'expression pourront être effectuées.

4- Conclusions

La méthode développée pour mesurer, par RT-PCR semi-quantitatif, l'expression des gènes des cytokines impliquées dans la réaction de l'hôte contre les microcapsules (RHM) offre plusieurs avantages: **1)**- l'identification des cellules impliquées dans l'infiltration cellulaire en périphérie des microcapsules; **2)**- la séparation des microcapsules, qui interfèrent dans la réaction de RT-PCR, avant l'isolement des acides nucléiques; **3)**- la fiabilité, précision et sensibilité de la quantification relative de l'expression des gènes des cytokines et **4)**- l'étude simultanée de plusieurs échantillons.

En utilisant cette méthode et le modèle d'implantation de microcapsules dans les coussins graisseux épидидymaires de rats Wistar, nous avons démontré la surexpression de l'ARNm du TGF- β_1 dans les cellules infiltrées en périphérie des microcapsules. Ceci suggère que le TGF- β_1 joue un rôle dans la pathogénèse de la RHM.

La méthode développée pourra être utilisée pour étudier le rôle des autres cytokines impliquées et définir les mécanismes de la RHM. La compréhension de ces mécanismes est essentielle pour la conception de méthodes pour l'évaluation, la sélection et le développement de matériaux plus biocompatibles ou pour concevoir des traitements, locaux ou systémiques, pour contrôler la réaction péri capsulaire.

Bibliographie

Adams, T.E., Alpert, S. & Hanahan, D.

Non-tolerance and autoantibodies to a transgenic self antigen expressed in pancreatic beta cells.

Nature, 325: 223-228, 1987.

Aiello, L.P., Cavallerano, J. & Bursell, S.-E.

Diabetic eye disease.

Endocrinology and Metabolism Clinics of North America, 25: 271-291, 1996.

American Diabetes Association.

Economic consequences of diabetes mellitus in the U.S. in 1997.

Diabetes Care, 21: 296-309, 1998.

Amos, A.F., McCarty, D.J. & Zimmet, P.

The rising global burden of diabetes and its complications: estimates and projections to the year 2010.

Diabetic Medicine, 14: S7-S85, 1997.

Arauz-Pacheco, C. & Raskin, P.

Hypertension in diabetes mellitus.

Endocrinology and Metabolism Clinics of North America, 25: 401-423, 1996.

Arnold, M.A.

Non-invasive glucose monitoring.

Current Opinion in Biotechnology, 7: 46-49, 1996.

Bach, J.-F.

Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease.

Endocrine Reviews, 15: 516-542, 1994.

Bach, J.-F.

L'origine immunitaire du diabète.

La Recherche, 20: 1206-1215, 1989.

Bach, J.-F.

Autoimmunity and type I diabetes.

Trends. Endocrinol. Metab., 8: 71-74, 1997.

Baekkeskov, S., Aanstoot, H.J., Christgau, S., Restz, A., Solimena, M., Cascalho, M., Folli, F., Richter-Olesen, H. & Camilli, P.D.

Identification of the 64K autoantigen in insuline-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase.

Nature, 347: 151-156, 1990.

Barnett, A.H. & Owens, D.R.

Insulin analogues.

The Lancet, 349: 47-51, 1997.

Barr, L.C., Carter, R.L. & Davies, A.J.S.

Encapsulation of tumours as a modified wound healing response.

The Lancet, 2: 135-137, 1988.

Bell, G.I., Horita, S. & Karam, J.H.

A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus.

Diabetes, 33: 176-183, 1984.

Bendelac, A., Carnaud, C., Boitard, C. & Bach, J.-F.

Syngenic transfer to autoimmune diabetes from NOD mice to healthy neonates: requirement for both L3T4⁺ and Lyt-2⁺ T cells.

Journal of Experimental Medicine, 166: 823-832, 1987.

Bendtzen, K., Mandrup-Poulsen, T., Nerup, J., Nielsen, J.H., Dinarello, C.A. & Svenson, M.

Cytotoxicity of human pI 7 Interleukin-1 for pancreatic islets of Langerhans.
Science, 232: 1545-1547, 1986.

Benyon, C.R., Iredale, J.P., Goddard, S., Winwood, P.J. & Arthur, M.J.P.

Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 is increased in fibrotic human liver.

Gastroenterology, 110: 821-831, 1996.

Blackshear, P.J., Rohde, T.D., Prosl, F. & Buchwald, H.

The implantable infusion pump: a new concept in drug delivery.

Medical Progress through Technology, 6: 149-161, 1979.

Boitard, C., Yasunami, R., Dardenne, M. & Bach, J.-F.

T-cell mediated inhibition of the transfer of autoimmune diabetes in NOD mice.

Journal of Experimental Medicine, 169: 1669-1680, 1989.

Bonifacio, E., Lampasona, V., Genovese, S., Ferrari, M. & Bosi, E.

Identification of protein tyrosine phosphatase-like IA2 (islet cell antigen 512) as the insulin-dependent diabetes-related 37/40K autoantigen and a target of islet-cell antibodies.

The Journal of Immunology, 155: 5419-5426, 1995.

Border, W.A. & Noble, N.A.

Transforming growth factor B in tissue fibrosis.

The New England Journal of Medicine, 331: 1286-1292, 1994.

Bottazzo, G.F.

Beta-cell damage in diabetic insulinitis: are we approaching a solution?

Diabetologia, 26: 241-249, 1984.

Bottazzo, G.F., Florin-Christensen, A. & Doniach, D.

Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies.

The Lancet, 1279-1282, 1974.

Bottazzo, G.F., Dean, B.M., McNally, J.M., MacKay, E.H., Swift, P.G.F. & Gamble, D.R.

In situ characterization of autoimmune phenomena and expression of HLA molecules in the pancreas in diabetic insulinitis.

The New England Journal of Medicine, 313: 353-360, 1985.

Bougneres, P.F., Carel, J.C., Castino, L., Boitard, C., Gardin, J.P., Landais, P., Hors, J.,

Mihatsch, M.J., Paillard, M., Chaussain, J.L. & Bach, J.-F.

Factors associated with early remission of type 1 diabetes in children treated with cyclosporin.

The New England Journal of Medicine, 318: 663-670, 1982.

Bowen, K.M. & Lafferty, K.J.

Reversal of diabetes by allogeneic islet transplantation without immunosuppression.

Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science, 58: 441-447, 1980.

Brecher, A.S., Hinko, A. & Twining, S.S.

A proposed sequence of reactions leading to collagen biosynthesis, fibrosis, and hypertension in alcoholics.

Journal of Investigative Medicine, 44: 36-39, 1996.

Brunetti, P., Cobelli, C., Cruciani, P., Fabietti, P.G., Filippucci, F., Santeusano, F. & Sarti, E.

A simulation study on a self-tuning portable controller of blood glucose.

The International Journal of Artificial Organs, 16: 51-57, 1993.

Burge, M.R. & Schade, D.S.

Insulins.

Endocrinology and Metabolism Clinics of North America, 26: 575-598, 1997.

Cahill, G.F.J. & McDevitt, H.O.

Insuline-dependent diabetes mellitus: the initial lesion.

The New England Journal of Medicine, 304: 1454-1465, 1981.

Calafiore, R.

Perspectives in pancreatic and islet cell transplantation for the therapy of IDDM.

