

Université de Montréal

**Effet du seuil de perméabilité membranaire sur la survie et la
fonction des îlots de Langerhans microencapsulés**

par

Karine Desbiens

Programme de Sciences biomédicales

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

Avril 2002

© Karine Desbiens, 2002



W
4
U58
2002
V.101

**Université de Montréal
Faculté des études supérieures**

Ce mémoire intitulé :

**Effet du seuil de perméabilité membranaire sur la survie et la
fonction des îlots de Langerhans microencapsulés**

présenté par :

Karine Desbiens

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

**Gilbert Bernier
président-rapporteur**

**Jean-Pierre Hallé
directeur de recherche**

**Ashok Srivastava
membre du jury**

Mémoire accepté le :

Résumé Français

La transplantation d'îlots microencapsulés est un espoir pour traiter le diabète insulino-dépendant. Une question simple mais fondamentale n'a pas été répondue à ce jour: quel est le seuil de perméabilité membranaire idéal? L'objectif général de cette étude est d'évaluer l'effet du seuil de perméabilité membranaire sur la survie et la fonction des îlots microencapsulés. Les objectifs spécifiques sont: 1) développer des microcapsules avec 3 seuils de perméabilité membranaire différents (85-100 kDa; 40-60 kDa; 15-30 kDa) et possédant une bonne résistance mécanique, 2) étudier l'effet de l'alginate riche en acide guluronique (G) versus riche en acide-mannuronique, 3) étudier l'effet du seuil de perméabilité membranaire sur la survie et la fonction des îlots microencapsulés. La résistance mécanique a été évaluée à l'aide d'une méthode déjà publiée (Leblond,1996). La perméabilité a été analysée par chromatographie d'exclusion de taille inversée. À la lumière de ces résultats, 4 types d'implants ont été choisis lesquels présentaient 3 seuils de perméabilité membranaire. Des îlots ont été encapsulés dans ces implants. L'analyse de la survie et de la fonction *in vitro* de ces îlots ne démontre pas d'effet du seuil de perméabilité lorsque celui-ci varie de 15-30 kDa à 76-160 kDa. Les études de transplantation dans des souris scid (immunoincompétentes) avec un diabète induit par la streptozotocine n'ont pas montré de façon concluante (selon les résultats) d'effet du seuil de perméabilité, car il a été difficile de dissocier l'effet de la biocompatibilité des billes/capsules de l'effet du seuil de perméabilité membranaire.

Mots clefs : Transplantation; microcapsules; îlots de Langerhans; seuil de perméabilité membranaire; résistance; viabilité; fonction.

Résumé Anglais

Transplantation of microencapsulated islets, as a means to treat IDDM, has raised great hope. A very simple and basic question has not been answered yet: what is the ideal membrane molecular weight cut-off (MWCO)? The goal of this research is to evaluate the effect of the MWCO on microencapsulated islet survival and function. The aims of the project are: 1) to develop microcapsules with 3 different membrane MWCO (85-100 kDa; 40-60 kDa; 15-30 kDa) and a good mechanical resistance, 2) to study the effect of high-guluronic acid (G) versus high-mannuronic acid (M) alginates, 3) to study the effect of the MWCO on encapsulated islet survival and function. The mechanical resistance was evaluated using a microcapsule resistance evaluation method developed in our laboratory (Leblond, 1996). The MWCO was evaluated using reversed size exclusion chromatography. Using this information, 4 types of implants, presenting 3 different MWCO (85-100 kDa; 40-60 kDa; 15-30 kDa) were selected. Islets were immobilized/encapsulated in these beads/microcapsules. The analysis of in vitro studies did not show any effect of the MWCO on islet survival and function, with a MWCO in the range of 15-30 kDa to 76-160. Transplantation studies in streptozotocin-induced diabetic scid (immuno-incompetent) mice did not conclusively show any effect of the MWCO, because it was difficult to dissociate the effect of bead/capsule biocompatibility from the effect of MWCO.

Keys words: Transplantation; microcapsules; islets of Langerhans; molecular weight cut-off; resistance; viability; function.

Table des matières

<u>Résumé français</u>	iii
<u>Résumé anglais</u>	iv
<u>Table des matières</u>	v
<u>Liste des tableaux</u>	viii
<u>Liste des figures</u>	ix
<u>Liste des sigles et abréviations</u>	xiii
Dédicace	xv
Remerciements	xvi
1. Introduction	1
1.1. Diabète	2
1.1.1. Description de la maladie.....	2
1.1.2. Insuline.....	2
1.1.3. Diabète gestationnel.....	8
1.1.4. Diabète de type II.....	8
1.1.5. Diabète de type I.....	9
1.1.4.1. Auto-immunité.....	10
1.1.4.2. Complications.....	13
1.2. Traitements possibles	14
1.2.1. Insulinothérapie.....	14
1.2.1.1. Types d'insuline.....	15
1.2.1.2. Analogues de l'insuline.....	16
1.2.2. Pancréas artificiel.....	17
1.2.2.1. Pompe à insuline.....	17
1.2.2.2. Détecteurs continus de glucose.....	19
1.2.3. Transplantation de pancréas.....	19
1.2.4. Transplantation d'îlots de Langerhans.....	20
1.2.4.1. Xénogreffe.....	22
1.2.4.2. Problèmes reliés.....	23

1.3. Immunoprotection.....	23
1.3.1. Immunosuppression	24
1.3.2. Immunoaltération.....	25
1.3.3. Induction de la tolérance.....	25
1.3.4. Immunoisolation	26
1.3.4.1. Dispositifs vasculaires	26
1.3.4.2. Chambres de diffusion.....	27
1.3.4.3. Capsules biologiques	27
1.3.4.4. Microcapsules	28
1.4. Microencapsulation.....	28
1.4.1. Avantages de la microencapsulation.....	28
1.4.2. Méthodes d'évaluation des microcapsules	29
1.4.3. Fabrication	30
1.4.4. Transplantation d'îlots de Langerhans microencapsulés	34
1.4.5. Alginate et purification	35
1.5. Observations.....	36
1.5.1. Insuccès.....	36
1.5.2. Résistance	36
1.5.2.1. Techniques	37
1.5.3. Perméabilité	39
1.5.3.1. Techniques	41
1.6. Questions de recherche	42
1.6.1. Importance du projet.....	43
1.7 Hypothèse de travail	44
1.8 Objectifs	44
2. Matériel et méthode	45
2.1. Alginate et Poly-L-Lysine.....	45
2.1.1. Purification d'alginate selon une modification du protocole de Klöck	45
2.1.2. Fabrication des billes et des microcapsules	45
2.2. Test de résistance mécanique.....	46
2.3.1. Préparation des colonnes chromatographiques.....	46

2.3.2. Évaluation de la perméabilité à l'aide de la chromatographie par exclusion de taille inversée.....	48
2.4. Isolation et encapsulation des îlots de Langerhans	50
2.5. Évaluation des centres nécrosés.....	52
2.6. Étude de la viabilité par fluorescence	52
2.7. Transplantation	52
3. Résultats	56
3.1. Résistance mécanique	56
3.2. Perméabilité	59
3.3. Études <i>in vitro</i>	65
3.3.1. Centres nécrosés.....	66
3.3.2. Viabilité	66
3.3.3. CMRL versus RPMI.	78
3.4. Études <i>in vivo</i>	80
4. Discussion	86
4.1. Étude de la résistance et de la perméabilité des microcapsules	87
4.2. Études <i>in vitro</i>	90
4.3. Études <i>in vivo</i>	93
5. Conclusion	96
Sources documentaires	98

Liste des tableaux

Introduction :

Tableau I : Composition cellulaire des îlots de Langerhans et leurs produits de sécrétion.....	3
Tableau II : Composantes majeures proposées pour la microencapsulation d'îlots de Langerhans.....	31
Tableau III : Caractérisation des îlots en viabilité afin d'obtenir un index de viabilité.....	55

Résultats :

Tableau IV : Évaluation de la résistance à la dégradation mécanique des microcapsules d'alginate LVM.....	57
Tableau V : Évaluation de la résistance à la dégradation mécanique des microcapsules d'alginate LVG.....	58
Tableau VI : K_{sec} déterminé par les marqueurs hydrates de carbone sur les microcapsules d'alginate LVM.....	61
Tableau VII : K_{sec} déterminé par les marqueurs protéiques sur les microcapsules d'alginate LVM.....	62
Tableau VIII : K_{sec} déterminé par les marqueurs hydrates de carbone sur les microcapsules d'alginate LVG.....	63
Tableau IX : K_{sec} déterminé par les marqueurs protéiques sur les microcapsules d'alginate LVG.....	64

Liste des figures

Introduction :

Figure 1 : Schéma d'un îlot de Langerhans et des acini environnants.....	4
Figure 2 : Structure de l'insuline.....	4
Figure 3 : Régulation de la sécrétion du glucagon et de l'insuline.....	5
Figure 4 : Régulation de la glycémie par l'insuline et le glucagon.....	5
Figure 5 : Effets de l'insuline sur le métabolisme.....	7
Figure 6 : Schéma moléculaire de l'alginate.....	32
Figure 7 : Schéma moléculaire de l'acide guluronique et de l'acide mannuronique formant l'alginate.....	32
Figure 8 : Fabrication de microcapsules d'alginate-PLL-alginate.....	33
Figure 9 : Représentation de la formation d'une microcapsule.....	33
Figure 10 : Représentation schématique du test de résistance mécanique.....	38
Figure 11 : Schéma d'un îlot de Langerhans microencapsulé.....	40

Liste des figures (suite)

Matériel et Méthodes :

Figure 12 : Représentation schématique d'une capsule d'alginate-PLL-alginate.....47

Figure 13 : Représentation de la méthode de chromatographie par exclusion de taille
inversée.....49

Figure 14 : Schéma représentatif de la chromatographie par exclusion de taille
inversée : calcul du k_{sec}49

Figure 15 : Profil d'élution des standards chromatographiques : dextran-FITC
2 millions daltons et glucose.....51

Figure 16 : Photographie d'îlots de Langerhans microencapsulés : étude par
microscopie optique à l'état frais.....53

Figure 17 : Photographie d'îlots de Langerhans microencapsulés : études de
viabilité en fluorescence.....54

Résultats :

Figure 18 : Diamètre moyen des îlots non nécrosés en fonction du temps dans le
milieu de culture CMRL.....67

Figure 19 : Diamètre moyen des îlots nécrosés en fonction du temps dans le milieu
de culture CMRL.....68

Figure 20 : Diamètre moyen de la zone de nécrose des îlots nécrosés en fonction
du temps dans le milieu de culture CMRL.....69

Liste des figures (suite)

Figure 21 : Moyenne des 4 implants : Diamètre moyen des îlots non nécrosés et nécrosés en fonction du temps.	70
Figure 22 : Proportion d'îlots-équivalents encapsulés ayant un centre nécrosé en fonction du temps dans le milieu de culture CMRL.....	71
Figure 23 : Nombre d'îlots-équivalents total en fonction du temps dans le milieu de culture CMRL.....	72
Figure 24 : Facteur de conversion, en nombre d'îlots-équivalents moyen, en fonction du temps dans le milieu de culture CMRL.....	74
Figure 25 : Nombre d'îlots-équivalents viables en fonction du temps dans le milieu de culture CMRL.....	75
Figure 26 : Index de viabilité des îlots encapsulés en fonction du temps dans le milieu de culture CMRL.....	76
Figure 27 : Delta entre le jour 2 jour et les jours 4, 7, 14, 21, 28, 42, 56 et 85, en fonction du temps (CMRL).	77
Figure 28 : Proportion d'îlots-équivalents encapsulés ayant un centre nécrosé en fonction du temps dans le milieu de culture RPMI.....	79
Figure 29 : Nombre d'îlots-équivalents viables en fonction du temps dans le milieu de culture RPMI.....	81

Liste des figures (suite)

- Figure 30 : Glycémies de souris STZ-*scid* ayant subi une xénotransplantation intrapéritonéale de 500 îlots-équivalents de rats encapsulés (modèle de masse minimale).....83
- Figure 31 : Glycémies de souris STZ C57BL/6 ayant subi une xénotransplantation intrapéritonéale de 500 îlots-équivalents de rats encapsulés (modèle de masse minimale).....84

Liste des sigles et abréviations

° C :	Degré Celsius
ACTH :	Corticostimuline
APA :	Alginate-poly-L-lysine-alginate
BB, rats:	'BioBreeding' (modèle de diabète autoimmun)
CIIT :	'Chronic Intermittent Intravenous Insulin Therapy'
CMH :	Complexe majeur d'histocompatibilité
CSII :	'Continuous Subcutaneous Insulin Infusion'
Da :	Dalton
DCCT :	'Diabetes Control and Complications Trial Research Group'
EDC :	Carbodiimide
FDA :	'Food and Drug Administration'
FITC :	Fluorescéine isothiocyanate
FK506 :	Tacrolimus
G :	Monomère d'acide guluronique
Ga :	Glutaraldéhyde
GAD :	Acide glutamique décarboxylase
GH :	Hormone de croissance
GHIH :	Somatostatine
ÎE :	îlot équivalent
IFN :	Interféron
IGF :	'Insulin growth factor'
IgG :	Immunoglobuline G
IL :	Interleukine
IPTR :	'International Pancreas Transplant Registry'
Ksec :	Coefficient de partition chromatographique
LPS :	Lipopolysaccharides
M :	Monomère d'acide mannuronique

Liste des sigles et abréviations (suite)

MDI :	'Multiple daily injections'
μm :	Micromètre
mm :	Millimètre
MMF :	Mycophenolat mofetil
mmol :	Millimole
NOD :	'Nonobese diabetic' (modèle de diabète auto-immun)
OKT3 :	15-deoxyspergualin
PAS :	Protéine A sepharose
PEG :	Polyéthylène glycol
NPH :	'Neutral protamin Hagedorn insulin'
PLL :	Poly-L-lysine
PTP :	Protéine tyrosine phosphate
RHM :	Réaction de l'hôte contre les microcapsules
$R\eta$:	Rayon de viscosité ('Viscosity radius')
<i>Scid</i> , souris :	"Severe combined immunodeficiency mice"
STZ :	Streptozotocine
TGF :	'Transforming growth factor' (facteur de croissance transformant)
TNF :	'Tumor necrosis factor' (facteur nécrosant les tumeurs)

« In research, the present devours the past »

Medawar

Remerciements

Je tiens à remercier tout particulièrement mon directeur de recherche, Dr Jean-Pierre Hallé, pour m'avoir accepté dans son laboratoire et m'avoir dirigée tout au long de ma maîtrise. Il m'a donné la chance de me dépasser, de développer mon esprit critique ainsi que la rigueur et la discipline nécessaire à la science. Je le remercie particulièrement de m'avoir fait comprendre que même si c'est un résultat négatif, c'est un résultat valable tout de même.

Je veux également remercier Nathalie Henley et Robert Robitaille autant pour leur support moral que technique. Leurs judicieux conseils et leurs inestimables critiques m'ont aidé tout au long de ces années. Sans leur appui cette maîtrise n'aurait pu être terminée. Je tiens également à remercier Martin Ménard pour sa contribution et ses critiques scientifiques ainsi que Sandy Juste pour sa grande compréhension et ses encouragements.

Un merci tout particulier à trois personnes irremplaçables. Tout d'abord Julie Dusseault pour son soutien moral, sa grande disponibilité, sa générosité et ses connaissances scientifiques et littéraires. Son aide continue m'a donné la chance de poursuivre surtout dans les moments les plus difficiles. Merci également à Marylène Corriveau pour ses encouragements constants et sa disponibilité à toutes heures ; son aide m'a été précieuse. Finalement, merci à François Leblond pour son immense aide technique, son appui et ses encouragements. Il m'a aidé à tout remettre en perspective et à résister lors de problèmes majeurs. Je tiens à le remercier tout spécialement pour sa contribution scientifique ainsi que pour ses nombreuses critiques et révisions de ce texte toutes plus constructives les unes que les autres.

Je tiens à remercier l'Association Diabète Québec pour l'aide financière qui m'a été accordée. Les bourses d'été qu'ils m'ont offert ont été très appréciées et m'ont permis de poursuivre mes études ainsi que le présent projet. Merci également à la Juvenile Diabetes Foundation International pour leur contribution afin de soutenir ce projet financièrement.

Je voudrais également remercier mes amis, Isabelle Shink, Julie Bourgeois, Renée Huard, Marie-Hélène Jutras, Yan Grimard, Louis-Robert Villeneuve, Sara Dorval, Éric Beauchamps et tous les autres, qui m'ont toujours encouragé et aidé dans la poursuite de ma démarche. Ils ont surtout toujours cru en moi et m'ont donné l'énergie et la force de persévérer.

Je veux également remercier mes parents, Ruth et Benoît de m'avoir permis de faire ces études. Ils m'ont toujours encouragée et soutenue durant ces années. Sans eux, la réussite de cette maîtrise n'aurait jamais été atteinte. Merci de m'avoir inculqué des valeurs et des principes aussi essentiels que la persévérance, le dépassement de ses limites et de faire les choses du mieux qu'on le peut.

Merci à tous ceux que je ne peux nommer ici, amis, parents et collègues. Merci à Kahos pour ses encouragements lors des moments de découragement et pour ses bulles de bonheur.

1. Introduction

Avant même les premiers balbutiements de la médecine, avant les premiers essais chirurgicaux, l'homme avait déjà imaginé l'ère de la transplantation. L'histoire nous a illustré par les mythes et légendes, des créatures représentant la fusion entre deux êtres, deux corps. Des entités émergeant directement de l'imagination des hommes furent illustrées comme les sirènes, les tritons, les centaures, les sphinx et les cyclopes pour ne nommer que ceux-ci. C'est ainsi que de fabuleuses et fascinantes créatures hybrides comme pégase (cheval ailé) et méduse (femme avec des serpents comme cheveux) furent créées. La fantaisie des hommes façonna même un être résultant de trois animaux : le lion, la chèvre et le dragon. Et la chimère d'Homère fut inventée! Même si aujourd'hui encore il reste chose farfelue, digne des lutins et des fées, le mot chimère, émanant du passé, n'est pourtant pas si loin d'une réalité en médecine. En effet, la transplantation d'aujourd'hui repose sur l'espoir de remplacer un organe défectueux ou inefficace par un autre mais provenant d'une origine différente, digne d'une chimère.

Vingt siècles après l'ère de la mythologie, la transplantation apparaît, après de nombreuses années d'expérimentation, comme étant une solution thérapeutique pour des patients atteints de graves maladies autrefois impossibles à traiter. Outre le médecin et le patient, la transplantation fait intervenir un troisième joueur, mort ou vivant, dont le don aidera vraisemblablement à sauver la vie du patient. Ainsi, le concept du don d'organe a vu le jour pour permettre la transplantation. Ce principe repose sur la grande générosité des gens, mais malheureusement ne permet pas, faute du manque de donneurs, de répondre à la grande demande d'organes. Cette insuffisance d'organes a permis notamment la naissance et le développement de la xénogreffe mais également de nouvelles méthodes permettant d'isoler l'organe transplanté du système immunitaire du receveur.

Dans cette première partie du mémoire, nous parlerons du diabète, une maladie pour laquelle la transplantation suscite beaucoup d'espoir de guérison. Nous débuterons par la description de la maladie, pour ensuite parler des traitements possibles aujourd'hui, et de la nécessité de la transplantation incluant ses avantages et ses inconvénients. Ensuite nous poursuivrons avec l'explication d'une nouvelle approche révolutionnaire pour contrer certains inconvénients de la transplantation, la microencapsulation.

1.1. Diabète

1.1.1. Description de la maladie

Bien avant la découverte de l'insuline par Banting, Best, Collip et Macleod en 1921 (Peterson 1982), Mehring et Minkowski furent les premiers en 1889 à identifier le pancréas et à décrire les premières manifestations du diabète mellitus (Owens et *al.* 2001). On sait aujourd'hui que le diabète apparaît lorsqu'un dérèglement entraîne une incapacité de l'organisme à sécréter l'insuline en quantité suffisante et/ou à utiliser cette dernière adéquatement (Santé Canada, 1999).

Au fil des ans, le diabète s'est acquis la réputation peu enviable de problème de santé publique important qui pourrait prendre des proportions encore plus considérables en raison du vieillissement de la population et de l'augmentation des taux d'obésité. Le diabète est actuellement la septième cause principale de décès au Canada (Santé Canada, 1999). Dans cette section, nous allons faire un survol du métabolisme du glucose, la composition ainsi que l'implication de l'insuline dans ce métabolisme. Nous parlerons de son rôle dans le diabète, pour terminer avec les différents types de diabètes.

1.1.2. Insuline

Le corps humain fonctionne, entre autres, grâce au métabolisme du glucose. Les principales hormones en jeu dans la régulation de ce métabolisme sont l'insuline, le glucagon, la somatostatine (GHIH) et l'adrénaline (Marieb, 1993). La plupart de ces hormones sont sécrétées par la portion endocrine du pancréas (Engelking, L.R., 1997). Le pancréas endocrine chez l'humain adulte est constitué approximativement d'un million d'îlots de Langerhans qui sont dispersés dans le tissu exocrine. Les îlots ne constituent en fait que 20% de la masse totale du pancréas (Figure 1, page 4) (Engelking, L.R., 1997). La composition cellulaire d'un îlot de Langerhans est décrite au tableau I, page 3.

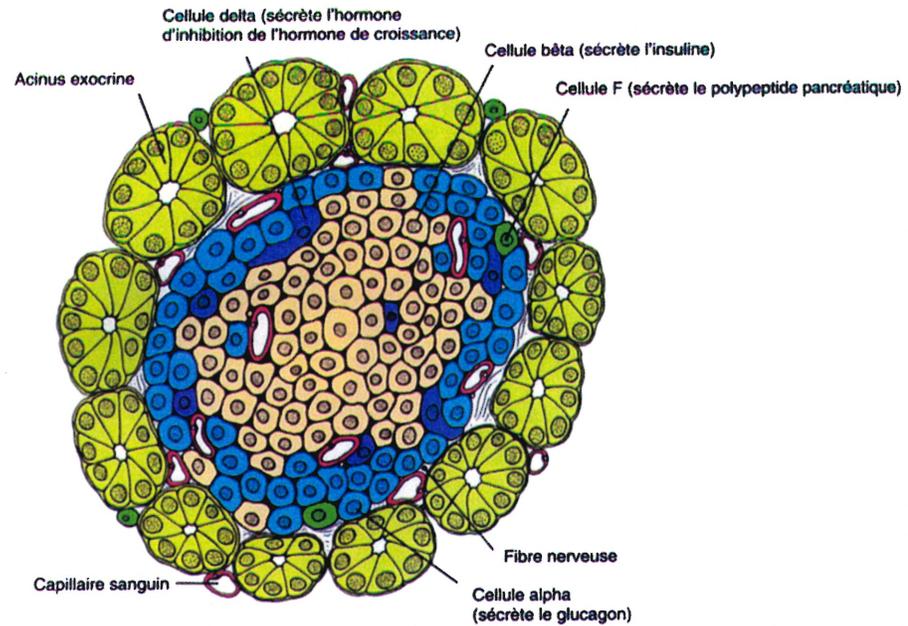
Tableau I. Composition cellulaire des îlots de Langerhans et leurs produits de sécrétion*.

Type cellulaire	Pourcentage approximatif de la masse de l'îlot (%)	Produit de sécrétion
Cellules alpha (α)	20	Glucagon, proglucagon
Cellules bêta (β)	75	Insuline, C-peptide, proinsuline, polypeptide amyloïd d'îlot
Cellule delta (δ)	3-5	Somatostatine
Cellules F (cellules PP)	< 2	Polypeptide pancréatique (PP)

* Données tirées de (Katzung,1995)

L'insuline est une petite protéine de 51 acides aminés. Elle est sécrétée par les cellules β du pancréas en réponse aux augmentations du taux sanguin de glucose. L'insuline est d'abord synthétisée sous la forme d'une chaîne polypeptidique appelée pro-insuline. Cette protéine est repliée sur elle-même pour former une épingle dont la structure est stabilisée par des ponts disulfures. Sous l'action d'une protéase, la portion médiane est coupée, libérant ainsi l'insuline et le c-peptide (Figure 2, page 4). Cette maturation survient dans les vésicules de sécrétion, juste avant que la cellule β ne relâche l'insuline dans la circulation. L'insuline mature est donc formée de deux chaînes polypeptidiques (α et β) de 21 et 30 acides aminés respectivement, reliées par des ponts disulfure. La séquence en acides aminés dans chaque chaîne est unique (Marieb, 1993).