Diabetes Care, 20: 889-896, 1997.

Camilleri, M.

Gastrointestinal problems in diabetes.

Endocrinology and Metabolism Clinics of North America, 25: 361-378, 1996.

Campbell, I.L., Oxbrow, L., Koulmanda, M. & Harrison, L.C.

IFN-gamma induces islet cell MHC antigens and enhances autoimmune, streptozotocin-induced diabetes in the mouse.

The Journal of Immunology, 140: 1111-1116, 1988.

Chance, R.E., Root, M.A. & Galloway, J.A.

The immunogenicity of insulin preparations.

Acta Endocrinologica, 83: Suppl. 205 185-219, 1976.

Chang, T.M.S.

Semipermeable microcapsules.

Science, 146: 524-525, 1964.

Chatenoud, L., Thervet, E., Primo, J. & Bach, J.-F.

Anti-CD3 antibody induces long-term remission of overt autoimmunity in nonobese diabetic mice.

Proceeding of the National Academy of Sciences of USA, 91: 123-127, 1994.

Chicheportiche, D. & Reach, G.

In vitro kinetics of insulin release by microencapsulated rat islets: effect of the size of the microcapsules.

Diabetologia, 31: 54-57, 1988.

Chick, W.L., Like, A.A., Lauris, V., Galletti, P.M., Richardson, P.D., Panol, G., Mix, T.W. & Colton, C.K.

A hybrid artificial pancreas.

Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs., 21: 8-14, 1975.

Christianson, S.W., Shultz, L.D. & Leiter, E.H.

Adoptive transfer of diabetes into immunodeficient NOD-scid/scid mice: relative contributions of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells from diabetic versus prediabetic NOD.NON-Thy-1a donors.

Diabetes, 42: 44-55, 1993.

Cole, D.R., Waterfall, M., McIntyre, M. & Baird, J.D.

Microencapsulated islet grafts in the BB/E rat: a possible role for cytokines in graft failure.

Diabetologia, 35: 231-237, 1992.

Colton, C.K.

Implantable biohybrid artificial organs.

Cell Transplantation, 4: 415-436, 1995.

Colton, C.K. & Avgoustiniatios, E.S.

Bioengineering in the development of the hybrid artificial pancreas.

Journal of Biomechanical Engineering, 113: 152-170, 1991.

Dardenne, M., Lepault, F., Bendelac, A. & Bach, J.-F.

Acceleration of the onset of diabetes in NOD mice by thymectomy at weaning.

European Journal of Immunology, 19: 889-895, 1989.

Darquy, S. & Reach, G.

Immunoisolation of pancreatic beta cells by microencapsulation: an in vitro study.

Diabetologia, 28: 776-780, 1985.

Darquy, S., Chicheportiche, D., Capron, F., Boitard, C. & Reach, G.

Comparative study of microencapsulated rat islets implanted in different diabetic models in mice.

Hormones and Metabolic Research - Supplement, 25: 209-213, 1990.

Darquy, S., Pueyo, M.E., Capron, F. & Reach, G.

Complement activation by alginate-polylysine microcapsules used for islet transplantation.

Artificial Organs, 18: 898-903, 1994.

Davalli, A.M., Scaglia, L., Zangen, D.H., Hollister, J., Bonner-Weir, S. & Weir, G.C.

Vulnerability of islets in the immediate posttransplantation period: dynamic changes in structure and function.

Diabetes, 19: 1161-1167, 1996.

Davidson, J.K. & DeBra, D.W.

Immunologic insuline resistance.

Diabetes, 27: 307-318, 1978.

Davies, J.L., Kawauchi, Y., Bennet, S.T., Copeman, J.B., Cordell, H.J., Pritchard, L.E.,

Reed, P.W., Gough, S.C.L., Jenkins, S.C., Palmer, S.M., Balfour, K.M., Rowe, B.R.,

Farrall, M., Barnett, A.H., Bain, S.C. & Todd, J.A.

A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes.

Nature, 371: 130-136, 1994.

Davies, M., Kastner, S. & Thomas, G.J.

Proteoglycans: their possible role in renal fibrosis.

Kidney International, 49: s55-s60, 1996.

DCCT Research Group.

The effect of intensive diabetes treatment on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus.

The New England Journal of Medicine, 329: 977-986, 1993.

Degols, G., Leonetti, J.P., Benkirane, M., Devaux, C. & Lebleu, B.

Poly(L-lysine)-conjugated oligonucleotides promote sequence-specific inhibition of acute HIV-1 infection.

Antisense Res. Dev., 2: 293-301, 1992.

Dellagiacomma, G., Rossi, M., Radin, S. & Vecchioni, R.

Isolated human islet transplanted into diabetic nude mice after ultraviolet B irradiation.

Transplantation Proceedings, 24: 2853, 1992.

Desmouliere, A. & Gabbiani, G.

Myofibroblast differentiation during fibrosis.

Experimental Nephrology, 3: 134-139, 1995.

De Vos, P., Wolters, G.H.J. & Van Schilfgaarde, R.

Possible relationship between fibrotic overgrowth of alginate-polylysine-alginate microencapsulated pancreatic islets and the microcapsule integrity.

Transplantation Proceedings, 26: 782-783, 1994.

De Vos, P., De Haan, B.J., Pater, J. & Van Schilfgaarde, R.

Association between capsule diameter, adequacy of encapsulation, and survival of microencapsulated rat islet allografts.

Transplantation, 62: 893-899, 1996a.

De Vos, P., De Haan, B., Wolters, G.H.J. & Van Schilfgaarde, R.

Factors influencing the adequacy of microencapsulation of rat pancreatic islets.

Transplantation, 62 (7): 888-893, 1996b.

De Vos, P., De Hann, B.J., Wolters, G.H.J., Strubbe, J.H. & Van Schilfgaarde, R.
Improved biocompatibility but limited graft survival after purification of alginate for
microencapsulation of pancreatic islets.

Diabetologia, 40: 262-270, 1997.

Dionne, K.E., Colton, C.K. & Yarmush, M.L.

Effect of oxygen on isolated pancreatic tissue.

Transactions of the American Society for Artificial Organ, 35: 739-741, 1989.

Duckworth, W.C., Saudek, C.C. & Henry, R.R.

Why intraperitoneal delivery of insulin with implantable insulin pump?

Diabetes, 41: 657-661, 1992.

Duncan, J.L., Heys, S.D., Thomson, A.W., Simpson, J.G. & Whiting, P.H.

Influence of the hepatic drug-metabolizing enzyme-inducer phenobarbitone on cyclosporine
nephrotoxicity and hepatotoxicity in renal-allografted rats.

Transplantation, 45: 693-697, 1988.

Eddy, A.A.

Interstitial macrophages as mediators of renal fibrosis.

Experimental Nephrology, 3: 76-79, 1995.

Eghbali-Fatourehchi, G., Sieck, G.C., Prakash, Y.S., Maercklein, P., Gores, G.J. &
Fitzpatrick, L.A.

Type I procollagen production and cell proliferation is mediated by transforming growth
factor-B in a model of hepatic fibrosis.

Endocrinology, 137: 1894-1903, 1996.

Eisenbarth, G.S. & Stegall, M.

Islet and pancreatic transplantation. Autoimmunity and alloimmunity.

The New England Journal of Medicine, 335: 888-890, 1996.