L'insuline joue un rôle positif dans la pénétration du glucose dans les cellules (Marieb, 1993). La principale action physiologique de l'insuline est donc opposée à celle du glucagon qui lui, réduit l'absorption du glucose (Figure 3 et 4, page 5) (Tortora, 1994). L'insuline et le glucagon régularisent donc le taux de glucose sanguin en modulant son transport vers les cellules. Le mécanisme d'action de l'insuline sur les cellules fait encore l'objet d'études, mais on présume notamment les processus suivants : 1) la liaison de l'insuline à son récepteur engendre un second messager; 2) la cellule cible



c) Schéma d'un îlot pancréatique (îlot de Langerhans) et des acini environnants

Figure 1. Schéma d'un îlot de Langerhans et des acini environnants (Tortora, 1994).

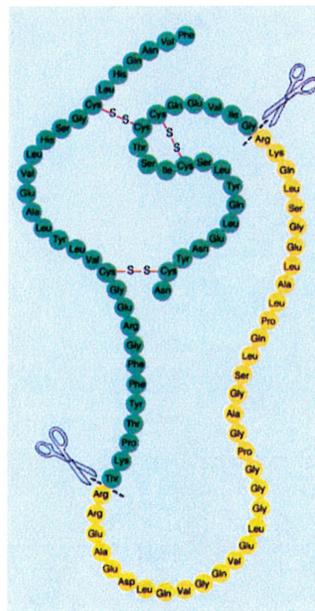


Figure 2. Structure de l'insuline. Le produit initialement synthétisé par les cellules β du pancréas est une chaîne polypeptidique unique comprenant trois ponts disulfure (-S-S-) appelée pro-insuline. Ce produit inactif est converti en insuline lorsque des enzymes détachent sa partie médiane (Marieb, 1993).

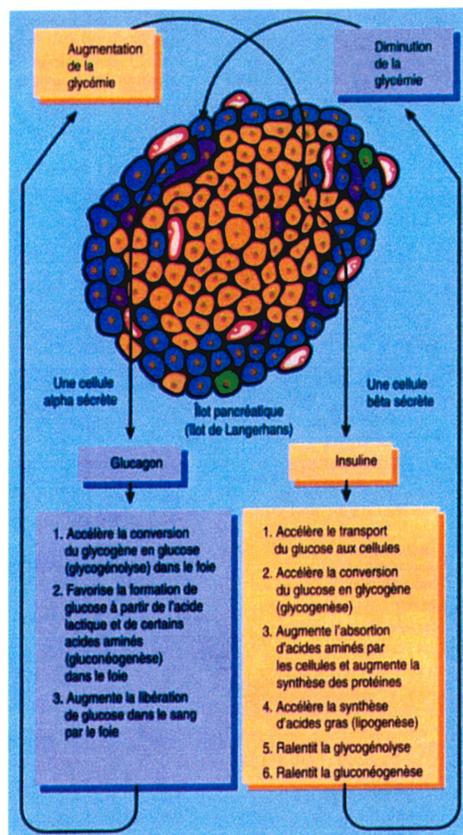


Figure 3. Régulation de la sécrétion du glucagon et de l'insuline (Tortora, 1994).

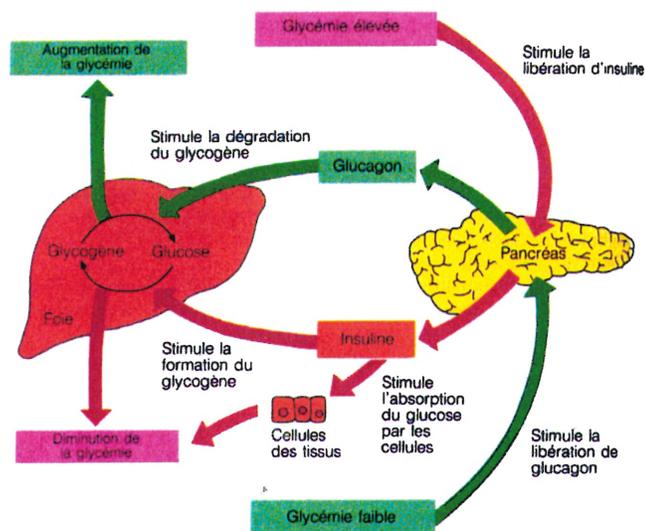


Figure 4. Régulation de la glycémie par l'insuline et le glucagon (Marieb, 1993). Lorsque la glycémie est élevée, le pancréas libère de l'insuline. L'insuline stimule l'absorption du glucose par les cellules et la formation de glycogène dans le foie, ce qui abaisse la glycémie. L'insuline est donc une hormone hypoglycémisante. Lorsque la glycémie est faible, le pancréas libère du glucagon. Le glucagon provoque la dégradation du glycogène en glucose ainsi que sa libération et, par le fait même, élève la glycémie. Le glucagon est donc une hormone hyperglycémisante.

capte le complexe insuline-récepteur par endocytose et l'insuline est ensuite libérée en vue d'une action intracellulaire; 3) la liaison de l'insuline active une kinase associée au récepteur et celle-ci amorce des réactions de phosphorylation activant des enzymes intracellulaires. Entre autres, la liaison de l'insuline accélère 1) le transport du glucose sanguin vers les cellules, 2) la conversion du glucose en glycogène (glycogénèse), 3) l'entrée des acides aminés dans les cellules et la synthèse protéique, et 4) la conversion du glucose ou d'autres nutriments en acides gras (lipogénèse). Par ailleurs, l'insuline 5) diminue la glycogénolyse, et 6) ralentit la gluconéogenèse (Figure 5, page 7) (Tortora, 1994).

La régulation de la sécrétion de l'insuline, comme celle de la sécrétion du glucagon, est déterminée par le taux de glycémie, selon un mode de rétroaction positive. Une élévation de la glycémie stimule la sécrétion d'insuline, tandis que sa diminution inhibe la sécrétion d'insuline. Une augmentation du taux de certains acides aminés dans le sang stimule également la libération d'insuline (Tortora, 1994).

Plusieurs hormones stimulent aussi, directement ou indirectement, la sécrétion d'insuline. Par exemple, l'hormone de croissance (GH), l'adrénaline, la thyroxine et la corticostimuline (ACTH) augmentent la glycémie, ce qui déclenche la sécrétion d'insuline (Tortora, 1994). La somatostatine (GHIH) inhibe la sécrétion d'insuline. L'insuline et, indirectement la GHIH sont les facteurs hypoglycémiantes qui contrent et compensent les effets de nombreuses hormones hyperglycémiantes tel que le glucagon, l'adrénaline, la thyroxine, l'hormone de croissance et les glucocorticoïdes (Marieb, 1993). Une activité accrue du système parasympathique, qui survient après un repas, par exemple, stimule la libération d'insuline (Tortora, 1994). Les concentrations élevées d'insuline correspondent donc aux périodes où l'organisme est bien alimenté. L'insuline induit un accroissement de la prise et de l'utilisation du glucose par la cellule ou une mise en réserve du glucose dans les cellules-cibles telles que celles des tissus musculaire, hépatiques et adipeux, ce qui réduit le taux sanguin de glucose (Marieb, 1993). En somme, la glycémie repose sur un équilibre entre les influences humorales et les influences hormonales.

Le diabète, comme mentionné ci-haut, résulte d'une incapacité de l'organisme à sécréter en quantité suffisante ou à utiliser adéquatement l'insuline. Les trois types

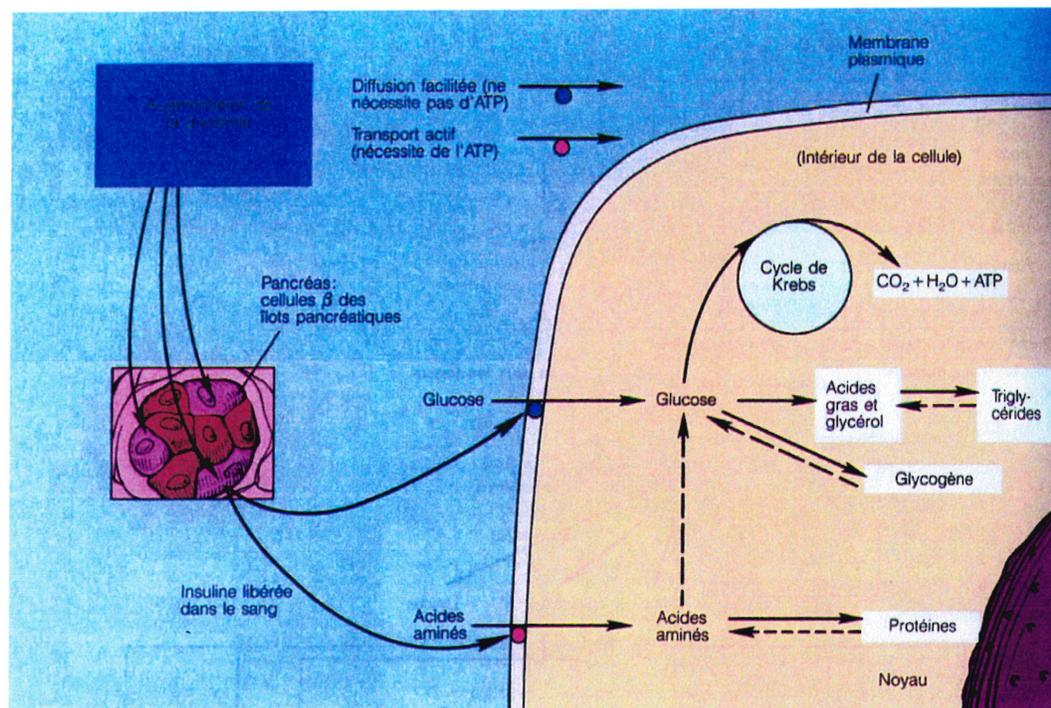


Figure 5. Effets de l'insuline sur le métabolisme. Les flèches pleines indiquent les processus stimulés par l'insuline; les flèches pointillées indiquent les réactions inhibées par l'insuline. Lorsque la concentration d'insuline est faible (au cours de l'état de jeûne), l'activité des voies aux flèches pointillées est accrue et les effets normaux de l'insuline sont inhibés. (Remarquez que tous les effets indiqués ne se produisent pas dans toutes les cellules). (Marieb, 1993).

de diabète les plus fréquents sont : le diabète gestationnel, le diabète de type II et le type I.

1.1.3. Diabète gestationnel

Le diabète gestationnel est une intolérance au glucose découverte pour la première fois au cours d'une grossesse. Cette forme de diabète est généralement transitoire et disparaît dans les six semaines suivant l'accouchement. Les femmes qui présentent cet état risquent davantage de développer un diabète de type II par la suite (Santé Canada, 1999).

1.1.4. Diabète de type II

Le diabète de type II, ou diabète des adultes, est une maladie dans laquelle les tissus périphériques tels que le muscle, le foie et les cellules adipeuses répondent mal à l'insuline (Marieb, 1993). Dans cette maladie, il y a également une baisse progressive de la sécrétion d'insuline. Le diabète de type II ou non insulino-dépendant apparaît la plupart du temps après l'âge de 40 ans, et sa fréquence augmente au fil des années. Il représente plus de 90% des cas connus de diabète sucré (Marieb, 1993). L'hérédité est un facteur prédominant de cette maladie. Elle se caractérise par une insuffisance (et non une absence) de l'insuline ou par une anomalie post-récepteur de l'action de cette hormone. Il cause presque toujours l'embonpoint mais rarement l'acidocétose. L'exercice physique et un régime alimentaire approprié viennent fréquemment à bout des symptômes. La maîtrise du poids est primordiale, car l'obésité à elle seule réduit la sensibilité des récepteurs de l'insuline. Toutefois, l'effet de la diète et de l'exercice persiste rarement et la plupart des patients devront éventuellement prendre des médicaments antidiabétiques comme la metformine, les thiazolidinediones ou les sulfonyles. Ces derniers médicaments stimulent la sécrétion d'insuline par les cellules β du pancréas. Un grand nombre de diabétiques de type 2 ont un taux d'insuline sanguin suffisant ou même excessif. Dans ce cas, le diabète n'est pas causé par une carence en insuline, mais par une baisse de la sensibilité des cellules à l'insuline. C'est donc pourquoi, on l'appelle diabète non insulino-dépendant. Cependant, à long terme, un

grand nombre de diabétiques de type 2 avec une pathologie plus sévère ont besoin d'insuline.

1.1.5. Diabète de type I

Le diabète de type I ou insulino-dépendant était autrefois appelé diabète juvénile car il apparaît de façon spontanée, généralement avant l'âge de 15 ans. Il résulte de la destruction des cellules β des îlots pancréatiques par des auto-anticorps (réponse auto-immune) (Marieb, 1993). Le diabète de type I se traduit par une diminution importante d'insuline dans la circulation (Marieb, 1993). Les personnes qui en souffrent doivent s'administrer quotidiennement une ou plusieurs injections d'insuline afin de prévenir l'acidocétose et l'hyperglycémie. Le métabolisme d'un sujet atteint de diabète de type I non traité est semblable à celui d'une personne qui meurt de faim (Tortora, 1994). Puisqu'en l'absence d'insuline, le glucose ne peut pas pénétrer dans les cellules du corps, la plupart des cellules utilisent des acides gras pour produire de l'ATP. Le catabolisme des acides gras entraîne la production d'acides organiques appelés cétones (corps cétoniques). S'ils s'accumulent plus rapidement que l'organisme ne peut les utiliser ou les excréter, il en résulte une chute du pH sanguin, ce qui cause la cétose ou l'acidocétose. Le système nerveux y réagit en instaurant une respiration rapide et profonde afin que le gaz carbonique s'évacue du sang et que l'élimination des ions H^+ qui en découle produise une augmentation du pH sanguin (Marieb, 1993). Laissée sans traitement, l'acidocétose perturbe presque tous les processus physiologiques, y compris l'activité cardiaque et le transport de l'oxygène. L'affaiblissement de l'activité nerveuse amène le coma et, finalement, la mort (Marieb, 1993).

Le catabolisme des graisses emmagasinées ainsi que celui des protéines provoque également une perte de poids. À mesure que les lipides sont transportés par le sang depuis les endroits où ils sont emmagasinés jusqu'aux cellules, des particules lipidiques sont déposées dans les parois des vaisseaux sanguins. Ce phénomène entraîne l'athérosclérose et une multitude de problèmes cardio-vasculaires, dont la maladie vasculaire cérébrale, l'insuffisance coronarienne, les maladies vasculaires périphériques et la gangrène (Tortora, 1994). Une des complications majeures du diabète est la perte de la vision causée par les cataractes (l'excès de glucose s'attachant chimiquement aux protéines du cristallin et entraînant son opacification) ou par des lésions aux vaisseaux

sanguins de la rétine (Tortora, 1994). Des dommages aux vaisseaux sanguins et l'épaississement des membranes basales au niveau des reins peuvent également provoquer de graves problèmes rénaux (Tortora, 1994).

Le diabète débalancé (non contrôlé) présente trois symptômes majeurs. Le premier est la polyurie, une excrétion de quantités excessives d'urine. La polyurie est due à la présence d'un surcroît de glucose (et, dans les cas d'acidocétose, de corps cétoniques) dans le filtrat rénal, ce qui entrave la réabsorption de l'eau par les tubules rénaux. La polyurie provoque la diminution du volume sanguin et la déshydratation. Cherchant à éliminer l'excès de corps cétoniques, l'organisme excrète aussi de grandes quantités d'électrolytes. En effet, les corps cétoniques ont une charge négative, et ils entraînent avec eux des ions positifs, notamment du sodium et du potassium ainsi qu'un certain volume d'eau, ce qui accentue la déshydratation. Le déséquilibre électrolytique cause des douleurs abdominales et des vomissements, et le stress s'accroît d'avantage. Le deuxième signe du diabète est la polydipsie, c'est-à-dire une soif excessive. La polydipsie est occasionnée par la déshydratation qui stimule les centres hypothalamiques de la soif. Enfin, le troisième signe est la polyphagie, une exagération de la faim et de la consommation d'aliments. La polyphagie résulte du fait que l'organisme ne peut utiliser le glucose dont il est pourtant abondamment pourvu. Il puise plutôt dans ses réserves de lipides et de protéines pour son métabolisme énergétique (Marieb, 1993).

1.1.4.1. Auto-immunité

On parle de réaction auto-immune ou d'auto-immunité lorsque les médiateurs humoraux et cellulaires du système immunitaire (censés protéger l'organisme) se retournent contre les cellules de ce même organisme suite à un dérèglement. L'environnement et les facteurs génétiques jouent certainement un rôle dans l'auto-immunité mais ceux-ci n'ont pas été clairement identifiés (Boker, 2001). L'étude de l'auto-immunité spécifique aux cellules β du pancréas dans le diabète insulino-dépendant utilise principalement deux modèles animaux : les souris NOD (nonobese diabetic) et le rat BB (BioBreeding). Les études sur ces animaux ont grandement aidé à élucider et comprendre la pathogenèse du diabète auto-immun (Yoon, 1998). Il y a 20 ans,

Botazzo *et al.* ainsi que Maccuish ont été les premiers à détecter les anticorps dirigés contre les îlots du pancréas (Yoona, 2001). L'antigène GAD (acide glutamique décarboxylase) a été un des auto-antigènes mis en évidence dans les cellules des îlots (Baekkeskov, 1990). Cet auto-antigène de 64 kDa, identifié dans les cellules β du pancréas chez les patients atteints du diabète de type I, est localisé dans les microvésicules synaptiques (Yoona, 2001).

Présentement, deux isoformes distincts de GAD ont été identifiés soit GAD67 et GAD65. Les humains et les rats expriment principalement GAD65, tandis que GAD 67 est prédominant chez la souris (Faulkner-Jones, 1993 et Kim, 1993). Le niveau élevé d'expression de GAD65 dans le diabète serait mitigé chez la souris NOD (Bridgett, 1998). Cependant, les études de Yoon démontreraient que l'antigène GAD jouerait un rôle dans le déclenchement du processus auto-immun du diabète de type I chez la souris NOD (Yoon, 1999).

L'insuline est également un candidat logique pour un auto-antigène dans le diabète, puisque l'insuline est spécifique aux cellules β . Il a été rapporté que la prise orale d'insuline retarde la progression de la maladie, phénomène résultant de l'induction de l'immuno-régulation des cellules T, chez la souris NOD (Zhang, 1991). De plus, l'administration par injection intrathymique, sous-cutanée ou intra-nasale de la chaîne β de l'insuline chez la souris NOD préviendrait l'apparition du diabète (Wong, 1999). Plus récemment, on a trouvé qu'un clone diabétogénique de cellule CD8+, qui cause le diabète chez la souris néonatale NOD, reconnaît les acides aminés 15-23 de la chaîne β de l'insuline (Wong, 1999). Ces résultats indiquent que l'insuline pourrait bel et bien constituer un auto-antigène important dans la mise en place du diabète de type I chez la souris NOD. Les anticorps anti-insuline sont détectés dans plus de 59% des patients récemment diagnostiqués diabétiques (Yoona, 2001).

Un autre antigène qui pourrait avoir un rôle majeur dans le diabète auto-immun serait la protéine IA-2 (37/40 kDa Tryptic Fragment) qui ferait partie de la famille des protéines tyrosine phosphates (PTP) (Yoona, 2001). La protéine IA-2 serait le précurseur de 37 et/ou 40 kDa du fragment tryptique des auto-antigènes des îlots. (Bonifacio, 1995). La présence d'auto-anticorps contre cette protéine est révélée dans 70% des patients

atteints de diabète de type I (Yoona, 2001). Cependant, cet auto-anticorps n'est pas détecté chez la souris NOD et le rat BB (Yoona, 2001).

Les médiateurs humoraux ne sont toutefois pas les seuls responsables de la destruction des cellules β des îlots de Langerhans. Il a été démontré que la population des cellules infiltrant les îlots durant le début du diabète chez le rat BB et la souris NOD est principalement composée de macrophages et de cellules dendritiques (Yoon, 1998). Il a aussi été démontré que les souris NOD déficientes en lymphocytes B, ne développent pas le diabète (Serreze, 1996), et que la déplétion en lymphocytes B par traitement avec des anticorps spécifiques empêche le développement de la maladie (Noorchashm, 1997). La thymectomie néonatale des rats BB prévient également le développement du diabète (Like, 1982) et les rats BB traités avec un anticorps monoclonal (OX-19) dirigé contre les antigènes exprimés sur la surface de toutes les cellules T ne développent pas le diabète (Like, 1986). Ceci indique que les cellules T jouent un rôle important dans la destruction des cellules β . Chez la souris NOD, il est clair que les cellules T jouent un rôle critique dans le développement du diabète auto-immun. Les souris NOD athymiques et les souris NOD *scid* athymiques, ne développent pas le diabète (Ogawa, 1985 et Makino, 1986). Le traitement des souris NOD avec un anticorps anti-CD3 inhibe le développement de la maladie (Makino, 1986). De plus, la plupart des études de transfert de cellules T de la rate de souris NOD démontrent que le transfert du diabète requiert les deux types de cellules T, CD4+ et CD8+ (Christianson, 1993 et Bendelac, 1987).

En plus du rôle des macrophages dans la destruction des cellules β par les cellules T, il y a d'autres facteurs intervenant dans ce phénomène. Les cytokines comme Il-1 β (interleukine-1 β), TNF (tumor necrosis factor), et l'IFN (interféron), relâchées par les macrophages activés semblent être toxiques pour les cellules β (Mandrup-Poulsen, 1987 et Appels, 1989). En plus, les cytokines produites lors de l'infiltration des macrophages dans les îlots, contribueraient aux dommages faits aux cellules β en induisant la production de radicaux libres et de peroxyde d'hydrogène, produits toxiques pour les îlots (Corbett, 1992). Les cytokines produites par les cellules T, entre autres IL-2, IFN, IL-4, IL-10 et TGF- β (transforming growth factor), jouent également un rôle important mais complexe dans la pathogenèse du diabète de type I (Rabinovitch, 1998).

En fait, le diabète insulino-dépendant est une maladie auto-immune avec une étiologie multifactorielle. Il est clair que la compréhension des mécanismes impliqués dans la pathogénèse et l'étiologie de la maladie n'est pas facile. Les modèles animaux comme la souris diabétique non-obèse (NOD) et le rat BioBreeding (BB), présentent des diabètes auto-immuns spontanés (similaire à celui de l'humain). Ils sont donc très utiles pour étudier les mécanismes de développement de l'auto-immunité. Les auto-antigènes de cellules β , macrophages/cellules dendritiques, lymphocytes B et T jouent tous des rôles importants dans le développement de la maladie chez la souris NOD. Les auto-antigènes des cellules β identifiés (GAD et insuline) sont considérés comme étant les plus importants auto-antigènes dans le développement de la maladie. Les cellules B jouent clairement un rôle comme cellules présentatrices d'antigènes, particulièrement pour les auto-antigènes des cellules β (Yoona, 2001). Les macrophages, qui infiltrent les îlots dès le début du processus sont considérés comme les collaborateurs primaires de l'immunité conduisant au développement et à l'activation des cellules B cytotoxiques et des cellules T (Yoona, 2001). Les cellules T CD4+ et CD8+ jouent un rôle comme effecteurs finaux dans la destruction des cellules β du pancréas.

En dépit de leur grande utilité, les modèles animaux étudiés ne présentent pas un diabète en tout point identique à celui de l'humain (Yoona, 2001). Toutefois, les informations obtenues de ces modèles nous permettent d'évaluer et de comprendre les mécanismes de développement de la maladie ainsi que l'élaboration de stratégies de prévention.

1.1.4.2. Complications

Depuis la mise en marché de l'insuline humaine synthétique, plusieurs des effets indésirables des insulines animales sont épargnés au diabétiques. Les personnes atteintes de diabète présentent des complications de nature vasculaire et nerveuse à plus ou moins longue échéance (Marieb, 1993). Parmi les problèmes vasculaires, on compte l'athérosclérose, les accidents cérébro-vasculaires, les crises cardiaques, la gangrène et la cécité; la perte de sensibilité, les troubles vésicaux et l'impuissance découlant des neuropathies. Donc, cette hyperglycémie chronique due au diabète peut entraîner à long

terme des lésions, des perturbations fonctionnelles et une insuffisance au niveau de divers organes soient les reins, les yeux, les nerfs, le cœur et les vaisseaux sanguins.

1.2. Traitements possibles

La première découverte ayant grandement amélioré le sort des personnes atteintes de diabète fut celle de l'insuline. En effet cette découverte de l'insuline par Banting, Best, Collip et Macleod (Peterson, 1982), a grandement ouvert la porte à une vie plus normale pour les diabétiques. On effectue actuellement d'importantes recherches dans le but de trouver des moyens de prévenir le diabète insulino-dépendant ou d'améliorer l'état des sujets qui en sont atteints. On essaie aussi d'élaborer un pancréas artificiel qui surveillerait le taux de glycémie et qui administrerait automatiquement l'insuline nécessaire à partir d'un réservoir (Tortora, 1994). Plusieurs types de greffes ont également été tentées. Il est possible aujourd'hui de transplanter un pancréas entier mais le receveur doit alors prendre pour le reste de sa vie des immunosuppresseurs pour prévenir le rejet du greffon. Une autre méthode consiste à greffer des îlots de Langerhans que l'on a traités au préalable pour empêcher leur rejet par le receveur. Dans d'autres cas, on propose d'immunoprotéger les îlots de Langerhans dans un dispositif devant permettre l'entrée du glucose et la sortie de l'insuline et empêcher l'entrée des éléments responsables du rejet.

1.2.1. Insulinothérapie

L'insulinothérapie a donc été la première forme de traitement disponible aux diabétiques de type I. L'insuline utilisée jusqu'en 1982 était d'origine animale soit de porc ou de bœuf (Burge, 1997). Celles-ci ont d'ailleurs une séquence en acides aminés très proche de l'insuline humaine. L'avancement du génie génétique a permis aux débuts des années 1980 de produire des insulines humaines biosynthétiques (Burge, 1997). L'insulinothérapie s'est modifiée et perfectionnée avec les années mais le principe de base reste le même. Elle consiste à s'injecter de façon sous cutanée, plusieurs fois par jour une dose d'insuline. Elle nécessite par le fait même la prise régulière de la glycémie mais également une diète stricte donc un calcul rigoureux des rations alimentaires pour avoir un certain contrôle du diabète (Santé Canada, 1999).

Dans le système physiologique normal, l'homéostasie qui existe entre l'insuline relâchée et le taux de glucose présent dans le sang est en fait un équilibre quasi parfait et instantané. Mais malgré la modernisation des lecteurs de glycémie et la présence sur le marché de meilleurs injecteurs d'insuline, l'insulinothérapie demeure une méthode impliquant un délai entre la variation de la glycémie et l'arrivée de l'insuline dans la circulation. Dans l'insulinothérapie, la dose d'insuline injectée est donnée selon la mesure de la glycémie prise précédemment. Mais puisque celle-ci ne peut être prise à toutes heures du jour et de la nuit, l'insulinothérapie n'est en fait qu'une piètre imitation du phénomène physiologique. En conséquence, toutes les variations glycémiques incontrôlées contribuent à l'apparition des effets secondaires à long terme. L'insulinothérapie se révèle donc être une bonne méthode à court terme mais ne permet pas de prévenir l'apparition des effets secondaires à long terme. De plus, de nombreux patients, malgré une insulinothérapie contrôlée adéquatement, ne réussissent pas à contrôler leur glycémie.

1.2.1.1. Types d'insuline

L'importance de contrôler la glycémie des diabétiques et les concepts de thérapie intensive ont notamment été étudiés dans le DCCT (Diabetes Control and Complications Trial) publié en 1993. Cette étude a conclu que l'insulinothérapie intensive, soit plus de trois injections d'insuline par jour et plus de quatre mesures de glycémie par jour, ainsi qu'un régime alimentaire calculé et de l'activité physique contrôlée, ne peuvent pas normaliser la glycémie. Toutefois, elle permet un certain contrôle de la glycémie et ainsi aide à ralentir l'apparition des complications à long terme.

Il existe aujourd'hui plusieurs types d'insuline disponibles sur le marché. Les trois principaux types d'insuline sont 1) l'insuline à courte action 2) l'insuline à action intermédiaire et 3) l'insuline à longue action avec un début d'action lent. L'insuline régulière (à courte durée d'action) est une insuline soluble qui a un effet physiologique qui débute 30 à 60 minutes suivant l'injection sous-cutanée. Elle atteint un maximum d'effet 2 à 4 heures après l'injection et peut durer jusqu'à 6 à 8 heures (Heinemann 1993). Les insulines lentes et NPH (Neutral Protamine Hagedorn) (action intermédiaire)

débutent leur action une à trois heures après leur administration et atteignent leur maximum quatre à huit heures après leur injection. Elles ont une durée d'action de 13 à 20 heures (Starke, 1989). L'insuline ultralente commence à agir 2 à 4 heures après l'injection, atteint son effet maximum après 8 à 10 heures et a une durée d'action de 18 à 20 heures (Heinemann, 1993). T. Donowsky a été le premier à publier sur le traitement intensif à l'insuline dans *Diabetes Care* (Bure, 1997). Ses études ont démontré que l'insuline régulière prise avant chaque repas, combinée avec l'insuline NPH prise au coucher permettait de contrôler la glycémie.

1.2.1.2. Analogues de l'insuline

De nombreux analogues de l'insuline (courte et longue durée d'action) ont été élaborés dans le but d'améliorer le profil d'absorption (Barnett, 1997). Le développement de ces analogues possédant des propriétés pharmacocinétiques supérieures à l'insuline elle-même, permet de mieux imiter les profils d'insulinémie physiologiques, autant après un repas que durant les périodes de glycémie basale. L'insuline glargine, par exemple, a été produite par des techniques d'ADN recombinante à partir d'une lignée d'*Escherichia coli*. Cet analogue permet un contrôle basal de la glycémie approximativement pour 24 heures (McKeage, K. 2001). Ce nouvel analogue permettrait de diminuer les épisodes nocturnes d'hypoglycémie. Les insulines lispro et aspart permettraient pour leur part, de mieux reproduire le profil physiologique de l'insuline en maintenant un meilleur contrôle de la glycémie post-prandiale (Zachary, 2002). De nombreuses combinaisons d'insuline et d'analogues de l'insuline font présentement l'objet d'études cliniques, mais la réponse ne réside pas dans un meilleur traitement unique puisque chaque patient répond différemment à la médication. L'administration des diverses insulines se fait présentement par injection sous-cutanée. Il y a présentement 180 marques de préparations d'insuline disponibles. La consommation se divise en 26% pour l'insuline soluble (régulière), 35% en insuline de base et 39% en insuline prémixée (Owens, 2001).

1.2.2. Pancréas artificiel

Depuis les 75 dernières années, les injections sous-cutanées semblaient être la seule voie possible pour délivrer l'insuline afin de traiter les diabétiques de type I. Aujourd'hui, plusieurs voies alternatives d'administration sont à l'étude. Notamment, la voie intra-nasale, intra-pulmonaire et orale (Saudek, 1993, 1997; Burge, 1997; Heinemann, 2001). L'insulinothérapie d'aujourd'hui est adaptée à la vie des diabétiques, mais elle reste une thérapie imparfaite puisqu'elle essaie mais ne réussit pas parfaitement à imiter le profil physiologique de l'insuline. Une des voies de recherche très active est la reconstitution d'un pancréas artificiel. Cet appareil comprend : une pompe à insuline servant de réservoir et de distributeur à l'insuline; un détecteur de glucose qui dose la glycémie en vue de l'administration d'insuline; un instrument de contrôle qui analyse les résultats glycémiques pris par le détecteur et qui détermine et administre la dose d'insuline appropriée (Jaremko, 1998). Cependant, plusieurs problèmes techniques ne sont pas résolus en particulier la calibration et la stabilité du détecteur de glucose.

1.2.2.1. Pompe à insuline

Il y a eu de nombreux progrès dans le développement d'un pancréas bio-mécanique, mais les meilleurs prototypes sont encore imparfaits. La pompe à insuline est la composante du pancréas artificiel qui a le plus été étudiée. Le DCCT a d'ailleurs décrété que les patients traités avec les pompes externes pour infusion d'insuline (CSII) démontraient un contrôle des glycémies légèrement supérieur à celui des patients traités par de multiples injections plusieurs fois par jour et que la thérapie était mieux tolérée (Diabetes Control and Complications Trial Research Group, 1995). Depuis les dernières années, les nouvelles pompes à insuline sont plus petites, plus efficaces et faciles d'utilisation. Les nouvelles pompes pèsent environ 400g, et opèrent toutes de façon similaire. La pompe à insuline contient une cartouche remplie d'insuline connectée à un cathéter qui est inséré dans le tissu sous-cutané. La pompe délivre continuellement un

niveau basal d'insuline prédéterminé pour les demandes d'insuline en périodes basales. Le dispositif permet de programmer de plusieurs façons différentes un niveau basal d'infusion, bien que la plupart des patients requièrent seulement 4 à 6 niveaux. Il est aussi possible d'infuser un bolus pour couvrir les besoins d'insuline pendant les repas et les collations (Lenhard, 2001).

Mais ces nouvelles pompes ne peuvent être qualifiées de pancréas artificiel. Le patient doit donc surveiller lui-même sa glycémie et donner des bolus d'insuline puisqu'il n'y a pas de rétroaction de la glycémie sur la vitesse d'infusion. Il doit également suivre un régime alimentaire strict et un programme d'exercice. Les avantages de cette technique sont toutefois nombreux. Tout d'abord, la gestion intensive du diabète avec le CSII permet un meilleur contrôle de la glycémie qu'avec les méthodes conventionnelles (Tamborlane, 1980; Pickup, 1979; Kobayashi, 1983; Schiffrin, 1982; Reeves, 1982; Bischof, 1994; Lauritzen, 1983; Koivisto, 1986; Haakens, 1989; Guerci, 1998). De plus, quelques rapports ont suggéré que les hypoglycémies sévères sont réduites avec le CSII comparativement avec la méthode de traitement MDI (multiple daily injections), sans réduire pour autant le contrôle glycémique (Bode, 1996; Haardt, 1997). Le CSII améliorerait ou diminuerait, selon les groupes, la progression des neuropathies diabétiques (Feldt-Rasmussen, 1986; Dahl-Jorgensen, 1992), des rétinopathies (Helve, 1987; Bibergeil, 1987; Selam, 1986; Shimizu, 1991), des hypertriglycémidémies et des hypoalphalipoprotéïnémies (Falko, 1982; Lawson, 1984). Si le CSII est choisi comme traitement, c'est d'abord et avant tout en raison de l'amélioration de la qualité de vie des diabétiques (American Association of Diabetes Educators, 1986).

Par contre, cette méthode comporte également des désavantages. Des rapports signalent notamment des cas de mortalité avec le CSII qui s'expliquent par les nombreux risques associés avec cette méthode (Teutsch, 1984). Par exemple, si le débit de l'insuline est interrompu, l'acidocétose se développe plus rapidement et plus fréquemment avec le CSII qu'avec d'autres méthodes (The Kroc Collaborative Study Group, 1984; Mecklenburg, 1984; Home, 1984). La plus commune des complications associées au CSII est une infection au site d'infusion causée habituellement par des bactéries telles que *Staphylococcus* ou *Streptococcus* (Pietri, 1981; Mecklenbure, 1984; Chantelau, 1987; Midthjell, 1994). Le coût est également un désavantage puisque l'achat de la pompe seulement peut atteindre 5000\$. L'inconvénient majeur reste l'absence d'un

système rétroactif. Une nouvelle approche pour administrer l'insuline est le CIIT (Chronic Intermittent Intravenous Insulin Therapy) qui délivre l'insuline selon un mode pulsatile, et achemine l'insuline à des concentrations physiologiques dans la veine portal (Aoki, 2001).

1.2.2.2. Détecteurs continus de glucose

Les détecteurs de glucose sont des appareils automatisés qui détectent et analysent la glycémie de façon constante. Les détecteurs de glucose implantables sont la base du système en circuit fermé pour le contrôle du glucose pour les patients diabétiques. Malgré tous les efforts qu'ont déployé de nombreux groupes de recherche durant les 30 dernières années, les détecteurs de glucose implantables ne sont à ce jour toujours pas disponibles en utilisation clinique pour les diabétiques (Kerner, 2001). Cependant, les résultats des recherches ont permis de développer un système d'analyse du glucose à court terme implantable sous la peau. Il y a deux systèmes de mesure du glucose sous-cutané : un avec des électrodes électro-enzymatiques et l'autre par microdialyse couplée avec un système de détecteur externe. Un autre type de détecteur mesure le glucose à la surface de la peau dans le fluide interstitiel par iontophorèse transdermale (Kerner, 2001). À ce jour, les études cliniques de ces détecteurs ne sont pas terminées. Aujourd'hui, les détecteurs de glucose électrochimiques implantés sous la peau sont disponibles pour fournir de l'information au médecin sur le profil glycémique de 72 heures. Cette information permet de prendre des décisions thérapeutiques plus éclairées (Heller 1999).

1.2.3. Transplantation de pancréas

En ce moment, la transplantation de pancréas est le seul traitement efficace pour rétablir une sécrétion d'insuline endogène capable de contrôle rétroactif. Elle est la seule thérapie à induire un état normoglycémique insulino-indépendant (David, 2001). La première transplantation clinique de pancréas a été réalisée à l'Université du Minnesota en 1966 (Kelly, 1967). En 1998, le IPTR (International Pancreas Transplant Registry) a rapporté plus de 11 000 transplantations de pancréas à travers le monde, dont plus de 8000 aux États-Unis seulement (Sutherland, 1999). Dans la dernière décennie, la transplantation de pancréas a évolué et des procédures cliniques ont été établies (Hopt,

2000). L'immunosuppression a également été introduite afin d'assurer la réussite de la transplantation (Sutherland, 1995). Les recherches démontrent que la fonction du pancréas transplanté est préservée à long terme, puisque la transplantation est fonctionnelle dans 60% des cas après 10 ans. Le niveau de glucose sanguin est normalisé complètement avec la transplantation de pancréas (Morel, 1991; Hopt, 2000).

Avec les avancements chirurgicaux et l'amélioration de la préservation des organes et de l'immunosuppression, la survie des greffes de pancréas après un an atteint 90% (Krishnamurthi, 2001). Cependant, la transplantation de pancréas est réservée à une clientèle restreinte. Cette clientèle, est constituée de patients qui ont un diabète incontrôlé et qui sont en attente d'une greffe rénale (Kendall, 1997). Le choix des patients se fait selon l'analyse des avantages et des inconvénients de la transplantation. En effet, le balancier doit être maintenu à l'équilibre entre le haut risque de l'immunosuppression nécessaire pour le succès de la transplantation, ainsi que les risques de la transplantation elle-même versus le risque des complications secondaires du diabète. La transplantation du pancréas nécessite une chirurgie majeure. Elle nécessite des drainages urinaires et entériques et les risques de complications post-chirurgie sont importants (Ozaki, 1992; Douzjian, 1993; Eisenbarth, 1996).

1.2.4. Transplantation d'îlots de Langerhans

Comme nous venons de voir, la transplantation de pancréas est une chirurgie difficile et complexe. C'est une des raisons pour laquelle l'idée de la transplantation d'îlots de Langerhans a vu le jour. En effet, la transplantation d'îlots comporte de nombreux avantages. Elle permet premièrement d'avoir accès à de nombreux sites de transplantation de par la taille minime du greffon (Alejandro, 1987; Mintz, 1988; Calafiore, 1997). Deuxièmement, les chirurgies pour l'implantation sont généralement mineures en raison encore une fois de la taille réduite de l'implant (Alejandro, 1987; Mintz, 1988). Troisièmement, la cryopréservation des îlots est réalisable dans le but d'une utilisation future, ce qui permet de contourner en partie le problème du manque de donneurs (Warnock, 1999). Toutefois, l'utilité de la cryopréservation n'a pas été confirmée car cette méthode induit une perte considérable d'îlots. On a tendance à revenir à l'utilisation d'îlots frais (Shapiro, 2000). Quatrièmement, elle permet de

diminuer la proportion d'immunosuppresseurs. Enfin, elle permet l'immunoprotection via de nouvelles techniques de plus en plus diversifiées et ingénieuses qui pourront probablement permettre d'avoir recours à la xénogreffe (Newgard, 1995).

Les îlots de Langerhans sont isolés à partir du pancréas à l'aide d'un mélange d'enzymes, incluant la collagénase, qui digèrent le tissu pancréatique. Ainsi, les îlots sont libérés et sont ensuite purifiés à l'aide d'un gradient de sédimentation (Lacy, 1967). Avec l'introduction de l'automatisation, la technologie dans ce domaine a grandement évolué. Aujourd'hui, il existe une méthode automatisée pour la digestion du tissu pancréatique (Ricordi, 1988). Cependant, malgré les nombreux avantages et les moindres risques impliqués, la transplantation d'îlots n'avait pas donné, jusqu'à tout récemment, les fruits escomptés. De 1990 à 1995 dans différents centres du monde entier, quinze allogreffes d'îlots ont été effectuées. Neuf des receveurs sont initialement devenus insulino-indépendants et six sont demeurés dans cet état durant plus d'un an (Hering, 1999). Habituellement, seulement 10% des allogreffes sont réussies (Boker 2001). Pour les autogreffes, de 1977 à 1996, 170 cas ont été rapportés. Le rapport complet n'est accessible que pour 18 de ces cas. Tous les patients ont eu une pancréatectomie complète et ont reçu une greffe après isolement d'îlots. Seize des patients ont été initialement insulino-indépendant après la transplantation et 13 pour une période d'au moins un an (Wahoff, 1995). Le haut niveau de succès des autogreffes versus l'allogreffe dans le diabète de type I indiquent qu'on ne peut attribuer l'insuccès à des problèmes techniques (Wahoff, 1995). Les problèmes proviendraient théoriquement 1) d'une méthode d'isolation inadéquate, 2) d'une quantité d'îlots insuffisante, 3) du rejet du greffon ou de la progression de l'auto-immunité (Lakey, 1996; Boker, 2001).

Après les nombreuses études réalisées, un groupe a finalement réussi l'impensable. En effet, le groupe d'Edmonton, avec un nouveau protocole de transplantation d'îlots a réussi non pas une, mais plusieurs allogreffes. Ils ont transplanté par voie hépatique quinze patients qui sont devenus insulino-indépendants (Shapiro, 2000). Ils ont démontré que l'âge du donneur, l'indice de masse corporelle (BMI) et une équipe de prélèvement locale sont en corrélation positive avec la réussite de l'isolation des îlots (Lakey, 1995). La prévention de la perte des îlots passe également par une réduction du temps d'ischémie froide, i.e. de huit à seize heures entre l'obstruction artérielle et le

début de l'isolation (Lakey, 1995). Le temps en culture des îlots et leur stockage par cryopréservation sont des facteurs négatifs, car ils accroissent la perte des îlots (Rajotte, 1995). Finalement, le nombre d'îlots transplantés joue également un rôle important dans le succès de la transplantation.

Avec l'introduction de la Liberase, un mélange standardisé d'enzymes hautement purifiées, la qualité et la quantité d'îlots humains isolés se sont grandement améliorées (Linetsky, 1997). Le risque de perte d'îlots durant les procédures d'isolation et de préservation est davantage augmenté par le stress oxydatif et par les changements rapides de température ou d'osmolarité qui causent des changements moléculaires au niveau des îlots.

Il y a des évidences que la plupart des îlots transplantés sont détruits par une réponse cellulaire précoce, impliquant les macrophages et leurs produits de sécrétion. Cette réaction surviendrait avant même que les dommages médiés par les cellules T apparaissent (Kaufman, 1990).

Bien qu'il existe encore des problèmes importants, le défi que représente l'insulinodépendance peut être vaincu chez quelques patients grâce à la greffe des îlots du pancréas. Cependant, le succès des essais cliniques est toujours limité par plusieurs facteurs dont 1) l'impossibilité de greffer suffisamment d'îlots humains viables pour compenser l'état insulino-déficient; 2) le nombre d'îlots restant viables après la transplantation; 3) le rejet et la réapparition de la réaction auto-immune. Les progrès importants accomplis dans le domaine des régimes immuno-dépresseurs, les techniques de prélèvement d'organes, l'amélioration des techniques d'isolation et la disponibilité des mélanges de collagénase ont tous contribué à l'espoir de faire de la transplantation des îlots de Langerhans, le traitement de choix pour le diabète de type I (Boker, 2001).

1.2.4.1. Xénogreffe

Le recours à la xénogreffe constitue une possibilité intéressante pour régler un des problèmes majeurs de la transplantation d'îlots, celui du manque de donneurs. En effet, la xénogreffe par définition, implique la greffe de tissu entre deux sujets appartenant à

des espèces différentes. Afin d'assurer la réussite d'une telle entreprise, il faut préalablement se soucier de la correspondance entre l'activité des insulines. Une insuline totalement différente de celle de l'homme, ne pourra donner le succès escompté. Dans cette optique, la xéno greffe d'îlots de porc ou de chien chez l'humain pourrait donner des résultats intéressants, puisque leur insuline ne diffère de la nôtre que par un seul acide aminé. Cependant, les mécanismes de rejet du greffon inhérents à la xéno greffe sont aussi importants, sinon plus, que ceux rencontrés en situation d'allogreffe (Hammer, 1992). Tous les types de xéno greffes impliquent des mécanismes immunologiques et les études démontrent que ceux-ci ont un impact semblable aux transplantations allogéniques (Hammer, 1998_a). L'incompatibilité dans les allogreffes est régie par les facteurs immunologiques tel le CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) de classe I. Les caractéristiques anatomiques, physiologiques et biochimiques sont identiques, mais dans la xéno greffe, les mécanismes immunologiques sont différents (Hammer, 1998_b). De plus, l'éthique sur ce nouveau sujet n'est pas encore définie et les mœurs et coutumes de la population diffèrent selon la nationalité et/ou la croyance religieuse, ce qui peut avoir un impact.

1.2.4.2. Problèmes reliés

Les problèmes majeurs concernant les transplantations sont toujours le rejet du greffon et la récurrence de la maladie. Une des difficultés dans le rejet de la greffe est l'incapacité de détecter et de traiter ce rejet assez tôt dans le processus pour prévenir la destruction irréversible de la greffe. L'immunosuppression continue, qui est d'une extrême importance pour prévenir le rejet, doit obligatoirement être présente avec la transplantation.

1.3. Immunoprotection

L'étude du rejet du greffon lors d'une transplantation démontre que celui-ci doit être protégé afin de survivre. Une greffe non fonctionnelle n'a pas d'utilité. C'est pourquoi le principe d'immunoprotection a été établi. Il suffit de protéger la greffe contre les

attaques cellulaires ou autres du système immunitaire du receveur. Présentement, il existe quatre types d'immunoprotection : l'immunosuppression, l'immunoaltération, l'induction de la tolérance et l'immunoisolation.

1.3.1. Immunosuppression

L'immunosuppression vise en fait à diminuer ou à supprimer les réactions immunitaires de l'hôte. Elle implique donc la prise d'agents pharmacologiques capables de supprimer l'activité immunitaire de l'hôte. Couramment, les immunosuppresseurs sont généralement utilisés dans la transplantation de cellules ou d'organes (Kahan, 1998). Leur prise entraîne, cependant, de nombreux effets secondaires, notamment au niveau des reins, du foie et du pancréas (Duncan, 1988 ; Leonard, 1989 ; Whiting, 1991). De plus, la sensibilité aux infections est accrue pour les patients immunosupprimés.