Espevik, T., Otterlei, M., Skjak-Braek, G., Ryan, L., Wright, S.D. & Sundan, A.
The involvement of CD14 in stimulation of cytokine production by uronic acid polymers.
European Journal of Immunology, 23: 255-261, 1993.

Fan, M.-Y., Lum, Z.-P., Fu, X.-W., Lévesque, L., Tai, I.T. & Sun, A.M.
Reversal of diabetes in BB rats by transplantation of encapsulated pancreatic islets.
Diabetes, 39: 519-522, 1990.

Farney, A.C., Najarian, J.S., Nakhled, R.E., Lloveras, G., Field, M.J., Gores, P.F. &
Sutherland, D.E.R.
Autotransplantation of dispersed pancreatic islet tissue combined with total or near-total
pancreatectomy for treatment of chronic pancreatitis.
Surgery, 110: 427-439, 1991.

Faustman, D.
Antibodies directed to MHC determinants for transplantation.
Dans: *Pancreatic islet transplantation*. Vol. II.
eds: Lanza, R.P., Chick, W.L., Austin, T.X. & Landes, R.G.; R.G. Landes Company,
Austin, p. 129-139, 1994.

Feutren, G., Papoz, L., Assan, R., Vialettes, B., Karsenty, G., Vexiau, P., Du Rostu, H.,
Rodier, M., Sirmai, J., Lallemand, A. & Bach, J.-F.
Cyclosporin increases the rate and length of remissions in insulin-dependent diabetes of
recent onset: results of a multicentre double-blind trial.
The Lancet, 2: 119-124, 1986.

Flesch, B.K., Entenmann, H., Milde, K., Bretzel, R.G. & Federlin, K.
Islet transplantation in experimental diabetes of the rat. XIII. Cryopreservation reduces
MHC class II but not class I antigens of rat pancreatic islets.
Hormones and Metabolic Research, 23: 1-6, 1991.

Fontes, P., Rao, A.S., Demetris, A.J., Zeevi, A., Trucco, M., Carroll, P., Rybka, W., Rudent, W.A., Ricordi, C., Dodson, F., Shapiro, R., Tzakis, A., Todo, S., Abu-Elmag, K., Jordan, M., Fung, J.J. & Starzl, T.E.

Augmentation with bone marrow of donor leukocyte migration for kidney, liver, heart and pancreas islet transplantation.

The Lancet, 344: 151-155, 1994.

Franz, M.J.

Lifestyle modifications for diabetes management.

Endocrinology and Metabolism Clinics of North America, 26: 499-510, 1997.

Fraser, R.B., MacAulay, M.A., Wright, J.R., Sun, A.M. & Rowden, G.

Migration of macrophage-like cells within encapsulated islets of Langerhans maintained in tissue culture.

Cell Transplantation, 4: 529-534, 1995.

Friedman, E.A.

Renal syndromes in diabetes.

Endocrinology and Metabolism Clinics of North America, 25: 293-324, 1996.

Fritschy, W.M., Strubbe, J.H., Wolters, G.H.J. & van Schilfgaarde, R.

Glucose tolerance and plasma insulin response to intravenous glucose infusion and test meal in rats with microencapsulated islet allografts.

Diabetologia, 34: 542-547, 1991.

Fritschy, W.M., De Vos, P., Groen, H., Klatter, F.A., Pasma, A., Wolters, G.H.J. & Van Schilfgaarde, R.

The capsular overgrowth on microencapsulated pancreatic islet grafts in streptozotocin and autoimmune diabetic rats.

Transplantation International, 7: 264-271, 1994.

Garchon, H.J., Luan, J.J., Eloy, L., B, dossa, P. & Bach, J.-F.

Genetic analysis of immune dysfunction in non-obese diabetic (NOD) mice: mapping of a susceptibility locus close to the Bcl-2 gene correlates with increased resistance of NOD T cells to apoptosis induction.

European Journal of Immunology, 24: 380-384, 1994.

Gores, P.F., Najarian, J.S., Stephanian, E., Lloveras, J.J., Kelley, S.L. & Sutherland, D.E.R.
Insulin independence in type I diabetes after transplantation of unpurified islets from single donor with 15-deoxyspergualin.

The Lancet, 341: 19-21, 1993.

Gruessner, A.C., Sutherland, D.E.R. & Gruessner, R.W.G.

Report of the international pancreas transplant registry.

Transplantation Proceedings, 30: 242-243, 1998.

Guymer, R.H. & Mandel, T.E.

Immunosuppression using a monoclonal antibody to ICAM-1 in murine allotransplantation.

Transplantation Proceedings, 24: 218-219, 1992.

Hakim, L.S. & Goldstein, I.

Diabetic sexual dysfunction.

Endocrinology and Metabolism Clinics of North America, 25: 379-400, 1996.

Hallé, J.-P., Leblond, F.A., Landry, D., Fournier, A. & Chevalier, S.

Studies of 300 μm microcapsules: I. Use of Arginine esterase release by microencapsulated prostatic cells as a measure of membrane permeability.

Transplantation Proceedings, 24: 2930-2932, 1992.

Hallé, J.-P., Leblond, F.A., Pariseau, J.-F., Jutras, P., Brabant, M.-J. & Lepage, Y.

Studies on small (<300 μm) microcapsules: II-Parameters governing the production of alginate beads by high voltage electrostatic pulses.

Cell Transplantation, 3: 365-372, 1994.

Hallé, J.-P., Bourassa, S., Leblond, F.A., Chevalier, S., Beaudry, M., Chapdelaine, A., Cousineau, S., Saintonge, J. & Yale, J.-F.

Protection of islets of Langerhans from antibodies by microencapsulation with alginate-poly L-lysine microcapsules.

Transplantation, 55: 350-354, 1993.

Hammer, C., Suckfull, M. & Saumweber, D.

Evolutionary and immunological aspects of xenotransplantation.

Transplantation Proceedings, 24: 2397-2400, 1992.

Hansson, K., Stemme, S., Geng, Y.J. & Holm, J.

An immunocompetent cells and their cytokines play a role in atherogenesis.

Nouvelle Revue Francaise d'Hematologie, 34: Suppl. 543-546, 1992.

Harati, Y.

Diabetes and the nervous system.

Endocrinology and Metabolism Clinics of North America, 25: 325-359, 1996.

Hardy, M.A. & Oluwole, S.F.

Effect of ultraviolet radiation on immunogenicity of tissues and organ allografts.

Transplantation Review, 5: 46-62, 1991.

Hasse, C., Klock, G., Zielke, A., Schlosser, A., Barth, P., Zimmermann, U. & Rothmund, M.

Transplantation of parathyroid tissue in experimental hypoparathyroidism: in vitro and in vivo function of parathyroid tissue microencapsulated with a novel amitogenic alginate.

The International Journal of Artificial Organs, 19: 735-741, 1996.

Heinemann, L. & Richter, B.

Clinical pharmacology of human insulin.

Diabetes Care, 16: Suppl. 3 90-100, 1993.

Horcher, A., Zekorn, T., Siebers, U., Klock, G., Frank, H., Houben, R., Bretzel, R.G., Zimmermann, U. & Federlin, K.

Transplantation of microencapsulated islets in rats: Evidence for induction of fibrotic overgrowth by islet alloantigens released from microcapsules.