Du milieu des années 1980 au milieu des années 1990, la cyclosporine combinée avec l'azathioprine ou des stéroïdes constituait le cocktail de choix en ce qui a trait à l'immunosuppression (Stratta, 1998). La recherche dans le domaine étant très florissante, de nombreux nouveaux immunosuppresseurs deviendront disponibles. Deux d'entre eux sont actuellement approuvés par la FDA (Food and Drug Administration) : FK506 (tacrolimus) et MMF (mycophenolat mofetil) (David, 2001). Le MMF a largement remplacé l'azathioprine et peut être utilisé avec la cyclosporine ou bien le FK506, avec la possibilité de diminuer ou d'éliminer l'utilisation de la prednisone. Ces deux immunosuppresseurs (FK506 et MMF) sont associés à l'amélioration des niveaux de survie dans la greffe de pancréas (Stratta, 1997; Gruessner, 1998; Gruessner, 1999). La cyclosporine et le tacrolimus causent des diabètes post-transplantation par de nombreux mécanismes incluant la diminution de la sécrétion de l'insuline, l'induction de la résistance à l'insuline ou un effet direct et toxique sur les cellules β (Jindal, 1997). Pour les corticoïdes, l'induction de la résistance à l'insuline semble être le facteur prédominant. Pourtant, il a été démontré que ceux-ci réduisent les complications métaboliques des immuno-suppresseurs incluant le diabète post-transplantation (Jindal, 1997).

Quoi qu'il en soit, l'utilisation des immunosuppresseurs doit être balancée entre les possibilités de rejet et l'augmentation de l'incidence du diabète post-transplantation.

Aujourd'hui, avec l'introduction de meilleures drogues plus spécifiques comme l'OKT3, 15-deoxyspergualin, le mycophenolate mofetil, et bien d'autres, l'espoir d'améliorer la survie du greffon devient plus réel (Boker, 2001).

1.3.2. Immunoaltération

L'immunoaltération a comme but de modérer l'immunogénicité des îlots avant la transplantation (Calafiore, 1997). De nombreuses méthodes ont été élaborées afin de réduire l'immunogénicité. Parmi celles-ci, on note la cryopréservation (Flesch, 1991), l'irradiation aux rayons ultraviolets ou gamma (Lau, 1984 ; Hardy, 1991 ; Dellagiacom, 1992), l'utilisation d'anticorps anti-antigènes de classe I ou II (Lacy, 1993 ; Bretzel, 1993 ; Faustman, 1994) et le masquage des molécules d'adhésion (Guymer, 1992). Cependant, certaines études démontrent que les méthodes d'immunoaltération ne sont pas très efficaces (Tze, 1998).

1.3.3. Induction de la tolérance

L'induction de la tolérance est une autre méthode d'immunoprotection. Elle consiste à induire chez le receveur une tolérance face au greffon et par le fait même d'esquiver les réactions précoces du système immunitaire normalement impliquées dans l'échec de la transplantation d'organes. Les méthodes impliquent la préimmunisation ou la création d'un microchimérisme. Par exemple, on peut induire la tolérance par l'introduction intrahépatique d'îlots (Goss, 1996_a). La tolérance est même appliquée dans des cas de xénogreffes, où elle est induite à l'aide de splénocytes (Goss, 1996_b). Certains microchimérismes ont également été réalisés par inoculation de moelle osseuse intrathymique (Odorico, 1993). Des expériences d'induction de la tolérance dans l'allogreffe ont aussi été effectuées (James, 1993). Cette technique s'avère très prometteuse et pourra permettre la transplantation chez un plus grand nombre de patients. Elle permettra également la prévention à long terme pour ainsi améliorer la qualité de vie des diabétiques.

1.3.4. Immunoisolation

L'immunoisolation vise à restreindre l'accès au greffon pour les médiateurs du système immunologique du receveur. L'immunoisolation vient contrecarrer les attaques du système immunitaire en interposant une membrane semi-perméable entre le greffon et l'hôte (Lanza, 1997). La porosité de la membrane permettrait l'entrée de molécules de petits poids moléculaires comme les nutriments, les électrolytes, l'oxygène et certaines substances impliquées dans le métabolisme (glucose, insuline etc.). Mais cette même membrane empêcherait l'entrée de substances de poids moléculaire plus élevé tels les anticorps (Hallé, 1993) et les cellules immunitaires (Soon-Shiong, 1990). Malgré l'espoir grandissant de la réussite de cette approche, certains inconvénients y sont reliés comme la perte de l'innervation et le manque de revascularisation de l'îlot. Ceux-ci ont pour conséquences de diminuer la réponse en insuline. De plus, un autre obstacle entre en ligne de compte : celui de la biocompatibilité. Pour prévenir le rejet, la membrane semi-perméable doit être fabriquée à partir de matériaux biocompatibles.

On utilise le terme pancréas endocrine bioartificiel pour décrire les greffons immunoisolés en raison du fait que l'immunoisolation est surtout appliquée dans le cas des îlots de Langerhans (Reach, 1981). Plusieurs types de pancréas bioartificiels existent, notamment les dispositifs vasculaires, les chambres de diffusion, les capsules biologiques et les microcapsules.

1.3.4.1. Dispositifs vasculaires

Les dispositifs vasculaires emploient une membrane tubulaire qu'on installe entre une artère et une veine (Chick, 1975_b). Ce dispositif est de ce fait vascularisé et l'échange entre le sang et les îlots peut se faire par l'intermédiaire de la membrane semi-perméable. Les îlots sont placés au pourtour de la membrane tubulaire dans une chambre où le sang ne se retrouve pas en contact avec les îlots puisqu'ils sont protégés par la membrane semi-perméable. L'essai des dispositifs vasculaires a été réalisé avec succès, entre autre, dans la xénotransplantation chez le chien et dans l'allotransplantation chez l'humain (Reach, 1981 ; Monaco, 1991 ; Colton, 1995 ;). Les désavantages reliés de cette pratique concernent surtout le nombre limité d'îlots

transplantés (Colton, 1995 ; Lanza, 1997) et les complications liées à une chirurgie majeure.

1.3.4.2. Chambres de diffusion

Les chambres de diffusion sont aussi appelées macrocapsules. Elles sont généralement de deux types : planaires (Jager, 1990; Lanza, 1992_b) ou tubulaires (Zekorn, 1990_a; Colton, 1991; Lanza, 1992_b; Tze, 1994). Ces dispositifs sont normalement implantés dans la cavité péritonéale ou placés sous la peau. Ils peuvent renfermer une grande quantité d'îlots et peuvent facilement être récupérés en raison de leur grande taille. Cette technique a été pratiquée avec succès notamment chez les rongeurs ainsi que dans des xénogreffes de porcs et de chiens (Lanza, 1992_a; Storrs, 2001). Les études semblent toutefois encourageantes quant au succès de cette technique (Ohgawara, 2000).

1.3.4.3. Capsules biologiques

Les capsules biologiques servent également d'immunoprotection. En fait, celles-ci sont fabriquées à partir du receveur. Le matériel utilisé est donc autologue ce qui a comme avantage, théoriquement, de réduire les possibilités de rejet. Des réussites dans ce domaine ont été réalisées notamment une xénogreffe d'îlots de rats, entourés de cartilage fabriqué à partir de chondrocytes, dans une souris *nude* (Pollok, 1997). Le collagène pourrait également être un support très intéressant comme matrice de soutien. Les recherches et les développements dans ce domaine sont en cours (Valdes, 1998).

1.3.4.4. Microcapsules

Le concept de microencapsulation, c'est-à-dire l'immunoisolation des cellules dans des microsphères, a été introduit par Chang (Chang 1964 et 1966). Cette technique utilise l'extrusion de gouttelettes d'une solution contenant un polyélectrolyte faible, dans un bain contenant un polyélectrolyte de charge opposée (Lim, 1980; Colton, 1995). Ces gouttelettes forment ce que l'on appelle des billes qui peuvent ou non être recouvertes d'un autre matériau. Ces microcapsules peuvent être de taille variée selon le type d'extrusion. Les îlots peuvent être immunoisolés par la membrane de ces microcapsules (Chick, 1975_a).

1.4. Microencapsulation

La microencapsulation est une technologie qui offre une technique simple et sécuritaire pour l'implantation de cellules immunoisolées dans des sites variés du corps humain. Sun a été le premier à démontrer que la microencapsulation d'îlots de Langerhans permet de prolonger la vie de rongeurs diabétiques (traités à la STZ) (Lim, 1980; O'Shea, 1986), de rats BB (Fan, 1990) et de souris NOD (Lum, 1991). Avec cette technique, la xénogreffe a également été réussie (O'Shea, 1986; Fan, 1990; Lum, 1991). L'allogreffe chez des chiens immunosupprimés spontanément diabétiques a aussi réussi grâce à la microencapsulation (Soon-Shiong, 1992). La normalisation de la glycémie a même été effectuée par une allogreffe d'îlots microencapsulés chez un patient diabétique immunosupprimé (Soon-Shiong, 1994). Une greffe d'îlots encapsulés transplantés dans la cavité péritonéale a été effectuée chez des singes *cytomologus* spontanément diabétiques (Sun, 1996). Cette greffe a permis de normaliser la glycémie pour une durée d'environ 10 mois.

1.4.1. Avantages de la microencapsulation

Par rapport aux autres méthodes d'immunoisolation, la microencapsulation possède de nombreux avantages. Elle permet une meilleure diffusion de l'oxygène et des nutriments (Dionne, 1989) et par le fait même augmente la viabilité des îlots. On voit

avec cette méthode une amélioration de la réponse insulinique au glucose (Chicheportiche, 1988). La résistance des microcapsules est également un avantage comparativement aux chambres de diffusion par exemple. La taille des microcapsules est très importante. De petites microcapsules peuvent être produites à l'aide d'un générateur d'impulsions électrostatiques à haut voltage, ce qui permet d'avoir des microcapsules de diamètre plus petit que 350 μ m (Hallé, 1992_a et 1994). Les microcapsules en étant très petites permettent la réduction du volume total de l'implant ce qui permet d'avoir accès à de nouveaux sites de transplantation comme le foie (Leblond, 1999). La résistance et la biocompatibilité (Robitaille, 1999_b) sont également avantageées par la petite taille des microcapsules. La diffusion de l'oxygène, du glucose, de l'insuline et des nutriments est également améliorée.

1.4.2. Méthodes d'évaluation des microcapsules

Les microcapsules ont fait l'objet de nombreuses études durant les dernières années. La popularité de ce type d'immunoisolation démontre bien que cette méthode a énormément de potentiel pour remédier aux problèmes causés par le diabète. Toutefois, en dépit de toute la recherche qui se fait présentement sur la caractérisation des implants, la biocompatibilité de ceux-ci, la survie et la fonction des îlots encapsulés, nous n'en sommes pas encore à l'application clinique de la microencapsulation. Notre laboratoire a mis au point plusieurs techniques *in vivo* et *in vitro* dans le but d'étudier et de perfectionner les microcapsules. Ces techniques sont : 1) méthode d'identification et de quantification des paramètres du générateur d'impulsion électrostatiques à haut voltage, qui affectent la taille des microcapsules (Hallé, 1994); 2) méthode d'évaluation de la résistance mécanique (Leblond, 1996); 3) méthode d'évaluation de la biocompatibilité (Pariseau, 1995); 4) méthode d'évaluation de la perméabilité membranaire (Robitaille, 2000); 5) méthode semi-quantitative pour l'évaluation des cytokines dans la RHM (réaction de l'hôte contre les microcapsules) (Robitaille, 1999_a).

La microencapsulation d'îlots est une méthode d'immunoisolation qui pourrait éviter la prise d'immunosuppresseurs et prévenir les risques associés à l'utilisation de ces drogues à long terme. Elle a également un net avantage sur les autres méthodes puisqu'elle présente un grand potentiel pour que la réalisation de la xénotransplantation d'îlots devienne une réalité clinique (Kendall, 2001).

Les facteurs influençant la viabilité à long terme des îlots encapsulés incluent : la capacité de stimulation immunitaire de l'alginate, l'intégrité mécanique de la microcapsule, la stabilité chimique de la membrane d'alginate et la quantité de cellules qui adhèrent à la membrane externe de la capsule. Ces facteurs sont eux-même influencés par la modulation de la composition chimique, de la structure moléculaire des polymères formant la capsule d'alginate et de la cinétique du processus de gélification.

1.4.3. Fabrication

La fabrication de la microcapsule peut se faire avec différents composés par exemple, l'agarose (Iwata, 1989), le méthacrylate (Stevenson, 1988), le chitosan (McKnight, 1988) et l'alginate de barium (Zekorn, 1992) (Tableau II, page 31). De nombreux polymères synthétiques comme le Poly(hydroxyethylmet-acrylate-methyl methacrylate) (HEMA-MMA) sont utilisés pour encapsuler. On a aussi tenté de polymériser l'acrylamide ou l'agarose autour d'une micelle de cellules en suspension en utilisant l'irradiation par des rayons γ ou ultra violets (Chang, 1987, Hisano, 1998). Ces procédés synthétiques impliquent une exposition aux solvants organiques et aux irradiations prolongées qui provoquent l'apparition de monomères toxiques et peuvent générer une chaleur intense durant le processus d'encapsulation. Par conséquent, ces procédés peuvent provoquer une réaction indésirable du système immunitaire (Chandy, 1999). Pour ces raisons, la gélification par polyélectrolytes apparaît une technique d'encapsulation beaucoup plus compatible avec la vie.

Mais, la microcapsule d'alginate-poly-L-lysine-alginate a certes été l'une des plus étudiées. L'alginate est un polysaccharide linéaire (Figure 6, page 32) composé de régions homopolymériques d'acides mannuroniques (M) et d'acides guluroniques (G) (Figure 7, page 32) dans lesquelles s'intercalent des régions de séquences mixtes. L'alginate peut être gélifiée avec plusieurs molécules chargées positivement, tels des polyaminoacides ou cations multivalents (Ca^{++} , Mg^{++} , Ba^{++}). Il a été rapporté que la gélification avec le calcium est réversible dans des conditions physiologiques. C'est

Tableau II. Composants majeurs proposés pour la microencapsulation d'îlots de Langerhans*.

Composant majeur de la capsule	Source	Proposé initialement par
Alginate	Algue	Lim et Sun 1980
Chitosan	Algue	Zielinski 1994
Agarose	Algue	Iwata et al. 1989
Poly(hydroxyethylmet-acrylate-methyl methacrylate) (HEMA-MMA)	Synthétique	Dawson et al. 1987
Copolymères d'acrylonitrile (AN69)	Synthétique	Kessler et al. 1991
Polyéthylenglycol (PEG)	Synthétique	Cruise et al. 1999

* Données tirées de Considerations for successful transplantation of encapsulated pancreatic islets (De Vos 2002).

pourquoi plusieurs groupes utilisent un polyaminoacide supplémentaire afin de former un complexe irréversible qui forme la membrane de la microcapsule. Pour contrer la réversibilité du calcium, certains groupes ont utilisé le baryum pour gélifier l'alginate, démontrant que la matrice alginate-baryum était irréversible (Grohn, 1994). D'autres auteurs ont cependant affirmé que l'alginate de calcium (haute teneur en acides mannuroniques ou en acides guluroniques) était stable lorsque la concentration de calcium se situe entre 0,05 mol/L et 0,001 mol/L. La concentration de calcium dans le plasma sanguin humain est de 0,001 mol/L à 0,0026 mol/L. Ceci indique que l'alginate de calcium peut être stable *in vivo*.

L'extrusion de l'alginate pour former les billes d'alginate se fait à l'aide d'une aiguille. L'arrachement se fait par flot d'air continu ou par impulsions électrostatiques générées par un haut voltage électrique. Les billes tombent dans un bassin contenant l'électrolyte voulu et elles se gelifient. Par la suite plusieurs scénarios sont possibles. L'ajout d'une couche de PLL ou de d'autres composés comme le chitosan est ensuite réalisé (Figures 8 et 9 page 33). L'arrivée de nouveaux biomatériaux et l'étude de composants (ancien et nouveau) impliqués dans la fabrication a permis de nouvelles combinaisons pour la

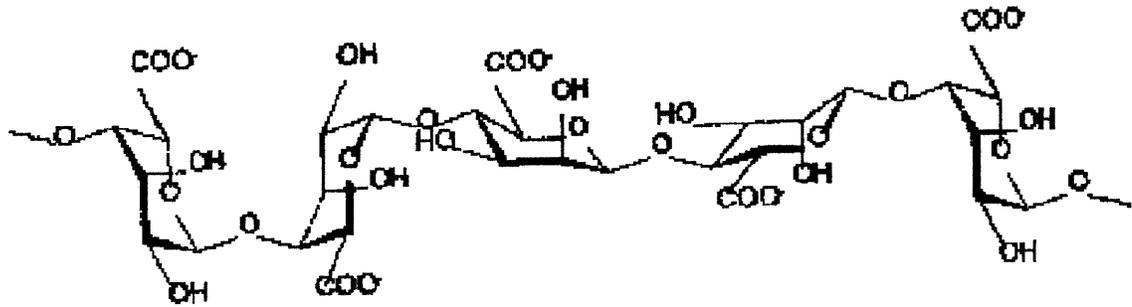


Figure 6. Schéma moléculaire de l'alginate

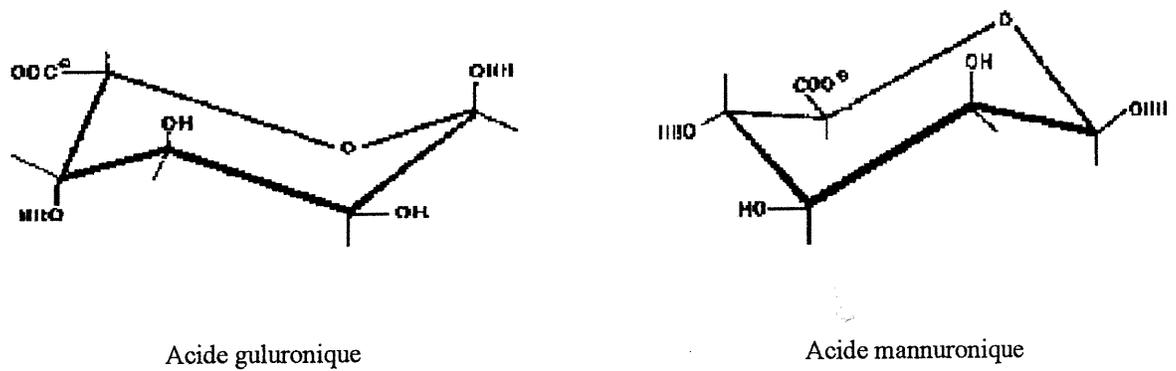


Figure 7. Schéma moléculaire de l'acide guluronique et de l'acide mannuronique formant l'alginate

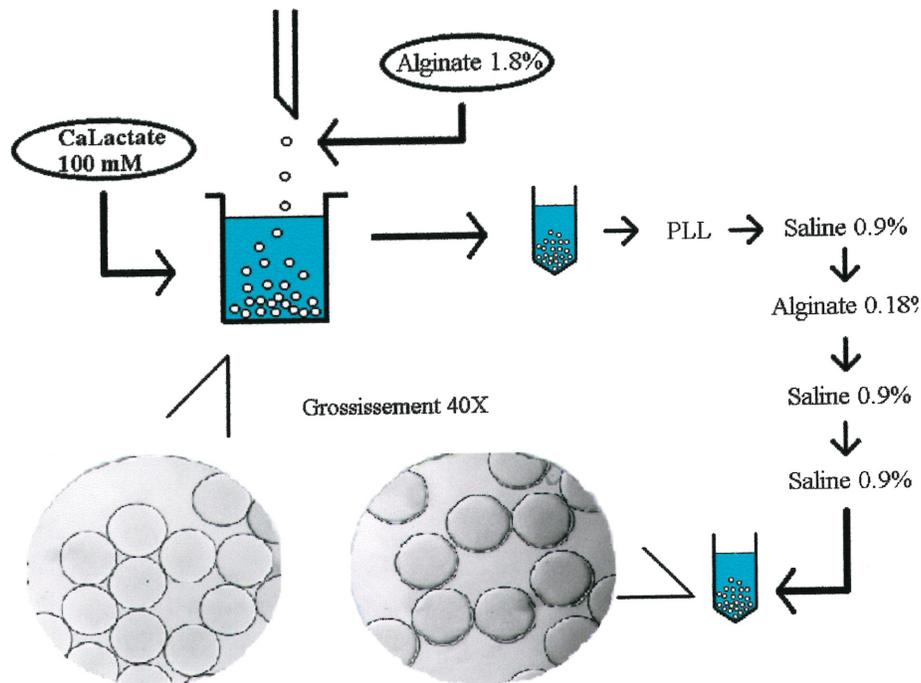


Figure 8. Fabrication de microcapsules d'alginate-PLL-alginate selon Robitaille (1999).

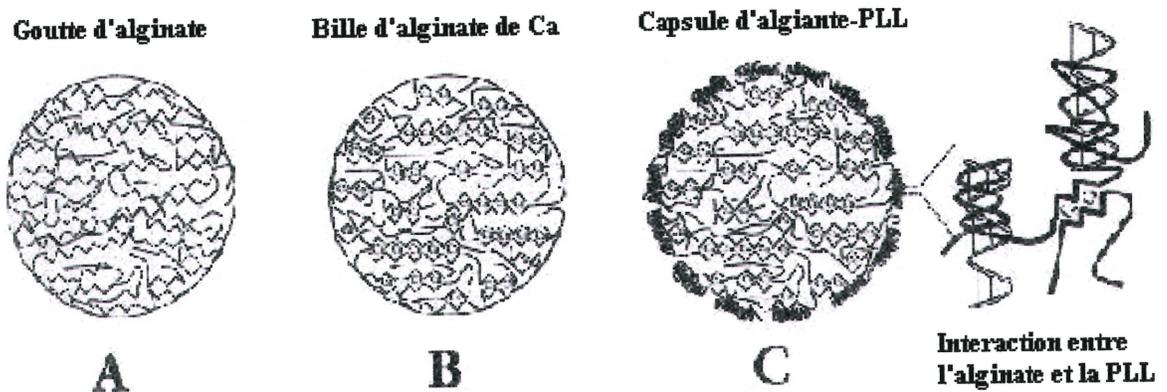


Figure 9. Représentation de la formation d'une microcapsule. A) une gouttelette d'alginate est formée, B) celle-ci se gélifie au contact d'une solution de calcium, C) la bille d'alginate de calcium est finalement recouverte d'une couche de PLL. Cette capsule d'alginate-PLL peut alors être recouverte d'une seconde couche d'alginate ou d'un autre biomatériau.

réalisation de microcapsules. Donc, il y a de nombreuses études sur plusieurs types de microencapsulations qui sont encore en cours.

1.4.4. Transplantation d'îlots de Langerhans microencapsulés

Plusieurs facteurs peuvent expliquer la réussite ou l'échec d'une transplantation d'îlots microencapsulés. Le type de microcapsules utilisé, le biomatériau utilisé, la résistance de la microcapsule et la biocompatibilité des capsules sont des éléments importants. Un des problèmes majeurs est, en somme, la biocompatibilité de l'implant. Plusieurs laboratoires ont observé, *in vivo*, une réaction péri capsulaire ou une RHM (Lum, 1991 et 1992; Ricker, 1986). Il y a une corrélation directe, mais inverse entre la RHM et la durée de survie des îlots xéno greffés chez la souris NOD (Ricker, 1986; Darquy, 1990; Weber, 1994_a), BALB/c traitées au STZ et C57BL/6J (Darquy, 1990). Cette corrélation est également observée pour des transplantations allogéniques d'îlots encapsulés chez le rat BB/W (Mazaheri, 1991), les rats AO/G traités au STZ (Fritschy, 1991; Horcher, 1994) et les rats Lewis (Horcher, 1994). La cause de la RHM est discutable et controversée. Certains croient que la réaction vient directement de la composition de la capsule en s'appuyant sur le fait que l'implantation de capsules vides ou contenant des îlots ne fait pas de différence sur la réaction obtenue (Pollok, 1997; Fritschy, 1994). Pour d'autres, la réponse contre le greffon vient du fait que leurs capsules vides ont moins de réaction que celles possédant des îlots (Weber, 1990 et 1994_a; Wijnsman, 1992; Kessler, 1996).