Transplantation Proceedings, 26: 784-786, 1994.

Howey, D.C., Bowsher, R.R., Brunelle, R.L. & Woodworth, J.R.

[Lys(B28), Pro(B29)]-human insulin: a rapidly absorbed analogue of human insulin.

Diabetes, 43: 396-402, 1994.

Hsu, B.R.S., Ho, Y.S., Fu, S.H., Huang, Y.Y., Chiou, S.C. & Huang, H.S.

Membrane compactness affects the integrity and immunoprotection of Alginate-Poly-L-Lysine-Alginate microcapsules.

Transplantation Proceedings, 27: 3227-3231, 1995.

Hsu, B.R.S., Fu, S.H., Tsai, J.S., Huang, Y.Y., Huang, H.S. & Chang, K.S.S.

The plasminogen-plasmin fibrinolytic system accelerates degradation of alginate-poly-L-lysine-alginate microcapsules in vitro.

Transplantation Proceedings, 29: 1877-1880, 1997.

Hutchings, P., O'Reilly, L., Parish, N.M., Waldmann, H. & Cooke, A.

The use of a non-depleting anti-CD4 monoclonal antibody to re-establish tolerance to beta cells in NOD mice.

European Journal of Immunology, 22: 1913-1918, 1992.

Inoue, K., Gu, Y.-J., Shinohara, S., Kogire, M., Mitsuo, M., Nakai, I., Hayashi, H., Kaji, H., Ushida, K., Maetani, S., Ikada, Y. & Tobe, T.

Experimental xenotransplantation of isolated adult pig islets.

Transplantation Proceedings, 24: 658, 1992.

- Iwata, H., Amemiya, H., Matsuda, T., Takano, H., Hayashi, R. & Akutsu, T.
Evaluation of microencapsulated islets in Agarose gel as bioartificial pancreas by studies of hormone secretion in culture and by xenotransplantation.
Diabetes, 38: Suppl.1 224-225, 1989.
- Jager, S., Menger, M.D., Gohde, W. & Temann, H.
Transplantation of islets of Langerhans in Millipore diffusion chambers.
Transplantation Proceedings, 22: 870, 1990.
- Jaremko, J. & Rorstad, O.
Advances toward the implantable artificial pancreas for treatment of diabetes.
Diabetes Care, 21: 444-450, 1998.
- Jesser, C., Kessler, L., Lambert, A., Belcourt, A. & Pinget, M.
Pancreatic islet macroencapsulation: A new device for the evaluation of artificial membrane.
Artificial Organs, 20: 997-1007, 1996.
- Jordana, M., Ohno, I., Xing, Z. & Gauldie, J.
Cytokines in lung and airways fibrosis.
Regional Immunology, 5: 201-206, 1993.
- Kawaguchi, Y., Kitani, A., Hara, M., Harigai, M., Hirose, T., Suzuki, K., Kawakami, M., Hidaka, T., Ishizuka, T., Kawagoe, M. & Nakamura, H.
Cytokine regulation of Prolyl 4-Hydroxylase production in skin fibroblast cultures from patients with systemic sclerosis: Contribution to collagen synthesis and fibrosis.
The Journal of Rheumatology, 19: 1195-1201, 1992.
- Kendall, D.M. & Robertson, R.P.
Pancreas and islet transplantation. Challenges for the twenty-first century.
Endocrinology and Metabolism Clinics of North America, 26: 611-630, 1997.

Kessler, L., Jesser, C., Lombard, Y., Karsten, V., Belcourt, A., Pinget, M. & Poindron, P.
Cytotoxicity of peritoneal murine macrophages against encapsulated pancreatic rat islets: in vivo and in vitro studies.

Journal of Leukocyte Biology, 60: 729-736, 1996.

Khalil, N., O'Connor, R.N., Flanders, K.C. & Unruh, H.

TGF-B1, but not TGF-B2 or TGF-B3, is differentially present in epithelial cells of advanced pulmonary fibrosis: an immunohistochemical study.

American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 14: 131-138, 1996.

Klock, G., Frank, H., Houben, R., Zekorn, T., Horcher, A., Siebers, U., Wohrle, M., Federlin, K. & Zimmermann, U.

Production of purified alginate suitable for use in immunoisolated transplantation.

Applied Microbiology & Biotechnology, 40: 638-643, 1994.

Klock, G., Pfeffermann, A., Ryser, C., Grohn, P., Kuttler, B., Hahn, H.J. & Zimmermann, U.

Biocompatibility of mannuronic acid-rich alginates.

Biomaterials, 18: 707-713, 1997.

Kockum, I., Wassmuth, R., Holmberg, E., Michelsen, B. & Lernmark, A.

HLA-DQ primarily confers protection and HLA-DR susceptibility in type 1 (insulin-dependent) diabetes studied in population-based affected families and controls.

Am. J. Hum. Genet., 53: 150-167, 1993.

Korbitt, G.S., Elliot, J.F., Ao, Z., Flashner, M., Warnock, G.L. & Rajotte, R.V.

Microencapsulation of neonatal porcine islets: Long-term reversal of diabetes in nude mice and in vitro protection from human complement mediated cytotoxicity.

Transplantation Proceedings, 29: 2128, 1997.

Kovacs, E.J.

Fibrogenic cytokines: the role of immune mediators in the development of scar tissue.
Immunology Today, 12: 17-23, 1991.

Kovacs, E.J. & Dipietro, L.A.

Fibrogenic cytokines and connective tissue production.
The FASEB Journal, 8: 854-861, 1994.

Krane, E.J., Rockoff, M.A., Wallman, J.K. & Wolfsdorf, J.I.

Subclinical brain swelling in children during treatment of diabetic ketoacidosis.
The New England Journal of Medicine, 312: 1147-1151, 1985.

Kroncke, K.D., Brenner, H.H., Rodriguez, M.L., Etzkorn, K., Noack, E.A., Kolb, H. & Kolb-Bachofen, V.

Pancreatic islet cells are highly susceptible towards the cytotoxic effects of chemically generated nitric oxide.
Biochimica et Biophysica Acta, 1182: 221-229, 1993.

Kulseng, B., Thu, B., Espevik, T. & Skjak-Braek, G.

Alginate polylysine microcapsules as immune barrier: permeability of cytokines and immunoglobulins over the capsule membrane.
Cell Transplantation, 6: 387-394, 1997.

Lacy, P.E.

Status of islet cell transplantation.
Diabetes Reviews, 1: 76-92, 1993.

Lacy, P.E. & Kostianovsky, M.

Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas.
Diabetes, 16: 35-39, 1967.

Lacy, P.E., Davie, J.M. & Finke, E.H.

Prolongation of islet allograft survival following in vitro culture (24°C) and a single injection of ALS.

Science, 204: 312-313, 1979.

Lacy, P.E., Hegre, O.D., Gerasimidi-Vazeou, A.N., Gentile, F.T. & Dionne, K.E.

Maintenance of normoglycemia in diabetic mice by subcutaneous xenografts of encapsulated islets.

Science, 254: 1782-1784, 1991.

Lammers, R.L.

Soft Tissue Foreign Bodies.

Annals of Emergency Medicine, 17: 1336-1347, 1988.

Lampeter, E.F., Homberg, M., Quabeck, K., Schaeffer, U.W., Wernet, P., Bertrams, J., Grosse-Wilde, H., Gries, F.A. & Kolb, H.