Les cellules impliquées dans la RHM peuvent relâcher des substances toxiques, comme les cytokines (Soon-Shiong, 1991; Weber, 1994_b; Mazaheri, 1991; Pollok, 1997; Cole, 1992; Kessler, 1996; Kulseng, 1997), l'oxyde nitrique (Mazaheri, 1991; Pollok, 1997; Cole, 1992) qui ont pour effet de diminuer la fonction et/ou la survie du greffon. Le transplant n'étant pas revascularisé comme dans son état « normal », les nutriments, l'oxygène et les déchets doivent passer la membrane semi-perméable par diffusion. On peut poser l'hypothèse que les cellules péri capsulaires et l'absence de matrice extracellulaire n'aident sûrement pas à la réussite de la transplantation.

1.4.5. Alginate et purification

Pour améliorer la biocompatibilité, la composition de la microcapsule doit se faire à l'aide de matériau hautement purifié afin de stimuler le moins possible le système immunitaire. L'alginate est un produit dérivé des algues brunes (*Phaeophyceae*). Elle est composée principalement d'acide mannuronique et guluronique. L'alginate est utilisée pour ses qualités gélifiantes. Les propriétés finales des capsules faites avec l'alginate dépendent de la proportion des deux acides présents dans celle-ci. Avec une proportion plus forte en acide guluronique, comme l'alginate « High G » (haute teneur = 73% en acide guluronique), on remarque une solidité accrue comparativement à l'alginate « High M » (haute teneur = 60% en acide mannuronique). Cette augmentation de la résistance vient du fait que les acides guluroniques permettent une conformation qui favorise un haut degré de liaison. La liaison entre les chaînes d'acide mannuronique est plus relâchée ce qui diminue sa résistance (Clayton, 1991). La meilleure proportion de G/M constitue une question qui est encore débattue aujourd'hui. Certains prônent la High G (De Vos, 1997), tandis que d'autres ne prêchent que par la pureté de l'alginate (Klöck, 1997). On purifie l'alginate pour essayer d'enlever tous les contaminants potentiels (endotoxines, polyphénols etc.) qui pourraient nuire à la biocompatibilité de la microcapsule autant avec l'hôte qu'avec le transplant (îlots de Langerhans). La poly-L-lysine (PLL), un polyamino acide, est utilisée pour recouvrir l'alginate gélifié (bille) pour ainsi obtenir un treillis moléculaire plus serré. La PLL est ensuite à son tour recouverte d'une autre couche d'alginate afin d'améliorer la biocompatibilité de la capsule. L'alginate riche en acide mannuronique semble se lier plus solidement aux molécules de PLL que ne le fait l'alginate riche en acide guluronique. L'alginate riche en acide guluronique forme un gel ayant des liens plus solides en présence de calcium, mais l'alginate riche en acide M ou l'alginate ayant autant d'acide M que G, forme un gel plus faible, mais plus élastique (Dupuy, 1994).

Malgré la purification et la standardisation des préparations d'alginate, la transplantation d'îlots de Langerhans microencapsulés n'est pas encore parfaite. Il y a encore place à l'amélioration, puisque la normalisation de la glycémie à long terme chez le gros animal n'a pas encore été réalisée (Mullen, 2000). De nouvelles techniques d'encapsulation font l'objet d'études présentement et l'espoir est toujours présent concernant la réussite de ce type de transplantation.

1.5. Observations

1.5.1. Insuccès

Les causes de l'insuccès de la transplantation d'îlots microencapsulés ne sont pas très bien définies. Plusieurs hypothèses ont toutefois été avancées. Les microcapsules auraient des membranes semi-perméables bioincompatibles et la résistance des microcapsules ne serait pas durable. Il semble toutefois que la biocompatibilité soit au cœur du problème. La RHM tel que mentionné auparavant, jouerait un rôle puisque la réaction périphérique autour des microcapsules bloquerait l'apport nutritif essentiel à la survie du greffon. On ignore toutefois si les imperfections du biomatériau constituant la capsule pourraient attirer les cellules immunitaires dès l'implantation ou si c'est l'attaque du biomatériau par les cellules qui cause la destruction des capsules. Le site d'implantation et le volume total de l'implant ont également des rôles à jouer dans la réussite de la transplantation.

1.5.2. Résistance

La résistance de la capsule est un paramètre important pour le succès de la transplantation. Une membrane solide peut assurer une survie *in vivo* plus longue du transplant. De plus, les capsules brisées (Cole, 1992; Fritschy, 1994; Van Schilfgaade, 1996), celles ayant une couche de PLL recouverte de façon partielle (Fritschy, 1994; Van Schilfgaade, 1996) et les capsules non sphériques et non lisses (Lum, 1991; Fritschy, 1994; Colton, 1991; Lanza, 1992c), suscitent plus de réaction péricapsulaires. *In vivo*, et plus précisément dans la cavité péritonéale, les microcapsules sont exposées à une combinaison de forces déstabilisantes incluant la pression exercée, la dissociation du complexe alginate-polycation, en plus des forces de cisaillements, d'abrasion, de compression et d'écrasement. La résistance mécanique des microcapsules d'alginate-poly-L-lysine peut être améliorée par l'augmentation de la concentration de PLL (Thu, 1996_a et 1996_b), l'augmentation du temps d'incubation dans la PLL (Thu, 1996 et 1996) et/ou avec l'utilisation de l'alginate High G (Thu, 1996 et 1996; Leblond, 1996). La stabilité à long terme de la microcapsule peut être améliorée par l'augmentation de

l'attraction polyanion-polycation au niveau de la membrane ou par diminution du gonflement lors de la fabrication de la capsule. Le but de l'étude de la résistance est de déterminer une microcapsule d'alginate qui aura une stabilité durable *in vivo*.

1.5.2.1. Techniques

On a observé que les capsules plus solides pouvaient prolonger la survie du transplant. De plus, les capsules inadéquates ou brisées induiraient une réaction de fibrose rapide. L'évaluation de la résistance des microcapsules s'est d'abord faite à l'aide de pinces (King, 1987). D'autres groupes ont évalué les capsules selon un index de résistance calculé à l'aide de l'épaisseur de la membrane (Ma, 1994). Ces méthodes imprécises et fastidieuses ne pouvaient être utilisées pour comparer différents types de microcapsules. Une méthode simple et fiable a été développée dans notre laboratoire pour évaluer la résistance des microcapsules (Leblond, 1996). Cette méthode permet de discriminer une seule capsule brisée sur mille. En bref, elle consiste à soumettre les capsules (contenant un marqueur fluorescent de grande taille) à une période intensive de culbutage en présence de billes de verre. Le pourcentage de bris est ensuite calculé par la mesure de la quantité de marqueur retrouvé dans le surnageant par rapport à celui dans la fraction sédimentable (Figure 10, page 38). L'évaluation de la stabilité mécanique peut également être faite par une technique dérivée utilisée par Lee *et al.* (Lee, 1997). Elle consiste à mettre un nombre déterminé de capsules dans 100 mL d'une solution 0,9% NaCl et de faire agiter à 150 rpm à 37°C. Le nombre de capsules brisées est ensuite compté. Cette technique, même si elle s'avère efficace est beaucoup plus longue et fastidieuse que celle élaborée dans notre laboratoire.

D'autres tests ont récemment vu le jour. Un de ceux-ci se base sur la déformation de la microcapsule par une force de compression (Rehor, 2001). Il tient compte de la taille de la microcapsule, de l'épaisseur membranaire et de la vitesse de compression. Voici une brève description de celui-ci : les capsules sont fabriquées et conservées dans une solution saline de 0,9% à 20-25°C et leurs propriétés mécaniques sont analysées un jour après leur préparation par un analyseur de texture (TA-2xi, Stable Micro Systems, Godalming, UK). Les capsules sont placées sur une lame microscopique. La sonde de 3

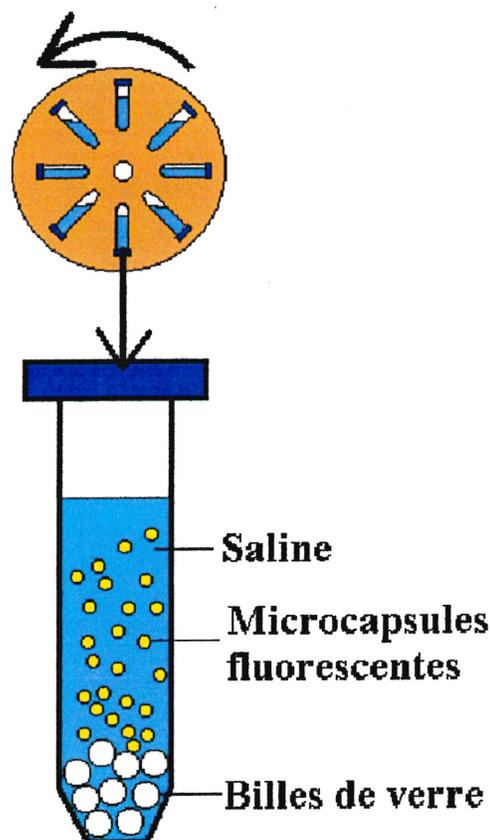


Figure 10. Représentation schématique du test de résistance mécanique. Les microcapsules servant à ce test sont fabriquées préalablement avec de l'alginate contenant 0.2% de dextran-FITC 2×10^6 Da. 1000 microcapsules fluorescentes sont mélangées à 225 billes de verre de 3mm dans un tube conique de polystyrène 15 mL. Ceux-ci sont agités par culbutage continu pendant 72 heures sur un agitateur rotatif à 35 rpm. Le pourcentage de capsules brisées est évalué. Le ratio de la fluorescence du surnageant (capsules brisées) sur le total de fluorescence (culot + surnageant), multiplié par cent nous donne le pourcentage de bris des microcapsules (Leblond et *al.* 1996).

mm de diamètre a une surface plane. Elle est positionnée à une distance de la lame correspondante au diamètre initial de la capsule. La sonde comprime la capsule à une vitesse constante. L'analyse des résultats se fait par la suite à l'aide d'ordinateur. Par ce test la rigidité et l'élasticité de la membrane peuvent être évaluées. Toutefois, ce genre de test implique un appareillage sophistiqué et coûteux. Il a également l'inconvénient qu'il n'évalue que quelques microcapsules.

Un autre nouveau test, moins élaboré, a été mis au point par Raamsdonk et Chang (Van Raamsdonk, 2001). Il consiste seulement à déterminer le pourcentage de capsules intactes après incubation dans une série de solutions hypotoniques. Cette méthode peut être faite sur plusieurs échantillons à la fois, elle est facile à réaliser, ne requiert aucun équipement spécial et les résultats sont obtenus dans un délai raisonnable. Ce test est appelé : test de pression osmotique (Van Raamsdonk, 2001). Cette technique donne des résultats objectifs et quantitatifs et semble être assez sensible.

1.5.3. Perméabilité

La survie du transplant est grandement reliée à la membrane de la capsule. Cette membrane protège les îlots, mais doit aussi permettre la diffusion des nutriments et de l'oxygène puisque ceux-ci ne sont pas revascularisés. La perméabilité du dispositif d'immunoisolation doit être équilibrée entre deux principes antagonistes: d'une part les îlots enfermés à l'intérieur de la microcapsule doivent recevoir les substances biologiques nécessaires pour survivre et pour leur fonctionnement normal; et d'autre part, les attaques du système immunitaire de l'hôte doivent être contrées en les excluant de la microcapsule (Figure 11, page 40).

La survie de l'îlot dépend de nombreuses molécules de petit poids moléculaire comme les acides aminés, le glucose, les électrolytes, les vitamines et l'oxygène, mais également les substances de poids moléculaires variés comme les facteurs et les protéines de croissance tels que la transferrine, l'IGF-I (Insuline Growth Factor I), la prolactine, les hormones de croissance, l'insuline, le glucagon, l'albumine etc. (Clayton, 1996).

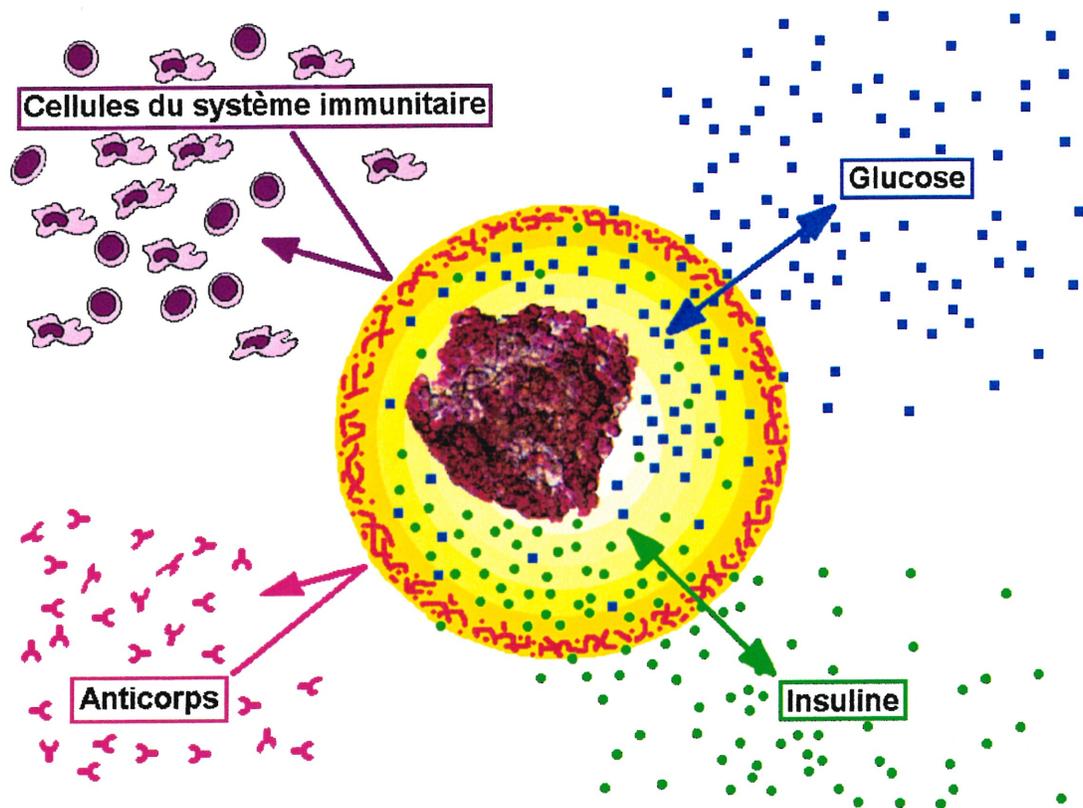


Figure 11. Schéma d'un îlot de Langerhans microencapsulé. Le but de la microencapsulation est d'empêcher les cellules du système immunitaire et les anticorps d'entrer en contact avec l'îlot tout en laissant libre passage à l'entrée de glucose et à la sortie de l'insuline.

Quant aux cellules immunitaires, elles sont facilement bannies des microcapsules de par leur grande taille (Hallé, 1993). Mais les produits solubles du système immunitaire comme les cytokines (Soon-Shiong, 1991; Weber, 1994_b; Mazaheri, 1991; Pollok, 1997; Cole, 1992; Kessler, 1996; Kulseng, 1997) et l'oxyde nitrique (Mazaheri, 1991; Pollok, 1997; Cole, 1992) peuvent être toxique pour les îlots encapsulés.

De ce fait, l'optimisation de la perméabilité est des plus importantes pour tous les dispositifs d'immunoisolation. À ce jour, la perméabilité membranaire idéale n'est toutefois pas connue. Cette ignorance provient du manque de connaissances sur les molécules importantes qui doivent pénétrer dans la capsule et celles qui doivent être obligatoirement exclues.

1.5.3.1. Techniques

La membrane sert à empêcher le passage des cellules immunitaires et des molécules qu'elles sécrètent. Plusieurs groupes utilisent des protéines de différents poids moléculaire afin de déterminer la perméabilité des microcapsules (Chandy, 1999; Brissova, 1998). L'IgG, l'albumine sérique bovine, la myoglobuline et le cytochrome C sont souvent employés dans les tests de perméabilité. Ces protéines sont présentes dans le milieu où les capsules sont incubées. Les capsules sont ensuite agitées et un prélèvement du milieu est fait à intervalles réguliers. La protéine est ensuite dosée afin d'observer s'il y a diminution de la concentration dans le surnageant. Si oui, cela implique que la protéine pénètre dans la capsule. Des techniques similaires sont également effectuées en subtilisant la protéine par une protéine couplée à un marqueur fluorescent (Vandenbossche, 1991) ou à la radioactivité (Kulseng, 1997).

Un autre test se basant sur l'entrée de molécules dans la capsule provoque ainsi une diminution dans le milieu qui a été élaboré (Powers, 1997). Celui-ci se distingue des autres. Il consiste à encapsuler des molécules de PAS (protein A sepharose) préalablement incubées avec des anticorps spécifiques à la protéine que l'on désire étudier. Une fois formées, les capsules contenant les molécules de PAS sont incubées

dans un milieu renfermant la protéine étudiée. La protéine est couplée préalablement à un marqueur fluorescent ou radioactif. Les capsules sont ensuite lavées et analysées.

Dans notre laboratoire, cinq méthodes ont été utilisées pour évaluer la porosité des capsules : 1) une technique d'immunofluorescence indirecte a été développée et a démontré que la capsule est imperméable aux anticorps IgG (immunoglobuline G = 146 000 Da) (Hallé 1993); 2) une méthode basée sur la relâche de l'arginine estérase (33 000 Da) les cellules prostatiques encapsulées qui a démontré que les capsules de 300µm étaient imperméables à ce produit (Hallé, 1992_a et 1992_b); 3) une autre méthode consistait à mesurer la sortie de l'hémoglobine après lyse des globules rouges encapsulés (Hallé, 1988); 4) la diminution de dextran-FITC, de différents poids moléculaires, d'une solution contenant les capsules (Woodworth, 1992; Schiffrin, 1982); et finalement une méthode que l'on a appelé la chromatographie par exclusion de taille inversée. Elle consiste à évaluer la perméabilité des microcapsules, qui forment la matrice de la colonne, à l'aide de substances dont on connaît déjà le poids moléculaire (Figure 13, p.) (Robitaille, 2000). Cette méthode permet de déterminer la perméabilité membranaire ou le seuil de perméabilité à l'aide d'hydrates de carbone (dextran), de protéines et de molécules spécifiques. Elle permet également de distinguer l'adsorption (l'adhérence) de l'absorption (perméabilité). D'autres groupes emploient ce test afin de déterminer la perméabilité des microcapsules (Powers, 1997; Brissova, 1996 et 1998).

1.6. Questions de recherche

La microencapsulation d'îlots de Langerhans est un mode de traitement intéressant et surtout prometteur pour rétablir une glycémie normale chez les diabétiques. Cependant, il reste beaucoup de travail pour que cette méthode soit applicable cliniquement. Différentes méthodes ont été élaborées pour évaluer les caractéristiques des microcapsules comme la résistance, la perméabilité et la biocompatibilité avec le transplant et avec l'hôte. À l'aide de ces méthodes, des questions fondamentales peuvent être adressées.

Une question très simple et de base, qui n'a jamais été posée, est la suivante : Quel est le meilleur seuil de perméabilité membranaire? Il est possible que pour l'immunoprotection le plus petit seuil de perméabilité soit le meilleur; et pour le besoin

nutritif et l'élimination des déchets métaboliques, le plus grand soit le meilleur. Dans l'allogreffe, la prévention du contact avec les cellules immunitaires semble être la seule exigence pour prévenir le rejet du transplant. Il a été démontré que des îlots emprisonnés dans des billes d'alginate de baryum non recouvertes peuvent survivre chez des animaux diabétiques (Zekorn, 1992; Siebers, 1992).

Néanmoins, une meilleure immunoprotection implique peut-être la prévention de l'entrée des anticorps comme les IgG (146 000 Da). L'avantage de prévenir la pénétration des cytokines (15 000 à 30 000 Da) n'est pas vraiment établi puisque plusieurs publications dénotent le succès avec des transplantations utilisant des microcapsules ayant une porosité plus grande que 50 000 Da (Zekorn, 1990_b; Cole, 1992; Tai, 1995). D'autre part, quelle est la perméabilité minimale pour assurer une nutrition adéquate et ainsi sauvegarder la fonction des îlots. Des résultats ont démontré que le glucose et l'insuline diffusent librement (Robitaille, 2000). Mais qu'arrive-t-il si les molécules de taille plus importante, comme la transferrine, qui semble être requises pour la survie à long terme ne pénètrent pas?

1.6.1. Importance du projet

La microencapsulation d'îlots de Langerhans est un traitement prometteur pour améliorer la qualité de vie des diabétiques. Son avantage majeur est l'absence d'immunosuppresseurs et surtout des complications reliées à ce type de drogue. Elle empêchera également les complications secondaires causées par le diabète. Notre laboratoire contribue à l'avancement de la mise au point de ce traitement dans le but de guérir un jour une maladie de plus en plus grave. La compréhension des mécanismes régissant le rejet, l'amélioration de la biocompatibilité et la caractérisation de la microcapsule sont tous des critères importants pour la réussite du projet de la microencapsulation. En déterminant l'effet du seuil de perméabilité membranaire sur la survie et la fonction des îlots microencapsulés, nous pourrions par la suite modéliser une capsule améliorée qui, peut-être, aura plus de chance de normaliser la glycémie d'un patient atteint de diabète de type I.

1.7 Hypothèse de travail

L'hypothèse de travail est que la perméabilité membranaire des microcapsules joue un rôle dans la survie et la fonction des îlots microencapsulés puisque si le seuil de perméabilité membranaire est trop petit, d'importants nutriments ne seront plus accessibles aux îlots encapsulés. Par contre, si le seuil de perméabilité est trop grand, l'entrée de substances nocives sécrétées par les cellules du système immunitaire sera peut être nuisible.

1.8 Objectifs

Objectif général : Évaluer l'effet de la perméabilité membranaire sur la survie et la fonction des îlots de Langerhans microencapsulés.

Objectifs spécifiques :

1.8.1. Développer des microcapsules ayant une résistance mécanique adéquate avec trois seuils de perméabilité membranaire différents soit : petit 15-30 kDa ; moyen 40-60 kDa ; grand 85-100 kDa.

1.8.2. Évaluer la perméabilité des trois types de microcapsules développées en 1.8.1., ayant une résistance satisfaisante, à l'aide de différents marqueurs.

1.8.3. Étudier *in vitro* l'effet de ces seuils de perméabilité sur la survie et la fonction d'îlots microencapsulés.

1.8.4. Étudier *in vivo* l'effet de ces seuils de perméabilité sur la survie et la fonction des îlots microencapsulés ainsi que la biocompatibilité.

2. Matériel et méthode

2.1. Alginate et Poly-L-Lysine

Dans cette étude, deux types d'alginate sont utilisés. L'alginate de sodium Keltone LV est obtenue de Monsanto (San Diego, Californie). Celle-ci est considérée comme une alginate « High M » puisqu'elle possède un pourcentage plus élevé en acide mannuronique (60%) qu'en acide guluronique (40%). L'alginate de sodium « High G » (Pronova LVG) est obtenue de Pronova (Oflo, Norvège). Celle-ci a un pourcentage plus élevé en acide guluronique (73%) qu'en acide mannuronique (27%). La poly-L-lysine (PLL) de 29.3 kDa vient de chez Sigma Chemical Co. (St-Louis, MO).

2.1.1. Purification d'alginate selon une modification du protocole de Klöck

La purification de l'alginate est faite selon la méthode de Klöck (Klöck, 1994). Certaines modifications ont toutefois été apportées à la méthode : 1) l'ajout au départ (avant le traitement au charbon) de trois extractions au chloroforme pour enlever les lipides et les LPS (via des interactions hydrophobiques) sur l'alginate solide; 2) l'introduction d'une incubation supplémentaire avec le charbon activé pour éliminer les petits peptides, les LPS (hydrophobe). Les autres étapes de la purification sont conformes à la méthode de Klöck.