Transfer of insulin-dependent diabetes between HLA-identical siblings by bone marrow transplantation.

The Lancet, 341: 1243-1244, 1993.

Langberg, C.W., Hauer-Jensen, M., Sung, C.C. & Kane, C.J.M.

Expression of fibrogenic cytokines in rat small intestine after fractionated irradiation.

Radiotherapy & Oncology, 32: 29-36, 1994.

Lanza, R.P., Borland, K.M., Staruk, J.E., Appel, M.C., Solomon, B.A. & Chick, W.L.

Transplantation of encapsulated canine islets into spontaneously diabetic BB/wor rats without immunosuppression.

Transplantation, 131: 637-642, 1992a.

Lanza, R.P., Borland, K.M., Staruk, J.E., Appel, M.C., Solomon, H.A. & Chick, W.L.
Transplantation of encapsulated canine islets into spontaneously diabetic BB/Wor rats
without immunosuppression.

Endocrinology, 131: 637-642, 1992b.

Lanza, R.P., Butler, D.H., Borland, K.M., Harvey, J.M., Faustman, D.L., Solomon, B.A.,
Muller, T.E., Rupp, R.G., Maki, T., Monaco, A.P. & Chick, W.L.

Successful xenotransplantation of a diffusion-based biohybrid artificial pancreas: A study
using canine, bovine, and porcine islets.

Transplantation Proceedings, 24: 669-671, 1992c.

Lanza, R.P., Sullivan, S.J. & Chick, W.L.

Islet transplantation with immunoisolation.

Diabetes, 41: 1503-1510, 1992d.

Lanza, R.P., Beyer, A.M. & Chick, W.L.

Xenogeneic humoral responses to islets transplanted in biohybrid diffusion chambers.

Transplantation, 57: 1371-1375, 1994.

Lanza, R.P. & Chick, W.L.

Immunoisolation: at a turning point.

Immunology Today, 18: 135-139, 1997.

Lau, H., Reentsma, K. & Hardy, M.A.

Prolongation of rat islet allograft survival by direct ultraviolet irradiation of the graft.

Science, 223: 607-609, 1984.

Laupacis, A., Stiller, C.R., Gardell, C., Keown, P., Dupre, J., Wallace, A.C. & Thibert, P.
Cyclosporin prevents diabetes in BB Wistar rats.

The Lancet, 1: 10-12, 1983.

Leblond, F.A., Tessier, J. & Hallé, J.-P.

Quantitative method for the evaluation of biomicrocapsule resistance to mechanical stress.
Biomaterials, 17: 2097-2102, 1996.

Leblond, F.A., Simard, G., Henley, N., Rocheleau, B., Huet, P.-M. & Hallé, J.-P.

Studies on smaller (~315µm) microcapsules: IV- feasibility and safety of intrahepatic implantations of small alginate poly-L-lysine microcapsules.
Cell Transplantation, 1999 (accepted).

Leonard, D.K., Landry, A.S., Sollinger, H.W. & Hullet, D.A.

Prednisone, azathioprine and cyclosporine A toxicity on human foetal pancreas.
Journal of Surgical Research, 46: 625-632, 1989.

LeRoy, E.C.

The control of fibrosis in systemic sclerosis: A strategy involving extracellular matrix, cytokines and growth factors.
The Journal of Dermatology, 21: 1-4, 1994.

Levin, M.E.

Foot lesions in patients with diabetes mellitus.
Endocrinology and Metabolism Clinics of North America, 25: 447-462, 1996.

Li, H., Ricordi, C., Demetris, A.J., Kaufman, C.L., Korbanic, C., Hronakes, M.L. & Ildstad, S.T.

Mixed xenogeneic chimerism (Mouse + Rat -- Mouse) to induce donor-specific tolerance to sequential or simultaneous islet xenografts.
Transplantation, 57: 592-598, 1994.

Like, A.A., Kislauskis, E., Williams, R.M. & Rossini, A.A.

Neonatal thymectomy prevents spontaneous diabetes mellitus in the BB/W rat.
Science, 216: 644-646, 1982.

Lindmayer, I., Menassa, K., Lambert, J., Moghrabi, A., Legendre, L., Legault, C.,
Letendre, M. & Hallé, J.-P.

Development of new jet injector for insulin therapy.

Diabetes Care, 9: 294-297, 1986.

Lim, F. & Sun, A.M.

Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas.

Science, 210: 908-910, 1980.

LoGerfo, F.W. & Gibbons, G.W.

Vascular disease of the lower extremities in diabetes mellitus.

Endocrinology and Metabolism Clinics of North America, 25: 439-445, 1996.

Lum, Z.P., Tai, I.T., Krestow, M., Norton, J., Vacek, I. & Sun, A.M.

Prolonged reversal of diabetic state in NOD mice by xenografts of microencapsulated rat islets.

Diabetes, 40: 1511-1516, 1991a.

Lum, Z.-P., Tai, I.T., Krestow, M., Norton, J., Vacek, I. & Sun, A.M.

Prolonged reversal of diabetic state in NOD mice by xenografts of microencapsulated rat islets.

Diabetes, 40: 1511-1515, 1991b.

Lum, Z.-P., Krestow, M., Tai, I.T., Vacek, I. & Sun, A.M.

Xenografts of rat islets into diabetic mice.

Transplantation, 53: 1180-1183, 1992.

Maki, T., Otsu, I., O'Neil, J.J., Dunleavy, K., Mullon, C.J.P., Solomon, B.A. &
Monaco, A.P.

Treatment of diabetes by xenogeneic islets without immunosuppression.

Diabetes, 45: 342-347, 1996.

- Mazaheri, R., Atkison, P., Stiller, C., Dupré, J., Vose, J. & O'Shea, G.
Transplantation of encapsulated allogeneic islets into diabetic BB/W rats (Effects of immunosuppression).
Transplantation, 51: 750-754, 1991.
- McKnight, C.A., Ku, A., Goosen, M.F.A., Dun, D. & Penney, C.
Synthesis of chitosan-alginate microcapsule membranes.
Journal of Bioactive and Compatible Polymers, 3: 334-355, 1988.
- Monaco, A.P., Maki, T., Ozato, H., Carretta, M., Sullivan, S.J., Borland, K.M., Mahoney, M.D., Chick, W.L., Muller, T.E., Wolfrum, J. & Solomon, B.
Transplantation of islet allografts and xenografts in totally pancreatectomized diabetic dogs using the hybrid artificial pancreas.
Annals of Surgery, 214: 339-362, 1991.
- Mutsaers, S.E., Bishop, J.E., McGrouther, G. & Laurent, G.J.
Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis.
Int. J. Biochem. Cell Biol., 29: 5-17, 1997.
- Nerup, J., Mandrup-Poulsen, T. & Molvig, J.
The HLA-IDDm association: implications for etiology and pathogenesis of IDDm.
Diabetes/Metabolism Reviews, 3: 779-802, 1987.
- Nicola, N.A., Kristjansson, J.K. & Fasman, G.D.
Interaction of poly(L-lysine) and copolymers of lysine with immobilized DNA.
Arch. Biochem. Biophys., 193: 204-212, 1979.
- O'Reilly, L.A., Hutchings, P.R., Crocker, P.R., Simpson, E., Lund, T., Kioussis, D., Takei, F., Baird, J. & Cooke, A.
Characterization of pancreatic islet cell infiltrates in NOD mice: effect of cell transfer and transgene expression.
European Journal of Immunology, 21: 1171-1180, 1991.