2.1.2. Fabrication des billes et des microcapsules

Les billes d'alginate sont produites par extrusion d'une solution d'alginate 1.8% dans une solution de calcium lactate 100 mM ou de chlorure de baryum 10mM. Des gouttelettes sont produites à l'aide d'un générateur d'impulsions électrostatiques permettant la réalisation de billes d'alginate d'environ 250µm. Les billes obtenues sont ensuite directement mises en culture. Les microcapsules, quant à elles, sont ensuite conçues selon la méthode de Sun *et al* (Sun, 1985). Brièvement, les billes d'alginate obtenues grâce au générateur électrostatique sont ensuite incubées dans une solution (de concentration prédéterminée) de poly-L-lysine (PLL) (M.W. 29.3 kDa), puis lavées

dans une solution saline d'HBSS sans Mg^{2+} et Ca^{2+} . Elles sont subséquentement incubées dans une solution d'alginate diluée (0.18%). Les microcapsules obtenues possèdent un diamètre d'environ 350 μm (Figure 12, page 47). Selon la concentration de PLL utilisée, les capsules ont un taux de gonflement variable. La PLL est diluée dans la saline et lors de l'incubation des billes de calcium dans cette solution, le calcium est remplacé par les ions sodium contenus dans la saline en plus des liaisons avec la PLL. Ce phénomène provoque un relâchement des liens ce qui a pour conséquence de produire un gonflement de la capsule. Le lien entre l'alginate et la PLL n'est maintenue que par des interactions électrostatiques.

2.2. Test de résistance mécanique

Les microcapsules servant à ce test sont fabriquées préalablement avec de l'alginate contenant 0.2% de dextran-FITC 2×10^6 Da (fluorescein isothiocyanate-dextran). Un volume équivalent (calculé selon la concentration) à 1000 microcapsules fluorescentes est mélangé à 225 billes de verre de 3mm dans un tube conique de polystyrène 15 mL. Ceux-ci sont agités par culbutage continu pendant 72 heures sur un agitateur rotatif à 35 rpm. Le pourcentage de capsules brisées est évalué par la technique suivante : les échantillons sont décantés avec un tamis de 60 μm pour séparer la fluorescence contenue dans le surnageant (capsules brisées) de celle contenue dans le culot (capsules intactes). Les microcapsules du culot sont dissoutes avec un tampon glycine à pH ~ 12 pour permettre la libération de la fluorescence. La fluorescence du surnageant et du culot des échantillons est lue par spectrofluorimétrie (excitation à $\lambda = 490$ nm ; émission $\lambda = 520$ nm). Le ratio de la fluorescence du surnageant (capsules brisées) sur le total de fluorescence (culot + surnageant), multiplié par cent nous donne le pourcentage de bris des microcapsules (Leblond, 1996).

2.3.1. Préparation des colonnes chromatographiques

Les microcapsules (7mL) sont suspendues dans une solution saline à température de la pièce. Elles sont ensuite déposées dans une colonne (15/0.7 cm) chromatographique (Biorad, #737-0716). Les capsules sont tassées en faisant circuler la saline à un débit de 320 $\mu L/min$ à température de la pièce pendant 2 heures. Lorsque la colonne est tassée,

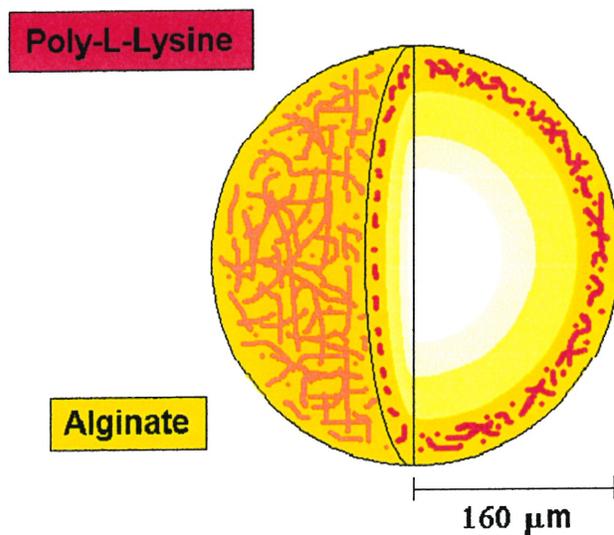


Figure 12. Représentation schématique d'une capsule d'alginate-PLL-alginate. Le corps de la capsule est formé d'alginate. L'interaction entre l'alginate et la PLL se fait sur la bille d'alginate préalablement formée à l'aide d'un cation divalent. La couche de PLL, représentée en rouge, est à son tour recouverte d'une seconde couche d'alginate.

l'excédent des microcapsules est enlevé et la colonne est ajustée pour avoir un volume final d'environ 5 mL. On fait passer la saline dans la colonne pour un autre 2 heures à un débit de 250 μ L/min pour stabiliser les microcapsules avant de débiter les expériences (Figure 13, page 49).

2.3.2. Évaluation de la perméabilité à l'aide de la chromatographie par exclusion de taille inversée

Tout d'abord, la colonne est standardisée à l'aide de marqueurs de perméabilité. Ceux-ci sont, d'une part le dextran-FITC (fluorescein isothiocyanate-dextran) 2 x 10⁶ Da (Sigma, St-Louis) qui est utilisé pour déterminer le volume mort (V_0) de la colonne. D'autre part, le glucose sert à déterminer la diffusion libre des molécules ou le volume total de la colonne (V_t). Les profils obtenus grâce à ces deux standards servent de références pour la colonne. Chaque profil d'élution de marqueurs de poids moléculaire connu est ensuite comparé avec les profils des deux marqueurs de références ce qui nous permet de calculer le coefficient de partition chromatographique (K_{sec}) :

$$K_{sec} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

où le V_e est le volume de rétention de l'échantillon (marqueur), V_0 le volume mort de la colonne et V_t est le volume de perméabilité total (Figure 14, page, 49). Les poids moléculaires des hydrates de carbones et des protéines marquées qui seront utilisés pour caractériser la colonne sont de 4 400 Da à 2 x10⁶ Da pour les dextrans et de 180.2 Da à 140 000 Da pour les protéines. Les hydrates de carbones utilisés sont déjà couplés à un fluorochrome, la FITC. Les protéines, quant à elles, sont préalablement marquées à l'aide d'un kit de marquage fluorescent (FITC) (Fluorescein Labeling Kit, No1386 093, Boehringer Mannheim Biochemica). La chromatographie par exclusion de taille inversée est réalisée en appliquant un petit volume (25 μ L) du marqueur connu (1mg/mL dans la saline 0.9%) sur le dessus de la colonne de microcapsules. La solution d'élution de la colonne est la saline. Les molécules suffisamment petites pour pénétrer à l'intérieur de la matrice sont retenues et migrent plus lentement dans la colonne, tandis que les plus grosses sont éluées plus rapidement. Le débit de la colonne est mesuré ainsi

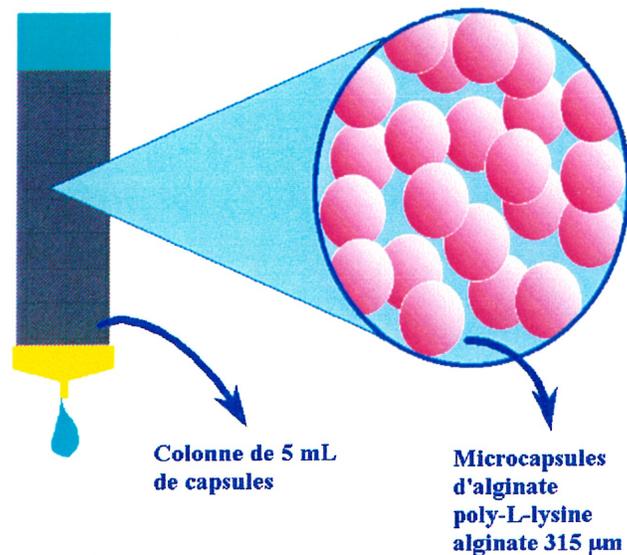


Figure 13. Représentation de la méthode de chromatographie par exclusion de taille inversée. Les microcapsules d'alginate sont placées à l'intérieur d'une colonne chromatographique. Les marqueurs sont ensuite appliqués sur la colonne et élués avec une solution saline. Leur profil d'éluion est ensuite analysé.

- V_0 = volume mort
- V_t = volume total
- V_e = volume échantillon

$$k_{sec} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

k_{sec} représente le coefficient de distribution du soluté

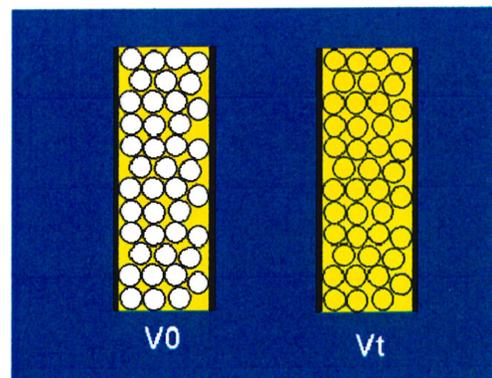


Figure 14. Schéma représentatif de la chromatographie par exclusion de taille inversée : calcul du k_{sec} . Le calcul du k_{sec} se fait à l'aide du V_0 (volume mort de la colonne) et du V_t (volume total) défini respectivement par le dextran-FITC deux millions et le glucose. Le volume de l'échantillon (V_e) moins le volume mort divisé par la différence entre le volume total et le volume mort nous donne le k_{sec} . Un k_{sec} égal à 0 indique que le marqueur utilisé ne pénètre pas à l'intérieur des microcapsules. Un k_{sec} égal à 1 indique que le marqueur utilisé diffuse librement à l'intérieur des microcapsules.

que le temps d'élution de chaque marqueur (Figure 15, page 51). Les marqueurs fluorescents sont récupérés au bas de la colonne et lus à l'aide d'un spectrofluorimètre LS-5 (excitation à $\lambda = 490$ nm ; émission $\lambda = 520$ nm). Le glucose (non couplé à la fluorescéine), pour sa part, est analysé à l'aide d'un glucomètre (YSI). Après chaque passage de marqueur, la colonne est lavée avec une solution saline.

2.4. Isolation et encapsulation des îlots de Langerhans

Les îlots de rats Wistar (250-300 g) (Charles River Canada inc. St. Constant, Québec, Canada) sont isolés par digestion à la collagénase (Lacy, 1967), séparés à l'aide d'un gradient de Ficoll et triés par sélection manuelle sous stéréomicroscope. La pureté de la préparation d'îlots est estimée à environ 95-98%. Les îlots sont incubés toute la nuit à 24°C à 5% CO₂ pour permettre la dégradation du tissu acineux dans du milieu CMRL-1066 (Gibco) additionné de 10% de SVF (sérum de veau fœtal) ainsi que de 1% Penicilline-Streptomycine Glutamine (Gibco/BRL, Burlington, Ontario, Canada). Le lendemain, les îlots sont transférés dans des microtubes de 1.5 mL où ils sont lavés deux fois avec une solution d'HBSS (Hank's balanced salt solution) pour ensuite être encapsulés. La technique d'encapsulation utilisée dans cette étude est dérivée de la méthode de Sun (Sun, 1985). Les îlots une fois lavés dans le HBSS, sont incubés dans une solution d'alginate 1.8-2%. Cette suspension est extrudée dans une solution de calcium-lactate 100 mM ou de chlorure de baryum 10mM à l'aide d'un haut voltage (10 000 à 15 000 volts) produit par un générateur d'impulsions électrostatiques. Les billes ainsi obtenues ont un diamètre moyen d'environ 250 μ m. Les billes d'alginate non recouvertes de PLL sont immédiatement mises en culture et les microcapsules sont obtenues par la même procédure décrite à la section fabrication de billes et de microcapsules. Cette technique produit également des implants vides (sans îlots), ceux-ci sont éliminés par sélection manuelle sous microscope afin de garder seulement les billes et microcapsules contenant des îlots.

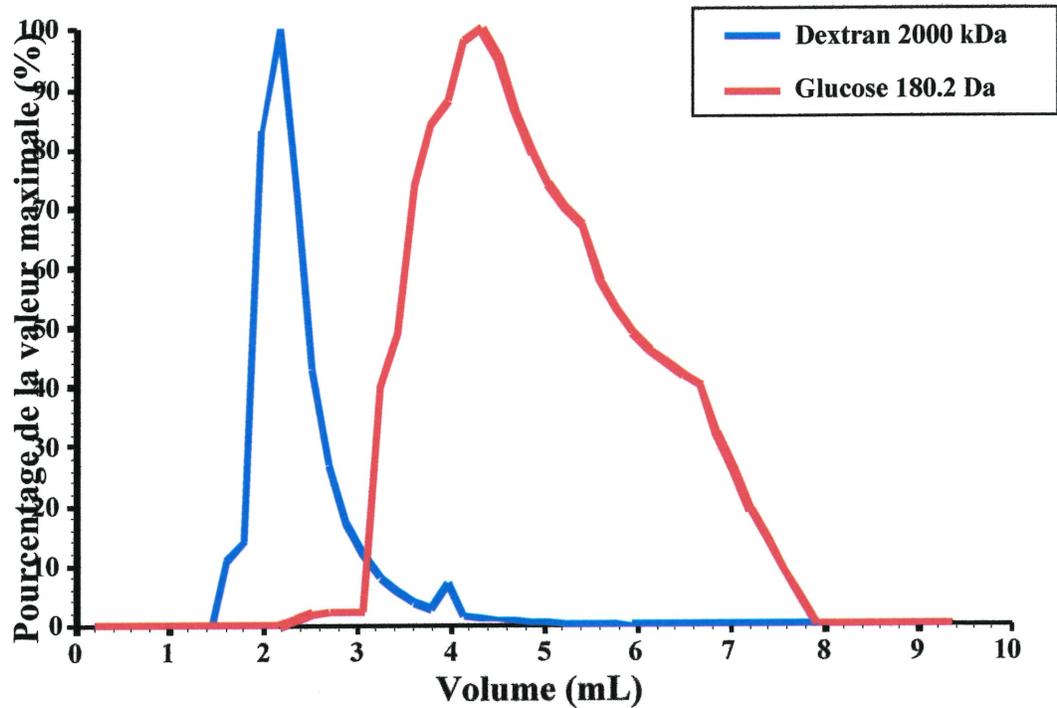


Figure 15. Profil d'éluion des standards chromatographiques pour une colonne typique : dextran-FITC 2 millions et glucose. L'éluion du dextran-FITC 2 millions se fait plus rapidement que le glucose parce que le dextran ne pénètre pas dans les microcapsules. Donc, le dextran s'écoule entre les microcapsules et arrive rapidement à la sortie de la colonne. Le glucose quant à lui pénètre à l'intérieur des microcapsules de ce fait, son passage dans la colonne sera retardé.

2.5. Évaluation des centres nécrosés

Les centres nécrosés des îlots sont observés à l'aide de microscopie optique (Figure 16, page 53). Le diamètre de chaque centre nécrosé est évalué ainsi que le diamètre de l'îlot à l'aide d'un objectif gradué. Le centre nécrosé se distingue par son apparence sombre et opaque comparativement au reste de l'îlot.

2.6. Étude de la viabilité par fluorescence

La viabilité des îlots microencapsulés (~ 150 îlots équivalents), autant dans les billes que dans les microcapsules, se réalise ainsi : les îlots sont sédimentés et lavés avec une solution de PBS 0.1 M (phosphate buffer saline). Ensuite, ils sont incubés dans une solution d'iodure de propidium (1mg/mL) et d'acridine orange (0.01mg/mL) pendant dix minutes à l'abri de la lumière. Les îlots sont par la suite lavés trois fois dans le PBS pour enlever le surplus de colorant dans le milieu et sédimentés de nouveau. Le culot est récupéré et placé sur une lame (fluorescent antibody slides). Les îlots sont observés par fluorescence et sont classés selon le nombre de cellules viables en 5 catégories (Figure 17, page 54) soit : vert (10 cellules ou moins de cellules mortes); vert-vert-rouge (plus de 50% de cellules viables); vert-rouge (autant de cellules mortes que de viables); rouge-rouge-vert (plus de 50% de cellules mortes); rouge (10 cellules ou moins de viables). L'index de viabilité peut également être fait afin de mieux comparer les îlots (Tableau III, page 55).

2.7. Transplantation

Des îlots de rats Wistar préalablement isolés et microencapsulés dans différents implants (billes d'alginate calcium-lactate ou au chlorure de baryum, microcapsules d'alginate de calcium-lactate PLL 0.01% ou 0.08%) sont transplantés dans deux modèles de souris soit des souris C57BL/6 ou des souris *scid*. Ces souris sont préalablement injectées avec la streptozotocine (0,150g/kg de poids corporel) qui détruit les cellules β du pancréas et induit un diabète (Like, 1978). On

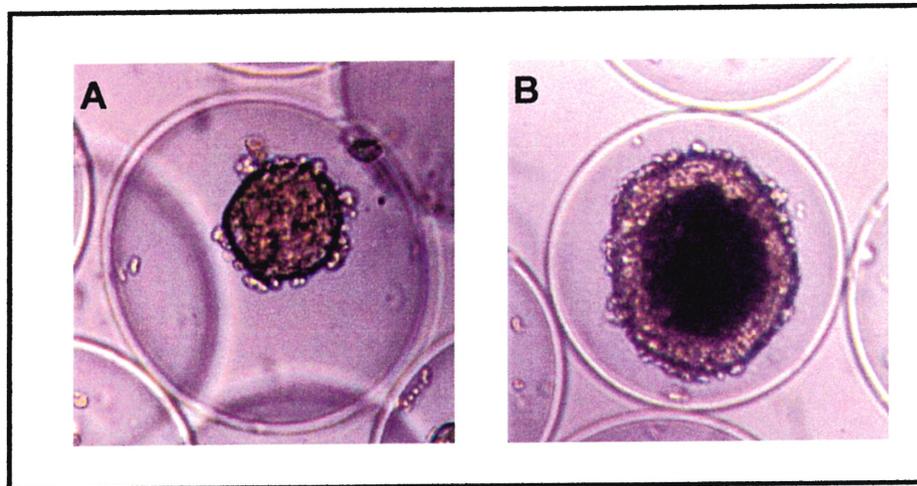


Figure 16. Photographie d'îlots de Langerhans microencapsulés : étude par microscopie optique à l'état frais des centres nécrosés. En A) îlot sain B) îlot présentant un centre nécrosé.

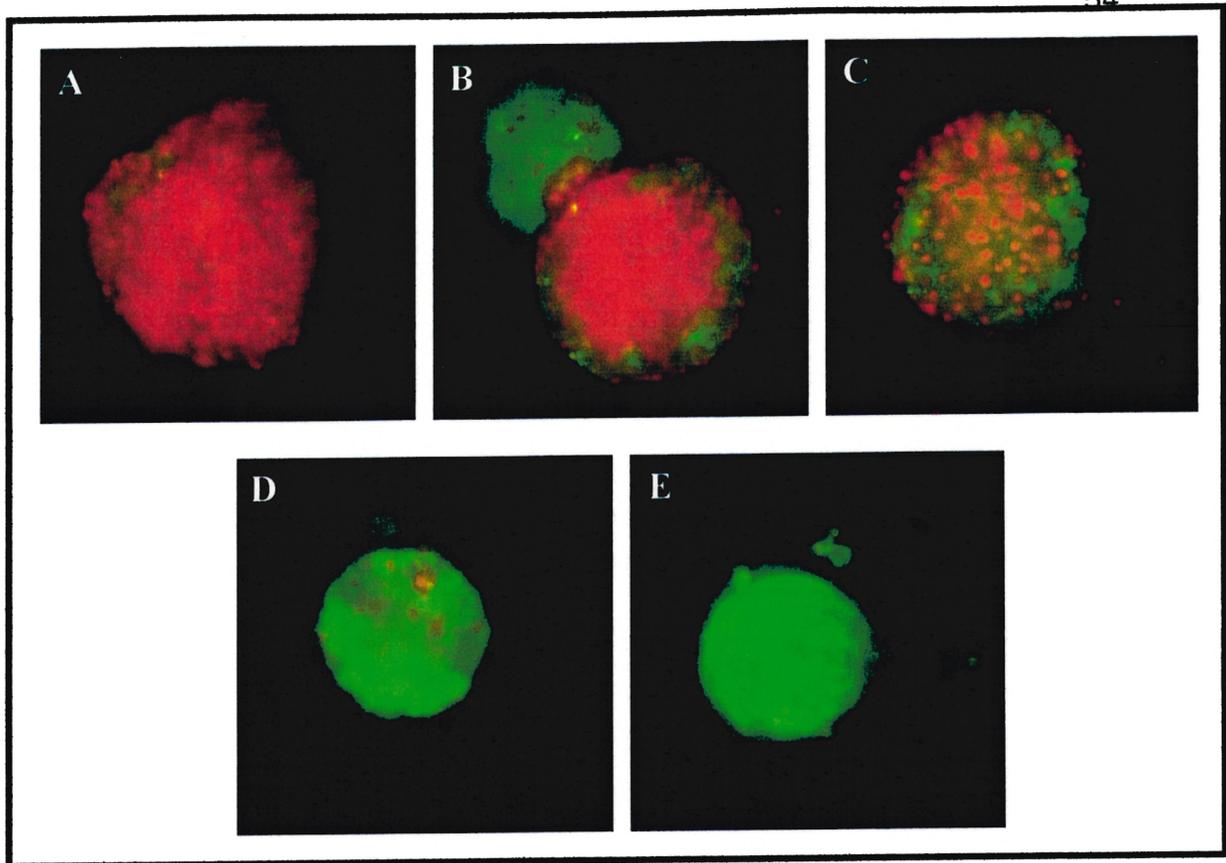


Figure 17. Photographie d'îlots de Langerhans microencapsulés : étude de viabilité en fluorescence. Les îlots sont colorés à l'aide d'iodure de propidium et d'acridine orange et analysés par microscopie en fluorescence. Les cellules vivantes sont colorées en vert et les cellules mortes sont colorés en rouge. A) îlot catégorisé non viable rouge (moins de 10 cellules vertes); B) îlot catégorisé non viable rouge-rouge-vert (plus de 50% de cellules mortes); C) îlot catégorisé non viable vert-rouge (50% de cellules vertes et 50% de cellules rouges); D) îlot catégorisé de viable vert-vert-rouge (plus de 50% de cellules vertes) et E) îlot catégorisé de viable vert (présence de 10 cellules rouges et moins).

Tableau III. Caractérisation des flots en viabilité afin d'obtenir l'index de viabilité.

Catégories de viabilité	Catégories en Fluorescence	Facteur de x
Viables (moins de 10 cellules mortes)	Vert (moins de 10 cellules rouges)	4
Viables (plus de 50 % de cellules vivantes)	Vert-Vert-Rouge (plus de 50% de cellules vertes)	3
Non Viables (autant de cellules vivantes que mortes)	Vert-Rouge (autant de cellules vertes que rouges)	2
Non Viables (moins de 50% de cellules vivantes)	Rouge-Rouge-Vert (moins de 50% de cellules vertes)	1
Non Viables (moins de 10 cellules vivantes)	Rouge (moins de 10 cellules vertes)	0

considère les animaux diabétiques lorsque leur glycémie est supérieure à 20 mmol/L de glucose pendant plus de deux semaines. Les implants sont lavés et resuspendus dans une solution physiologique (solution Ringer pour les billes et solution saline pour les microcapsules). Le transplant est aspiré dans une tubulure stérile puis injecté dans la cavité péritonéale des souris à l'aide d'un cathéter 22G de façon stérile. La glycémie des souris est ensuite évaluée à tous les jours durant la semaine suivant la transplantation, ensuite aux deux jours pendant deux mois et par la suite une fois par semaine à l'aide d'un lecteur de glycémie. (Élite).

3. Résultats

3.1. Résistance mécanique

Le premier objectif était de développer des microcapsules ayant une résistance mécanique adéquate avec trois seuils de perméabilité membranaire différents soit : petit 15-30 kDa ; moyen 40-60 kDa ; grand 85-100 kDa. Nous avons choisi d'évaluer la résistance des microcapsules en premier lieu en raison du rôle possible de celle-ci dans la biocompatibilité. Une microcapsule résistante aura moins de chance d'être brisée par les forces s'exerçant dans l'organisme receveur, c'est à dire, les forces de compression, d'abrasion et d'écrasement. Une des énigmes est que l'on ignore si c'est la fragilité des capsules qui fait qu'elles se détériorent et attirent les cellules du système immunitaire ou si ce sont les cellules du système immunitaire qui attaquent les capsules et les fragilisent. Toutefois, une microcapsule résistante aura moins tendance à se détériorer ou à être brisée, un état qui entraîne généralement son attaque et sa destruction par le système de défense du receveur.