O'Shea, G.M. & Sun, A.M.

Encapsulation of rat islets of Langerhans prolongs xenograft survival in diabetic mice.

Diabetes, 35: 943-946, 1986.

Otterlei, M., Ostgaard, K., Skjak-Braek, G., Smidsrod, O., Soon-Shiong, P. & Espevik, T.

Induction of cytokine production from human monocytes stimulated with alginate.

Journal of Immunotherapy, 10: 286-291, 1991.

Paradis, V., Mathurin, P., Laurent, A., Charlotte, F., Vidaud, M., Poynard, T., Hoang, C.,

Opolon, P. & Bedossa, P.

Histological features predictive of liver fibrosis in chronic hepatitis C infection.

Journal of Clinical Pathology, 49: 998-1004, 1996.

Pariseau, J.-F., Leblond, F.A., Harel, F., Lepage, Y. & Hallé, J.-P.

The rat epididymal fat pad as an implantation site for the study of microcapsule biocompatibility. Validation of the method.

Journal of Biomedical Materials Research, 29: 1331-1335, 1995.

Petruzzo, P., Cappai, A., Ruiu, G., Dessy, E., Rescigno, A. & Brotzu, G.

Development of biocompatible barium alginate microcapsules.

Transplantation Proceedings, 29: 2129-2130, 1997.

Pierce, G.F., Tarpley, J.E., Yanagihara, D., Mustoe, T.A., Fox, G.M. & Thomason, A.

Platelet-derived growth factor (BB homodimer), transforming growth factor-B1, and basic fibroblast growth factor in dermal wound healing.

American Journal of Pathology, 140: 1375-1388, 1992.

Pollok, J.-M., Ibarra, C. & Vacanti, J.P.

Immunoisolation of xenogenic islets using a living tissue engineered cartilage barrier.

Transplantation Proceedings, 29: 2131-2133, 1997.

Posselt, A.M., Barker, C.F. & Tomaszewski, J.F.

Induction of donor specific unresponsiveness by intrathymic islet transplantation.
Science, 249: 1293, 1990.

Pueyo, M.E., Darquy, S., Capron, F. & Reach, G.

In vitro activation of human macrophages by alginate-polylysine microcapsules.
Journal Biomaterial Science Polymer, 5: 197-203, 1993.

Pyzdrowski, K.L., Kendall, D.M., Halter, J.B., Nakleh, R.E., Sutherland, D.E.R. & Robertson, R.P.

Preserved insulin secretion and insulin independence in recipients of islet autografts.
The New England Journal of Medicine, 327: 220-226, 1992.

Qian, T., Schachner, R., Brendel, M., Kong, S.S. & Alejandro, R.

Induction of donor-specific tolerance to rat islet allografts by intrathymic inoculation of solubilized spleen cell membrane antigens.
Diabetes, 42: 1544-1546, 1993.

Reach, G., Poussier, P., Sausse, A., Assan, R., Itoh, M. & Gerich, J.E.

Functional evaluation of a bioartificial pancreas using isolated islets perfused with blood ultrafiltrate.
Diabetes, 30: 296-301, 1981.

Remuzzi, G., Ruggenti, P. & Mauer, S.M.

Pancreas and kidney/pancreas transplants: Experimental medicine or real improvement.
The Lancet, 343: 27-31, 1994.

Ricker, A. & Stockberger, S.

Hyperimmune response to microencapsulated xenogenic tissue in NOD mice.
Diabetes, 35: Suppl. 1 61A, 1986a.

Ricker, A.T., Stockberger, S.M., Halbou, P.A., Eisenbarth, G.S. & Bower-Weis, S.
Hyperimmune response to microencapsulated xenogenic tissue in non obese diabetic mice.
Dans: The Immunology of Diabetes Mellitus.

eds: Jaworski, M.A., Molnar, G.D., Rajotte, R.V. & Singh, B.; Excerpta Medica,
Amsterdam, p. 193-200, 1986b.

Ricordi, C., Zeng, Y., Alejandro, R., Tzakis, A., Venkataramanan, R., Fung, J., Bereiter, D.,
Mintz, D.H. & Starzl, T.E.

In vivo effect of FK506 on human pancreatic islets.

Transplantation, 52: 519-522, 1991.

Ricordi, C., Zeng, Y., Carroll, P.B., Rilo, H.L.R., Beretier, D.R., Starzi, T.E. &
Iidstad, S.T.

Islet xenografts in fully xenogeneic (rat -- mouse) chimeras: Evidence for normal regulation
of function in a xenogeneic mouse environment.

Surgery, 112: 327-332, 1992.

Rilo, H.L.R., Carroll, P.B., Zeng, Y.J., Fontes, P., Demetris, J. & Ricordi, C.

Acceleration of chronic failure of intrahepatic canine islet autografts by a short course of
prednisone.

Transplantation, 57: 181-187, 1994.

Robitaille, R., Leblond, F.A., Bourgeois, Y., Henley, N., Loignon, M. & Hallé, J.-P.

Studies on small (<350µm) microcapsules: V- Use of a gel sieving column to determine
microcapsule permeability to carbohydrates and proteins.

1999a (en préparation).

Robitaille, R., Pariseau, J.-F., Leblond, F.A., Lamoureux, M., Lepage, Y. & Hallé, J.-P.

Studies on small (<350µm) alginate-poly-L-lysine microcapsules: III- biocompatibility of
smaller versus standard microcapsules.

Journal of Biomedical Materials Research, 44: 116-120, 1999b.

Roeb, E., Rose-John, S., Erren, A., Edwards, D.R., Matern, S., Graeve, L. & Heinrich, P.C.
Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) in rat liver cells is increased by
lipopolysaccharide and prostaglandin E2.

FEBS Letter, 357: 33-36, 1995.

Romer, J., Bugge, T.H., Pyke, C., Lund, L.R., Flick, M.J., Degen, J.L. & Dano, K.
Impaired wound healing in mice with a disrupted plasminogen gene.

Nature Medicine, 2: 287-292, 1996.

Rosenbloom, A.L. & Silverstein, J.H.

Connective tissue and joint disease in diabetes.

Endocrinology and Metabolism Clinics of North America, 25: 473-483, 1996.

Sanvito, F., Nichols, A., Herrera, P.L., Huarte, J., Wohlwend, A., Vassalli, J.D. & Orci, L.
TGF-B1 overexpression in murine pancreas induces chronic pancreatitis and, together with
TNF- α , triggers insulin-dependent diabetes.

Biochemical and Biophysical Research Communications, 217: 1279-1286, 1995.

Saudek, C.D.

Future developments in insulin delivery systems.

Diabetes Care, 16: Suppl. 3 122-132, 1993.

Saudek, C.D.

Novel forms of insulin delivery.

Endocrinology and Metabolism Clinics of North America, 26: 599-610, 1997.

Savinetti-Rose, B. & Bolmer, L.

Understanding continuous subcutaneous insulin infusion therapy.

American Journal of Nursing, 97: 42-48, 1997.

Schernthaner, G.

Immunogenicity and allergic potential of animal and human insulins.