Une autre raison de l'étude de la résistance au départ est purement technique puisque la résistance mécanique demande un nombre moins important de microcapsules et exige également moins de temps que l'étude de la perméabilité. Donc, l'étude de la résistance se trouve par le fait même moins onéreuse, plus rapide et elle nous donne des résultats très concluants, ce qui nous permet d'éliminer rapidement les microcapsules ne répondant pas à nos exigences.

Le test de résistance mécanique (Leblond, 1996) a d'abord été effectué sur des microcapsules de type high M (Tableau IV, page 57). Différents types de microcapsules ont été conçues à l'aide de différentes concentrations et plusieurs temps d'incubation dans la PLL. Le même test a été réalisé sur les microcapsules de type high G (Tableau V, page 58). Le pourcentage de gonflement est calculé et l'épaisseur des membranes (épaisseur memb.) est mesuré par microscopie optique. Il est à noter que le test de résistance mécanique soumet les microcapsules à un niveau de stress beaucoup plus élevé que ce qu'elles peuvent subir *in vivo* durant toute une vie.

Tableau IV. Évaluation de la résistance à la dégradation mécanique des microcapsules d'alginate LVM *.

T.I. dans la PLL	Caractéristiques des microcapsules	Capsules PLL 0,01%	Capsules PLL 0,02%	Capsules PLL 0,03%
5 minutes	% gonflement E.M. % bris	58,1 % 3,7±0,8µm 90,2 % ±0,6%	43,7 % 4,0±0,0µm 90,9 % ±0,5%	32,7 % 6,0±1,2µm 89,1 % ±1,0%
10 minutes	% gonflement E.M. % bris	46,4 % 4,0±0,0µm 90,2 % ±0,8%	29,0 % 8,4±0,8µm 77,7 % ±2,5%	8,3 % 8,0±0,4µm 35,0 % ±5,9%
15 minutes	% gonflement E.M. % bris		11,4 % 13,7±1,2µm 34,1 % ±8,7%	0,6 % 12,5±0,8µm 25,1 % ±8,5%
20 minutes	% gonflement E.M. % bris	35,2 % 4,4±0,8µm 88,3 % ±0,7%	13,1 % 12,5±1,2µm 44,2 % ±9,8%	1,3 % 12,5±0,8µm 17,8 % ±1,6%

E.M. : Épaisseur de la membrane

T.I. : Temps d'incubation

* Résistance évaluée à l'aide du test de résistance mécanique selon Leblond et al. (1996).

Tableau V. Évaluation de la résistance à la dégradation mécanique des microcapsules d'alginate LVG.

T.i. dans la PLL	Caractéristiques des microcapsules	Capsules PLL 0,01%	Capsules PLL 0,02%	Capsules PLL 0,03%
5 minutes	% gonflement E.M. % bris	21,9 % 2,7 ± 0,8µm 88,7 ± 1,2%	6,76 % 3,6 ± 0,8µm 69,8 ± 2,2%	5,71 % 4,8 ± 0,8µm 54,2 ± 2,9%
10 minutes	% gonflement E.M. % bris	14,2 % 2,0 ± 0,0µm 86,6 ± 2,2%	6,3 % 4,8 ± 0,8µm 36,3 ± 11,5%	11,1 % 8,0 ± 0,0µm 16,9 ± 2,2%
15 minutes	% gonflement E.M. % bris	10,7 % 3,2 ± 0,8µm 67,3 ± 4,4%	1,43 % 10,5 ± 1,2µm 26,4 ± 8,6%	-0,43 % 14,1 ± 1,6µm 9,7 ± 1,2%
20 minutes	% gonflement E.M. % bris	9,9 % 3,9 ± 0,4µm 50,8 ± 5,9%	1,0% 12,1 ± 0,8µm 16,3 ± 1,0%	-3,26 % 20,9 ± 1,6µm 16,6 ± 6,3%

E.M. : Épaisseur de la membrane

T.I. : Temps d'incubation

* Résistance évaluée à l'aide du test de résistance mécanique selon Leblond et al. (1996).

Le pourcentage de bris moyen des capsules fabriquées de façon standard au laboratoire (5 minutes dans la PLL 0,05%) est en moyenne de 60%. Ce pourcentage semble être acceptable pour permettre une résistance convenable lors des transplantations *in vivo* d'après des résultats obtenus dans notre laboratoire. Les capsules fabriquées à l'aide de l'alginate LVM présentant un pourcentage de bris équivalents à celui des capsules standards sont les capsules PLL 0.02% 15 et 20 minutes, les capsules PLL 0.03% 10,15 et 20 minutes. Pour celles fabriquées à l'aide de l'alginate LVG, répondant au même critère, ce sont les capsules PLL 0.01% 20 minutes, les capsules PLL 0.02% 10, 15 et 20 minutes, les capsules PLL 0.03% 5,10, 15 et 20 minutes.

Il est à noter que les capsules incubées 20 minutes dans la PLL, surtout à concentration 0,03%, ont une apparence moins sphérique. Elles ont tendance à être imparfaites, à avoir des stries à la surface de la membrane et même dans certain cas, à se contracter pour finalement rétrécir ce qui explique un pourcentage de gonflement négatif. On remarque également que le type d'alginate semble avoir un effet sur le pourcentage de gonflement puisque à une même concentration et au même temps d'incubation de PLL le pourcentage de gonflement des microcapsules fabriquées avec l'alginate LVG est inférieur à celui obtenu avec l'alginate LVM. En général, on remarque que plus la concentration de la PLL ou le temps d'incubation dans la PLL augmente, plus la résistance et l'épaisseur de la membrane augmente mais plus la taille des capsules diminue.

3.2. Perméabilité

À partir des résultats des tests de résistance mécanique, nous avons éliminé les combinaisons (concentration de PLL et temps d'incubation) qui engendraient des microcapsules trop fragiles. La perméabilité des combinaisons déterminées satisfaisantes a été étudiée pour déterminer le seuil de perméabilité membranaire. L'objectif de cette étude était de déterminer 3 types de microcapsule ayant chacun un seuil de perméabilité différent et bien distinct (15-30 kDa, 40-60 kDa et 85-100 kDa). Le passage de différents marqueurs de poids moléculaire connus nous permet, par chromatographie par exclusion de taille inversée, de déterminer le seuil de perméabilité membranaire des microcapsules étudiées. Le coefficient de partition chromatographique

(K_{sec}) est calculé selon la formule suivante; $K_{sec} = (V_{échantillon} - V_0) / (V_t - V_0)$. Un K_{sec} égal à 0 indique l'imperméabilité de la substance tandis qu'un K_{sec} égal à 1 indique la diffusion libre de la substance à travers la membrane des microcapsules.

Avec cette méthode, nous sommes capables de déterminer le seuil de perméabilité membranaire de plusieurs types de microcapsules d'alginate LVM et d'alginate LVG. Les dextrans et les marqueurs protéiques sont utilisés en parallèle. Ces mêmes marqueurs peuvent cependant être comparés à l'aide des 'viscosity radius', facteur qui tient compte de la viscosité et de la forme tridimensionnelle du marqueur.

Les premières capsules étudiées ont été les capsules PLL 0,02%, PLL 0,03% et PLL 0,08%. Les capsules LVM PLL 0,02% 15, 20 minutes et LVM PLL 0,03% 10 minutes ont un seuil de perméabilité se situant entre 44 000 et 66 000 Da. Les capsules LVM PLL 0,08% 5 minutes ont pour leur part un seuil de perméabilité se situant entre 35 250 et 44 000 Da. Les capsules LVG PLL 0,02% ont un seuil entre 29 000 et 31 200 Da comme les capsules PLL 0,08%. Ainsi avec cette approche nous avons réussi à obtenir des microcapsules ayant un petit et un moyen seuil de perméabilité recherché, tout en obtenant une bonne résistance (Tableau VI et VII, page 61 et 62).

Mais l'obtention de capsules ayant un seuil de perméabilité élevé (85-100 kDa) en préservant une résistance membranaire acceptable s'est avéré plus difficile à atteindre que prévu. Les combinaisons de concentrations les plus faibles avec les temps d'incubation les moins longs n'ont pas donné le seuil de perméabilité élevé recherché. Même l'utilisation d'alginate high G (Tableau VIII et IX, page 63 et 64), qui crée des liens avec les ions divalents plus étroits et du même coup plus solides n'a pas permis d'arriver à un seuil de perméabilité élevé. Les capsules LVG PLL 0,01% 5 minutes ont un seuil de perméabilité se situant entre 44 000 et 66 000 Da. Nous avons utilisé plusieurs méthodes qui n'ont pas donné les résultats escomptés.

Devant cette impasse, nous avons réajusté notre tir et décidé d'opter pour une approche différente pour atteindre le seuil de perméabilité élevé. Cette nouvelle tactique, qui nous a permis d'obtenir le haut seuil de perméabilité a consisté à utiliser des billes d'alginate non recouvertes de PLL. Ainsi, avec ce type d'immobilisation nous avons pu déterminer que le seuil de perméabilité des billes d'alginate de calcium se situait entre 76 000 Da et

Tableau VI. K_{sec} déterminé par les marqueurs hydrates de carbone sur les microcapsules d'alginate LVM*.

MARQUEURS (kDa)	$R\eta$ (nm)	Type de Microencapsulation					Billes d'alginate de Ca^{2+}
		Capsules PLL 0,02% 20 min	Capsules PLL 0,02% 15 min	Capsules PLL 0,03% 10 min	Capsules PLL 0,08% 5 min		
Dextran (2000,0)	34,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Dextran (148,3)	9,4	---	---	---	0,0	0,0	0,0
Dextran (71,2)	6,6	---	---	0,0	0,0	0,1	0,1
Dextran (69,0)	6,5	---	---	0,0	0,1	0,0	0,0
Dextran (40,5)	5,0	---	---	0,0	0,0	0,0	0,4
Dextran (38,6)	4,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4
Dextran (19,6)	3,5	0,0	0,8	0,0	0,1	0,1	0,6
Dextran (19,5)	3,5	0,0	0,8	---	---	0,1	---
Dextran (9,4)	2,4	0,6	0,8	0,7	0,7	0,7	0,7
Dextran (4,4)	1,7	0,6	0,8	0,7	0,7	0,7	0,7

$R\eta$: Viscosity radius

* Perméabilité évaluée par chromatographie par exclusion de taille inversée selon Robitaille et al. (1999).

Tableau VII. K_{sec} déterminé par les marqueurs protéiques sur les microcapsules d'alginate LVM*.

MARQUEURS (kDa)	$R\eta$ (nm)	Type de Microencapsulation					Billes d'alginate de Ca^{2+}
		Capsules PLL 0,02% 20 min	Capsules PLL 0,02% 15 min	Capsules PLL 0,03% 10 min	Capsules PLL 0,08% 5 min		
Transferrine (76-81,00)	3,6-3,7	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,9
BSA (66,00)	3,4	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,9
Ovalbumine (44,00)	2,9	0,7	0,9	0,8	0,1	0,1	0,9
Carboxypeptidase A (35,25)	2,7	0,7	1,0	0,8	0,7	0,7	0,9
Superoxyde dismutase (31,20)	2,5	0,7	1,0	0,8	0,8	0,8	1,0
Anhydrase Carbonique (29,00)	2,5	0,8	1,0	0,8	0,8	0,8	1,0
SBTI (20,10)	2,2	0,8	0,9	0,8	0,8	0,8	1,0
Phospholipase A ₂ (14,50)	1,9	0,7	1,0	0,8	0,8	0,8	1,0
IGF-II (7,50)	1,5	0,7	---	---	---	0,8	1,0
Glucose(180,20)	0,4	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

BSA : albumine sérique de bovin

$R\eta$: Viscosity radius

* Perméabilité évaluée par chromatographie par exclusion de taille inversée selon Robitaille et al. (1999)

Tableau VIII. K_{sec} déterminé par les marqueurs hydrates de carbone sur les microcapsules d'alginate LVG *.

MARQUEURS (kDa)	$R\eta$ (nm)	Type de Microencapsulation				Billes d'alginate de Ba^{2+}
		Capsules PLL 0,01% 5 min	Capsules PLL 0,02% 15 min	Capsules PLL 0,08% 5 min	Billes d'alginate de Ca^{2+}	
Dextran (2000,0)	34,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Dextran (148,3)	9,4	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1
Dextran (71,2)	6,6	0,0	0,0	0,0	0,7	0,0
Dextran (69,0)	6,5	0,0	0,0	0,0	---	0,0
Dextran (40,5)	5,0	0,0	0,0	0,0	0,7	0,1
Dextran (38,6)	4,8	0,0	0,0	0,0	0,7	0,1
Dextran (19,6)	3,5	0,6	0,0	0,0	---	0,6
Dextran (19,5)	3,5	0,7	0,0	0,0	0,8	0,6
Dextran (9,4)	2,4	0,7	0,7	0,7	0,8	0,7
Dextran (4,4)	1,7	0,8	0,7	0,8	0,8	0,7

$R\eta$: Viscosity radius

* Perméabilité évaluée par chromatographie par exclusion de taille inversée selon Robitaille et al. (1999).

Tableau IX. K_{sec} déterminé par les marqueurs protéiques sur les microcapsules d'alginate LVG*.

MARQUEURS (kDa)	R η (nm)	Type de Microencapsulation					
		Capsules PLL 0,01 % 5 min	Capsules PLL 0,02 % 15 min	Capsules PLL 0,08 % 5 min	Billes d'alginate de Ca ²⁺	Billes d'alginate de Ba ²⁺	
Immunoglobuline G (160,00)	4,7	---	---	---	0,6	---	
Transferrine (76-81,00)	3,6 – 3,7	0,0	0,0	0,0	0,8	0,2	
BSA (66,00)	3,4	0,0	0,0	0,0	0,7	0,1	
Ovalbumine (44,00)	2,9	0,9	0,0	0,0	0,8	0,4	
Carboxypeptidase A (35,25)	2,7	0,9	0,0	0,0	---	0,6	
Superoxyde dismutase (31,20)	2,5	0,7	0,0	0,0	---	0,6	
Anhydrase Carbonique (29,00)	2,5	0,9	0,7	0,8	---	0,8	
SBTI (20,10)	2,2	0,7	0,7	0,8	---	0,8	
Phospholipase A ₂ (14,50)	1,9	1,0	0,7	0,9	---	0,8	
IGF-II (7,50)	1,5	---	0,7	0,8	---	0,8	
Glucose(180,20)	0,4	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	

BSA : albumine sérique de bovin

R η : Viscosity radius

* Perméabilité évaluée par chromatographie par exclusion de taille inversée selon Robitaille et al. (1999).

environ 160 000 Da pour l'alginate high G et un seuil un peu moins élevé pour les billes d'alginate de baryum (Tableau IX, page 64). D'après l'étude de perméabilité et l'examen minutieux des "viscosity radius", l'alginate LVM révélait des discordances entre les marqueurs protéiques et les dextrans selon les viscosity radius. L'alginate LVG se comportait distinctement puisqu'on observait une similitude entre les dextrans et les marqueurs protéiques. C'est pourquoi l'alginate LVG a été choisie afin poursuivre les expériences *in vitro*. Les capsules faites avec de la PLL 0,08% 5 minutes ont un seuil de perméabilité petit soit entre 29 000 et 31 200 Da. Les capsules PLL 0,01% en ont un se situant entre 44 000 et 66 000 Da. Les billes d'alginate de barium, pour leur part, ont un seuil de perméabilité entre 35 250 et 44 000 Da et les billes d'alginate de calcium possèdent un seuil entre 76 000 et un peu plus de 160 000 Da (tableau IX, page 64). Ces quatre types d'implants ont été sélectionnés pour évaluer l'effet des différents seuils de perméabilité membranaire *in vitro*.

3.3. Études *in vitro*

Comme un des buts premiers de ces travaux était d'étudier l'effet du seuil de perméabilité membranaire sur la survie, nous avons donc décidé d'opter pour un seul type d'alginate dans nos études *in vitro* afin de ne pas influencer les résultats. Le choix de l'alginate LVG a été fait en raison des études de perméabilité et de l'augmentation de la résistance qu'elle procure lors de la formation de la microcapsule.

Nous avons étudié l'effet du seuil de perméabilité membranaire sur la survie *in vitro*. À cette fin, des îlots de rats Wistar ont été isolés et encapsulés dans des microcapsules faites avec la PLL 0.08% (petit seuil membranaire), PLL 0.01% (moyen seuil membranaire) ainsi que dans des billes d'alginate de baryum et de calcium (seuil membranaire élevé). Ces îlots ont été placés en culture pour une période de 85 jours.

3.3.1. Centres nécrosés

Les centres nécrosés ont été observés en microscopie optique. Les diamètres des îlots non nécrosés et des îlots nécrosés, ainsi que la taille de la zone de nécrose ont été évalués (Figure 18, page 67; Figure 19, page 68; Figure 20, page 69; Figure 21, page 70). Le nombre d'îlots équivalents (un îlot équivalent correspond à un îlot de 150 μ m de diamètre) nécrosés a également été évalué (Figure 22, page 71). On peut voir que le diamètre des îlots non nécrosés diminue en fonction du temps et semble se stabiliser à partir de 21 jours. Le diamètre moyen des îlots nécrosés est plus grand que pour les îlots non nécrosés. Le diamètre moyen des îlots nécrosés diminue en fonction du temps, comme dans le cas des îlots non nécrosés qui stabilisent également à partir de 21 jours. Le diamètre moyen de la zone de nécrose, quant à lui, diminue lui aussi mais se stabilise plutôt vers 14 jours. La proportion d'îlots équivalents ayant un centre nécrosé a tendance à être moindre dans les billes d'alginate à partir de 42 jours (Figure 22, page 71).

3.3.2. Viabilité

L'étude de la viabilité s'est échelonnée sur plusieurs jours soit : 0, 2, 4, 7, 14, 21, 28, 42, 56 et 85 jours. Elle a été réalisée selon la méthode décrite à la section 2.8. L'iodure de propidium est le colorant vital le plus largement utilisé pour les études de viabilité cellulaire. L'ajout de l'acridine orange nous donne une combinaison forte utile pour l'évaluation de la viabilité afin de distinguer l'état des cellules.

Avant la coloration avec l'iodure de propidium/acridine orange, un décompte des îlots est effectué. Chaque îlot est mesuré à l'aide d'une échelle graduée sur un microscope optique. Un îlot équivalent correspond à un îlot de 150 μ m de diamètre. Ceci nous permet d'évaluer le nombre d'îlots équivalents de chaque préparation (Figure 23, page 72). On peut voir à l'aide de ce décompte que le nombre d'îlots équivalents diminue en fonction du temps et ce peu importe le type d'implant. Cependant, cette diminution semble se stabiliser à 21 jours.

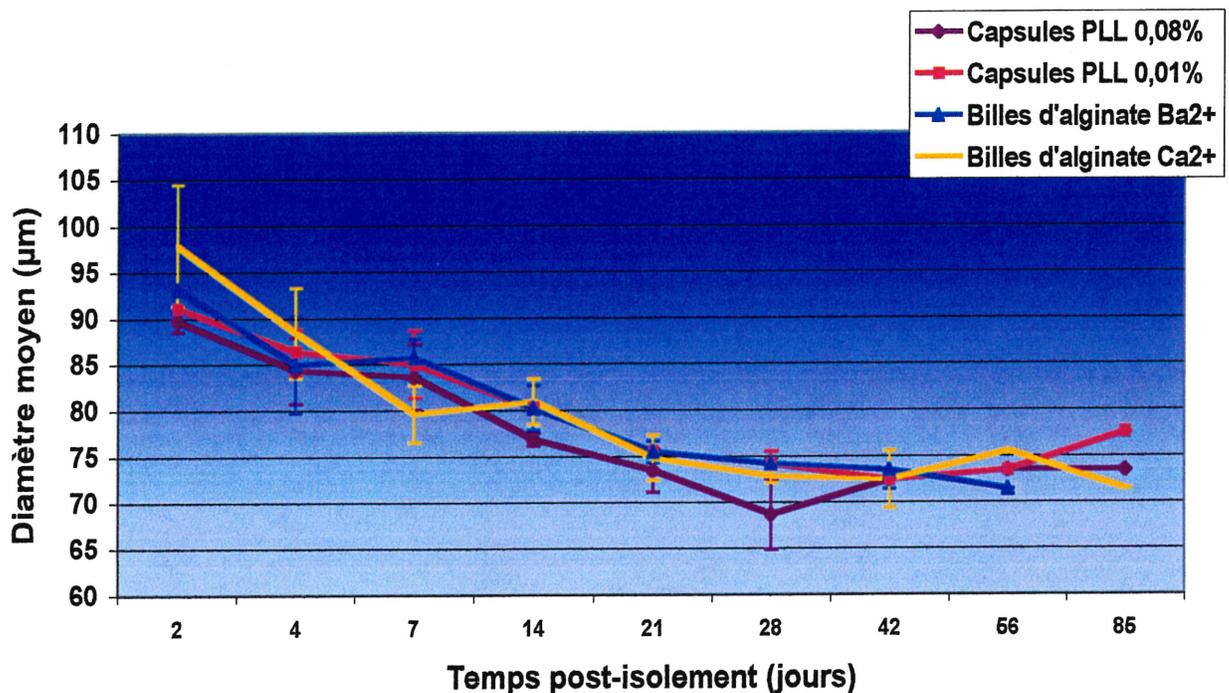


Figure 18. Diamètre moyen des îlots non nécrosés en fonction du temps, cultivés dans le milieu de culture CMRL. Effet du seuil de perméabilité membranaire sur la viabilité *in vitro* des îlots de Langerhans encapsulés (études sur culture fraîche en microscopie optique). Des îlots de rats Wistar sont isolés et encapsulés dans des microcapsules (PLL 0,01% et PLL 0,08%) ou dans des billes d'alginate (non recouvertes) et mis en culture à 37°C dans du CMRL-1066 (Gibco) contenant 10% de sérum de veau fœtal. L'apparence de centre nécrosé est évaluée par observation en microscopie optique. Le diamètre des îlots non nécrosés est mesuré à l'aide d'un oculaire gradué. On observe que le diamètre des îlots non nécrosés diminue en fonction du temps mais ne varie pas entre les types d'implants. (n = 3 pour tous les implants à 2, 4, 7, 14, 21, 28 jours; n = 2 à 42 jours; n = 1 à 56 jours et n = 1 à 85 jours). Il n'y a aucune différence significative entre les implants.