Diabetes Care, 16: Suppl. 3 155-165, 1993.

Shults, M.C., Rhodes, R.K., Updike, S.J., Gilligan, B.J. & Reining, W.N.

A telemetry-instrumentation system for monitoring multiple subcutaneously implanted glucose sensors.

IEEE Transactions on Biomedical Engineering, 41: 937-942, 1994.

Sibbald, R.G., Landolt, S.J. & Toth, D.

Skin and diabetes.

Endocrinology and Metabolism Clinics of North America, 25: 463-472, 1996.

Siebers, U., Horcher, A., Brandhorst, H., Brandhorst, D., Federlin, K., Bretzel, R.G. & Zekorn, T.

Time course of the cellular reaction toward microencapsulated xenogeneic islets in the rat.

Transplantation Proceedings, 30: 494-495, 1998.

Singal, D.P. & Blajchman, M.A.

Histocompatibility (HL-A) antigens, lymphocytotoxic antibodies and tissue antibodies in patients with diabetes mellitus.

Diabetes, 22: 429-432, 1973.

Skyler, J.S.

Tactics for type I diabetes.

Endocrinology and Metabolism Clinics of North America, 26: 647-657, 1997.

Soon-Shiong, P., Lu, Z.N., Grewal, I., Lanza, R.P. & Clark, W.

An in vitro method of assessing the immunoprotective properties of microcapsule membranes using pancreatic and tumor cell targets.

Transplantation Proceedings, 22: 754-755, 1990a.

Soon-Shiong, P., Lu, Z.-N., Grewal, I., Lanza, R. & Clark, W.

Prevention of CTL and NK cell-mediated cytotoxicity by microencapsulation.

Hormones and Metabolic Research, 25: Suppl. 1 215-219, 1990b.

Soon-Shiong, P., Otterlie, M., Skjak-Braek, G., Smidsrod, O., Heintz, R., Lanza, R.P. & Espevik, T.

An immunologic basis for the fibrotic reaction to implanted microcapsules.

Transplantation Proceedings, 23: 758-759, 1991.

Soon-Shiong, P., Feldman, E., Nelson, R., Komtebedde, J., Smidsrod, O., Skjak-Braek, G., Espevik, T., Heintz, R. & Lee, M.

Successful reversal of spontaneous diabetes in dogs by intraperitoneal microencapsulated islets.

Transplantation, 54: 769-774, 1992.

Soon-Shiong, P., Heintz, R.E., Merideth, N., Yao, Q.X., Yao, Z., Zheng, T., Murphy, M., Moloney, M.K., Schmehl, M., Harris, M., Mendez, R., Mendez, R. & Sandford, P.A.

Insulin independence in a type 1 diabetic patient after encapsulated islet transplantation.

The Lancet, 343: 950-951, 1994.

Spielman, R.S., Baker, L. & Zmijewski, C.M.

Gene dosage and susceptibility to insulin-dependent diabetes.

Ann. Hum. Genet., 44: 135-150, 1980.

Starke, A.A.R., Heinemann, L., Hohmann, A. & Berger, M.

The action profiles of human NPH insulin preparations.

Diabetic Medicine, 6: 239-244, 1989.

Sternberg, F., Meyerhoff, C., Mennel, F.J., Bischof, F. & Pfeiffer, E.F.

Subcutaneous glucose concentration in humans: real estimation and continuous monitoring.

Diabetes Care, 18: 1266-1269, 1995.

Stevenson, W.T.K., Evangelista, R.A., Sugamori, M.E. & Sefton, M.V.

Microencapsulation of mammalian cells in a hydroxyethyl methacrylate-methyl methacrylate copolymer: Preliminary development.

Biomaterials, Artificial Cells and Artificial Organs, 16: 747-769, 1988.

Sun, Y., Ma, X., Zhou, D., Vacek, I. & Sun, A.M.

Normalization of diabetes in spontaneously diabetic cynomolgus monkeys by xenografts of microencapsulated porcine islets without immunosuppression.

Journal Clinical Investigation, 98: 1417-1422, 1996.

Sutherland, D.E.R., Sibley, R., Xu, X.-Z., Michael, A., Srikanta, S., Taub, F. & Goetz, F.C.

Twin-to-twin pancreas transplantation: reversal and reenactment of the pathogenesis of type I diabetes.

Trans. Assoc. Am. Physicians, 97: 80-87, 1984.

Tai, I.T., Vacek, I. & Sun, A.

The alginate-polylysine-alginate membrane: Evidence of a protective effect on microencapsulated islets of Langerhans following exposure to cytokines.

Xenotransplantation, 2: 37-45, 1995.

Takiya, S., Tagaya, T., Takahashi, K., Kawashima, H., Kamiya, M., Fukuzawa, Y.,

Kobayashi, S., Fukatsu, A., Katoh, K. & Kakumu, S.

Role of transforming growth factor B1 on hepatic regeneration and apoptosis in liver diseases.

Journal of Clinical Pathology, 48: 1093-1097, 1995.

Tamada, J.A., Bohannon, N.J. & Potts, R.O.

Measurement of glucose in diabetic subjects using noninvasive transdermal extraction.

Nature Medicine, 1: 1198-1201, 1995.

Tamborlane, W.V. & Ahern, J.

Implications and results of the diabetes control and complications trial.

Pediatric Clinics of North America, 44: 285-300, 1997.

Thivolet, C., Bendelac, A., Bédossa, P., Bach, J.-F. & Carnaud, C.

CD8⁺ T cell homing to the pancreas in the nonobese diabetic mouse is CD4⁺ T cell-dependent.

The Journal of Immunology, 146: 85-88, 1991.

Todd, J.A., Bell, J.I. & McDevitt, H.O.

HLA-DQ-beta gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus.

Nature, 329: 599-604, 1987.

Tomer, Y., Barbesimo, G., Greenberg, D. & Davies, T.F.

The immunogenetics of autoimmune diabetes and autoimmune thyroid disease.

Trends. Endocrinol. Metab., 8: 63-70, 1997.

Tze, W.J., Wong, F.C., Chen, L.M. & O'Young, S.

Implantable artificial endocrine pancreas unit used to restore normoglycaemia in the diabetic rat.

Nature, 264: 466-467, 1976.

Tze, W.J., Cheung, S.S.C., Tai, J., Bissada, N., Tsang, A. & Yep, W.

Prolongation of pig islet xenograft survival in polysulfone fiber coil.

Transplantation Proceedings, 26: 3510-3511, 1994.

UKPDS Group.

Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34).

The Lancet, 352: 854-865, 1998a.

UKPDS Group.

Efficacy of atenolol and captopril in reducing risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 39.

B.M.J., 317: 713-720, 1998b.

UKPDS Group.

Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33).

The Lancet, 352: 837-853, 1998c.

UKPDS Group.

Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38.

B.M.J., 317: 703-713, 1998d.

Valdes, R., Martin, S., Cravioto, A. & Tenopala, J.

Biological encapsulation as a new model for preservation of islets of Langerhans.

Transplantation Proceedings, 30: 481, 1998.

Van Laethem, J.L., Robberecht, P., Resibois, A. & Deviere, J.

Transforming growth factor B promotes development of fibrosis after repeated courses of acute pancreatitis in mice.

Gastroenterology, 110: 576-582, 1996.

Van Schilfgaarde, R. & De Vos, P.

Aspects of immunoprotection of islets.

Transplantation Proceedings, 28: 3516-3517, 1996.

Vialettes, B. & Maraninchi, D.

Transfer of insulin-dependent diabetes between HLA-identical siblings by bone marrow transplantation.

The Lancet, 342: 174, 1993.

Vojtiskova, M. & Lengerova, A.

Thymus mediated tolerance to cellular alloantigens.

Transplantation, 6: 13, 1968.

Wahoff, D.C., Papalois, B.E., Najarian, J.S., Kendall, D.M., Farney, A.C., Leone, J.P.,

Jessurun, J., Dunn, D.L., Robertson, R.P. & Sutherland, D.E.R.

Autologous islet transplantation to prevent diabetes after pancreatic resection.

Annals of Surgery, 222: 562-579, 1995.

Warnock, G.L., Kneteman, N.M., Ryan, E., Seelis, R.E.A., Rabinovitch, A. & Rajotte, R.V.

Normoglycaemia after transplantation of freshly isolated and cryopreserved pancreatic islets in Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus.

Diabetologia, 34: 55-58, 1991.

Weber, C.J., Zabinski, S., Koschitzky, T., Wicker, L., Rajotte, R., D'Agati, V., Peterson, L.,

Norton, J. & Reemtsma, K.

The role of CD4+ helper T cells in the destruction of microencapsulated islet xenografts in nod mice.

Transplantation, 49: 396-404, 1990.

Weber, C., Ayres-Price, J., Constanzo, M., Becker, A. & Stall, A.

NOD mouse peritoneal cellular response to poly-L-lysine-alginate microencapsulated rat islets.

Transplantation Proceedings, 26: 1116-1119, 1994.

Whiting, P.H., Woo, J., Adam, B.J., Hasan, N.U., Davidson, R.J.L. & Thomson, A.W.

Toxicity of rapamicin-a comparison and combination study with cyclosporine at immunotherapeutic dosage in rat.

Transplantation, 52: 203-208, 1991.

Wijsman, J., Atkinson, P., Mazaheri, R., Garcia, B., Paul, T., Vose, J., O'Shea, G. & Stiller, C.

Histological and immunopathological analysis of recovered encapsulated allogenic islets from transplanted diabetic BB/W rats.

Transplantation, 54: 588-592, 1992.

Williams, J.A. & Goldfine, I.D.

The insulin-pancreatic acinar axis.

Diabetes, 34: 980-986, 1985.

Woodward, S.C.

How fibroblasts and giant cells encapsulate implants: considerations in design of glucose sensors.

Diabetes Care, 5: 278-281, 1982.

Xenos, E.S., Casanova, D., Sutherland, D.E.R., Farney, A.C., Lloveras, J.J. & Gores, P.F.

The in vivo and in vitro effect of 15-deoxyspergualin on pancreatic islet function.

Transplantation, 56: 144-147, 1993.

Yasunami, R. & Bach, J.-F.

Anti-suppressor effect of cyclophosphamide on the development of spontaneous diabetes in NOD mice.

European Journal of Immunology, 18: 481-484, 1988.

Yokoyama, H. & Deckert, T.

Central role of TGF- β in the pathogenesis of diabetic nephropathy and macrovascular complications: a hypothesis.

Diabetic Medicine, 13: 313-320, 1996.

Zekorn, T., Renardy, M., Planck, H., Zschocke, P., Bretzel, R.G., Siebers, U. & Federlin, K.
Experiments on a new hollow fiber membrane for immuno isolated transplantation of islets
of Langerhans.

Hormones and Metabolic Research, 25: Suppl. 1 202-206, 1990.

Zekorn, T., Siebers, U., Horcher, A., Schnettler, R., Klock, G., Bretzel, R.G.,
Zimmermann, U. & Federlin, K.

Barium-alginate beads for immunosolated transplantation of islets of Langerhans.

Transplantation Proceedings, 24: 937-939, 1992.

Zekorn, T.D.C., Horcher, A., Mellert, J., Siebers, U., Altug, T., Emre, A., Hahn, H.-J. &
Federlin, K.

Biocompatibility and immunology in the encapsulation of islets of Langerhans (bioartificial
pancreas).

The International Journal of Artificial Organs, 19: 251-257, 1996.

Zhou, X.H., Klibanov, A.L. & Huang, L.

Lipophilic polylysines mediate efficient DNA transfection in mammalian cells.

Biochimica et Biophysica Acta, 31: 8-14, 1991.

Zimmermann, U., Klock, G., Federlin, K., Hannig, K., Kowalski, M., Bretzel, R.G.,
Horcher, A., Entenmann, H., Sieber, U. & Zekorn, T.

Production of mitogen-contamination free alginates with variable ratios of mannuronic acid
to guluronic acid by free flow electrophoresis.

Electrophoresis, 13: 269-274, 1992.

Annexe

Notification de l'acceptation du manuscrit pour publication dans la revue scientifique
"Journal of Biomedical Materials Research"



JAMES M. ANDERSON, Editor-in-Chief
 University Hospitals of Cleveland
 The Institute of Pathology of
 Case Western Reserve University
 11100 Euclid Avenue, Room 306
 Cleveland, Ohio 44106-2622
 Phone 216-844-1012
 Fax 216-844-8004

December 9, 1998

Dr. Jean-Pierre Hallé
 Director of Research Laboratory on Diabetes and Bioartificial Organs
 Centre de Recherche Guy-Bernier
 Hôpital Maisonneuve-Rosemont
 6416, boulevard de l'Assomption
 Montréal, QC, H1T 2M4, Canada

Dear Dr. Hallé:

As Editor of the *Journal of Biomedical Materials Research*, I am pleased to accept for publication your ms. entitled "Alginate-poly-L-lysine microcapsule biocompatibility: A novel method for RT-PCR cytokine gene expression analysis in pericapsular infiltrates" (Ms. C-769). The ms. will be sent to the publisher, John Wiley and Sons, and you should hear from them in the following several weeks in regard to it.

The ms. has been assigned Production number 2668, and, should you need to contact John Wiley and Sons in regard to it, please refer to this number rather than the aforementioned C-769.

John Wiley & Sons, Inc., the publisher of *Journal of Biomedical Materials Research*, requests that authors deliver the final, revised version (text, tables, and, if possible, illustrations) of their manuscript on diskette. Given the near-universal use of computer word-processing for manuscript preparation, we anticipate that providing a diskette will be convenient for you, and it carries the added advantages of maintaining the integrity of your keystrokes and expediting typesetting. Please note that the printed copy must also be supplied and that you must certify that the diskette is identical in both word and content to the printed copy. Instructions for diskette submissions are enclosed. Please make the requested change on the title page and include two copies of the corrected page when you return your diskette. We will substitute the appropriate title page and send in the original that we already have on file.

Thank you for your contribution to the *Journal of Biomedical Materials Research*. With kindest regards.

Sincerely yours,

James M. Anderson, M.D., Ph.D.
 Editor-in-Chief

JMA/bib

THE OFFICIAL JOURNAL OF THE SOCIETY FOR BIOMATERIALS,
 THE JAPANESE SOCIETY FOR BIOMATERIALS AND THE AUSTRALIAN SOCIETY FOR BIOMATERIALS
 Published by John Wiley & Sons