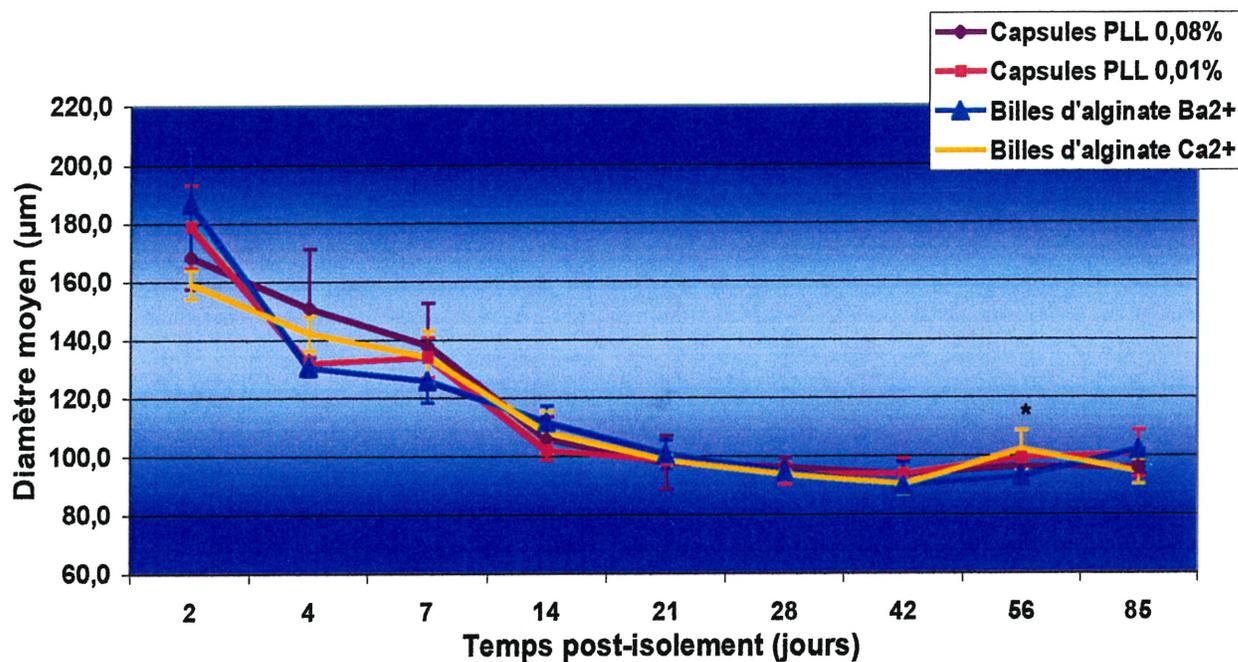


Figure 19. Diamètre moyen des îlots nécrosés en fonction du temps, cultivés dans le milieu de culture CMRL. Effet du seuil de perméabilité membranaire sur la viabilité *in vitro* des îlots de Langerhans encapsulés (études sur culture fraîche en microscopie optique). Des îlots de rats Wistar sont isolés et encapsulés dans des microcapsules (PLL 0,01% et PLL 0,08%) ou dans des billes d'alginate (non recouvertes) et mis en culture à 37°C dans du CMRL-1066 (Gibco) contenant 10% de sérum de veau fœtal. L'apparence de centre nécrosé est évaluée par observation en microscopie optique. Le diamètre des îlots nécrosés est mesuré à l'aide d'un oculaire gradué. On observe que le diamètre des îlots nécrosés diminue en fonction du temps mais ne varie pas entre les types d'implants. (n = 3 pour tous les implants à tous les temps sauf pour les billes de Ba²⁺ où n = 2 à 56 jours et n = 1 à 85 jours).

* P < 0,05 entre capsules PLL 0,01% et Billes d'alginate Ba²⁺

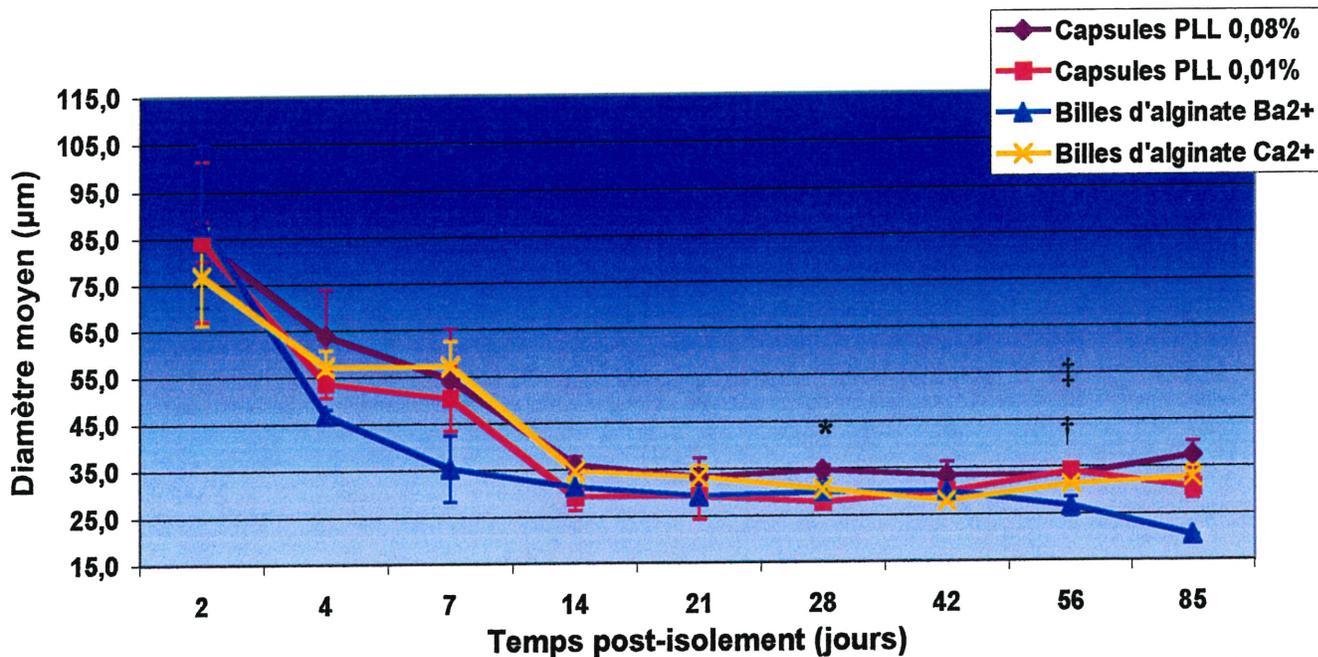


Figure 20. Diamètre moyen de la zone de nécrose des îlots nécrosés en fonction du temps, cultivés dans le milieu de culture CMRL. Effet du seuil de perméabilité membranaire sur la viabilité *in vitro* des îlots de Langerhans encapsulés (études sur culture fraîche en microscopie optique). Des îlots de rats Wistar sont isolés et encapsulés dans des microcapsules (PLL 0,01% et PLL 0,08%) ou dans des billes d'alginate (non recouvertes) et mis en culture à 37°C dans du CMRL-1066 (Gibco) contenant 10% de sérum de veau foetal. L'apparence de centre nécrosé est évaluée par observation en microscopie optique. Le diamètre des îlots nécrosés est mesuré à l'aide d'un oculaire gradué. On observe que le diamètre des zones de nécrose diminue en fonction du temps mais ne varie pas entre les types d'implants. (n = 3 pour tous les implants à tous les temps sauf pour les billes de Ba²⁺ où n = 2 à 56 jours et n = 1 à 85 jours).

* P < 0,05 entre Capsules PLL 0,01% et Capsules PLL 0,08%

† P < 0,05 entre Billes d'alginate Ba²⁺ et Capsules PLL 0,01% ainsi que 0,08%

‡ P < 0,05 entre Billes d'alginate Ca²⁺ et Capsules PLL 0,01%

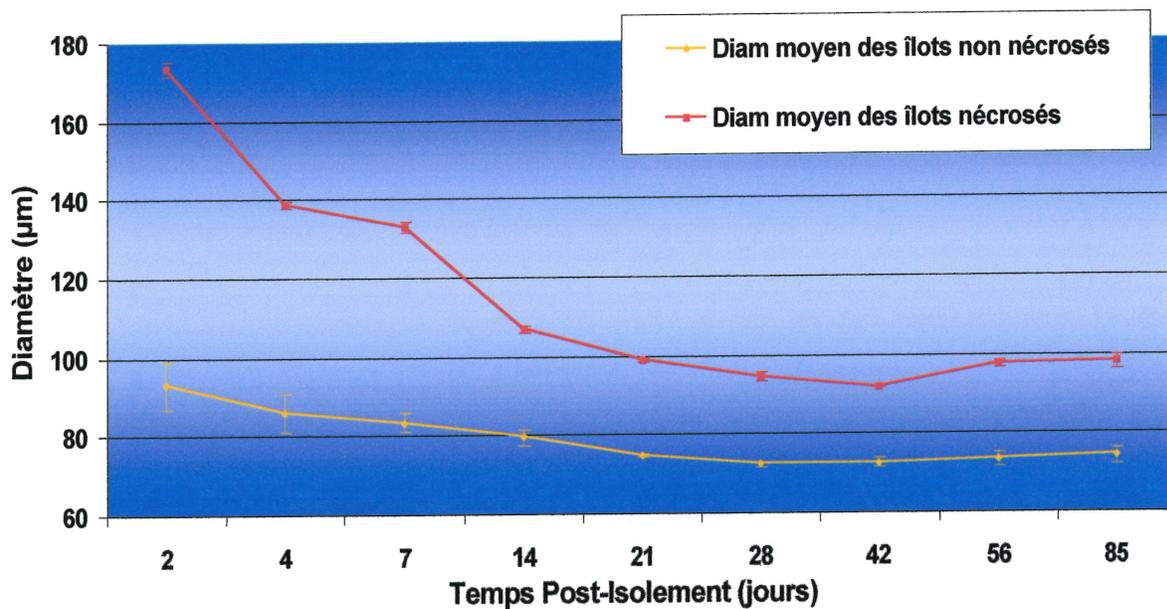


Figure 21. Moyenne des 4 implants : Diamètre moyen des îlots non nécrosés et nécrosés en fonction du temps cultivés, dans le milieu de culture CMRL. Effet du seuil de perméabilité membranaire sur la viabilité *in vitro* des îlots de Langerhans encapsulés (études sur culture fraîche en microscopie optique). Des îlots de rats Wistar sont isolés et encapsulés dans des microcapsules (PLL 0,01% et PLL 0,08%) ou dans des billes d'alginate (non recouvertes) et mis en culture à 37°C dans du CMRL-1066 (Gibco) contenant 10% de sérum de veau foetal. L'apparence de centre nécrosé est évaluée par observation en microscopie optique. Le diamètre des îlots non nécrosés et nécrosé est mesuré à l'aide d'un oculaire gradué. Les îlots nécrosés à 2 jours sont de diamètre élevé et ce diamètre diminue en fonction du temps ce qui indique la perte des îlots nécrosés de grande taille.

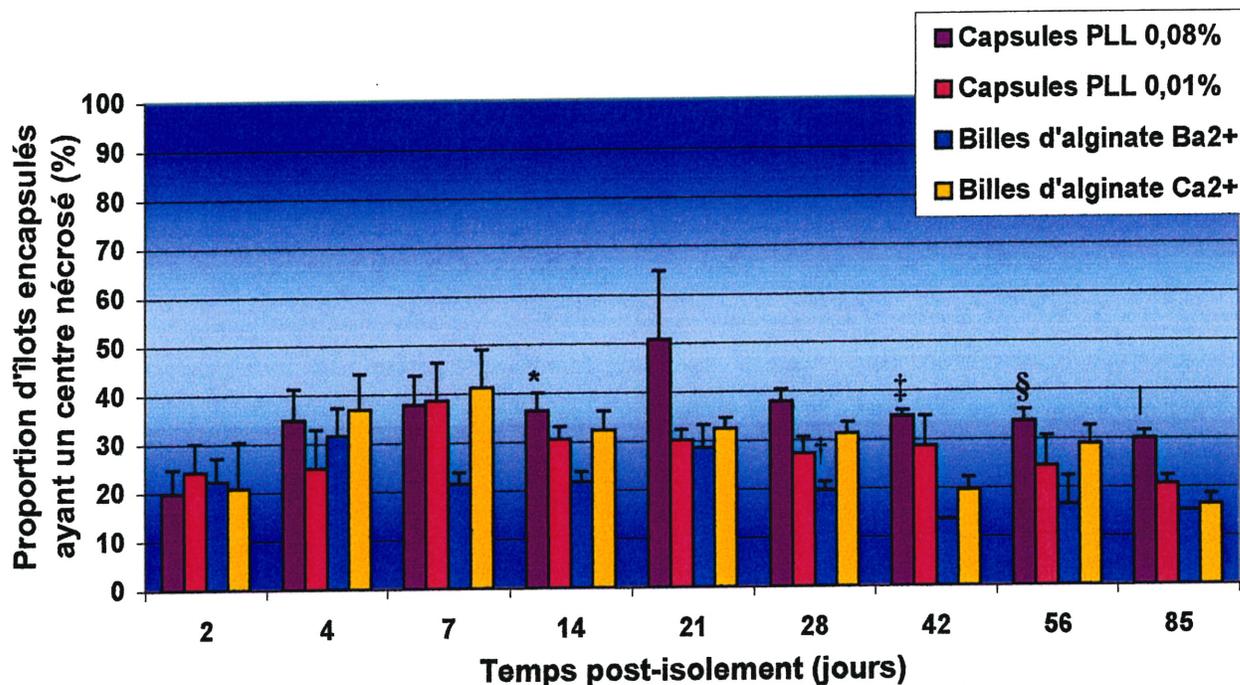


Figure 22. Proportion d'îlots équivalents encapsulés ayant un centre nécrosé en fonction du temps, cultivés dans le milieu de culture CMRL. Effet du seuil de perméabilité membranaire sur la viabilité *in vitro* des îlots de Langerhans encapsulés (études sur culture fraîche en microscopie optique). Des îlots de rats Wistar sont isolés et encapsulés dans des microcapsules (PLL 0,01% et PLL 0,08%) ou dans des billes d'alginate (non recouvertes) et mis en culture à 37°C dans du CMRL-1066 (Gibco) contenant 10% de sérum de veau foetal. L'apparence de centre nécrosé est évaluée par observation en microscopie optique. Le diamètre des îlots nécrosés est mesuré à l'aide d'un oculaire gradué. On observe que la proportion d'îlots nécrosés augmente en fonction du temps et se stabilise au jour 21. Ce phénomène suggère que les îlots de grande taille sont plus susceptibles au processus de nécrose. Cependant, la proportion d'îlots nécrosés ne varie pas entre les types d'implants, ce qui indique que le seuil de perméabilité membranaire n'a pas d'effet sur la nécrose des îlots *in vitro*. (n = 3 pour tous les implants à tous les temps sauf pour les billes de Ba²⁺ où n = 2 à 56 jours et n = 1 à 85 jours).

* p < 0,05 entre capsules PLL 0,08% et billes d'alginate Ba²⁺

† p < 0,05 entre billes d'alginate Ba²⁺ et capsules PLL 0,08% ainsi que billes d'alginate Ca²⁺

‡ p < 0,01 entre capsules PLL 0,08% et billes d'alginate de Ca²⁺ ainsi que Ba²⁺

§ p < 0,05 entre capsules PLL 0,08% et billes d'alginate Ba²⁺

_ p < 0,05 entre capsules PLL 0,08% et capsules PLL 0,01% ainsi que billes d'alginate Ca²⁺

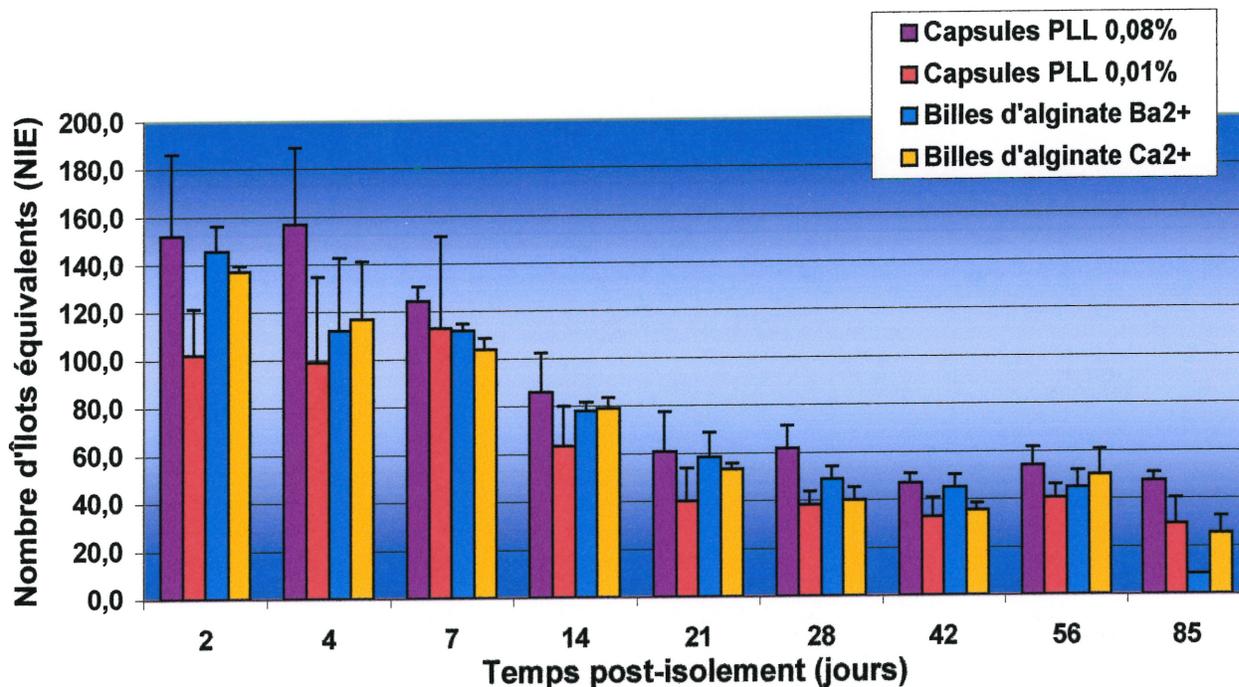


Figure 23. Nombre d'îlots équivalents total en fonction du temps, cultivés dans le milieu de culture CMRL. Effet du seuil de perméabilité membranaire sur la viabilité *in vitro* des îlots de Langerhans encapsulés (études sur culture fraîche en microscopie optique). Des îlots de rats Wistar sont isolés et encapsulés dans des microcapsules (PLL 0,01% et PLL 0,08%) ou dans des billes d'alginate (non recouvertes) et mis en culture à 37°C dans du CMRL-1066 (Gibco) contenant 10% de sérum de veau fœtal. Le dénombrement des îlots se fait par microscopie optique et est exprimé en nombre d'îlots équivalents (un îlot équivalent = une îlot de diamètre égal à 150µm). On observe une diminution du nombre d'îlots équivalents qui se stabilise à partir du jour 21 jusqu'au jour 85. Il n'y a pas de différence significative entre les types d'implants ce qui indique que le seuil de perméabilité membranaire n'a pas d'effet sur le nombre d'îlots équivalents. (n=3 pour tous les implants à tous les temps sauf pour les billes d'alginate de Ba2+ ou n=2 à 42 jour et n=1 à 85 jours).

On peut également évaluer la taille des îlots en fonction du temps en calculant le facteur de conversion en nombre d'îlots équivalent moyen (Figure 24, page 74). Le facteur de conversion en nombre d'îlots équivalent moyen est en fait le rapport du nombre d'îlots équivalents total sur le nombre d'îlots total. Encore une fois, on peut voir la même tendance que dans la figure 5, c'est-à-dire que le facteur diminue jusqu'à 21 jours et que cela semble se stabiliser à partir de ce temps.

Pour ce qui est de la viabilité, on considère viables (classement arbitraire et qualitatif déterminé dans notre laboratoire) les îlots ayant soit 1) moins de dix cellules mortes (rouges) soit 2) plus de 50% de cellules vivantes (vertes). Le pourcentage d'îlots viables est ensuite multiplié par le nombre d'îlots équivalents pour nous donner le nombre d'îlots équivalents viables (Figure 25, page 75). Les autres îlots sont classés non viables (autant de cellules vivantes que de mortes, moins de 50% de cellules vivantes et moins de dix cellules vivantes). Selon cette figure, la tendance se maintient puisque le nombre d'îlots équivalents viables diminue jusqu'à 21 jours et se stabilise par la suite. D'après ces figures (23, 24, 25, page 72, 74, 75) on peut voir que le nombre d'îlots, la taille (masse) des îlots et la viabilité diminue jusqu'à 21 jours et se stabilise par la suite. On peut également remarquer qu'il n'y a pas vraiment de différence entre les implants à chaque temps. Donc, la viabilité ne varie pas selon le type d'encapsulation effectué.

Cependant, si on analyse la viabilité en détail, c'est-à-dire que l'on effectue un grade de viabilité, on distingue certaines différences entre les implants (Figure 26 et 27, page 76 et 77). Pour ce faire, on utilise un index de viabilité qui consiste à multiplier chaque catégorie de viabilité par un facteur déterminé entre quatre et zéro. Quatre est la valeur attribuée aux îlots viables ayant moins de dix cellules mortes (rouges) et zéro est la valeur attribuée aux îlots non viables ayant moins de dix cellules vivantes (vertes) (voir tableau III, page 55). Avec ce résultat, on peut voir la différence entre un implant qui a une majorité d'îlots viables (ayant moins de dix cellules mortes) et un autre implant ayant une majorité d'îlots viables lui aussi, mais ces îlots se caractérisent par plus de 50% de cellules vivantes. C'est le phénomène qui se produit dans la figure 26 puisqu'on remarque que les capsules

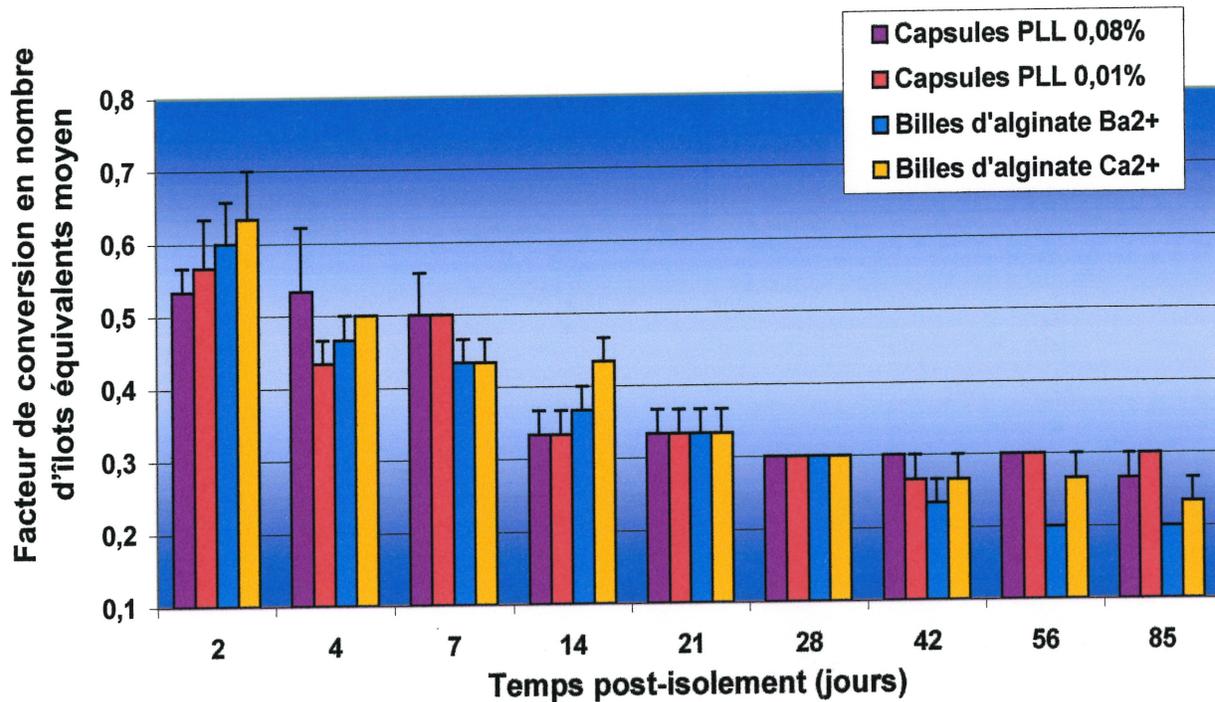


Figure 24. Facteur de conversion en nombre d'îlots équivalents moyen en fonction du temps, cultivés dans le milieu de culture CMRL. Effet du seuil de perméabilité membranaire sur la viabilité *in vitro* des îlots de Langerhans encapsulés (études sur culture fraîche en microscopie optique). Des îlots de rats Wistar sont isolés et encapsulés dans des microcapsules (PLL 0,01% et PLL 0,08%) ou dans des billes d'alginate (non recouvertes) et mis en culture à 37°C avec du CMRL-1066 (Gibco) contenant 10% de sérum de veau fœtal. Le dénombrement des îlots se fait par microscopie optique et est exprimé en nombre d'îlots équivalents (un îlots équivalent = un îlot de diamètre égal à 150µm). On observe une diminution du nombre d'îlots équivalents qui se stabilise à partir du jour 21 jusqu'au jour 85. Il n'y a pas de différence significative entre les types d'implants, ce qui indique que le seuil de perméabilité membranaire n'a pas d'effet sur la masse totale des îlots. (n=3 pour tous les implants à tous les temps sauf pour les billes d'alginate de Ba2+ ou n=2 à 42 jour et n=1 à 85 jours).

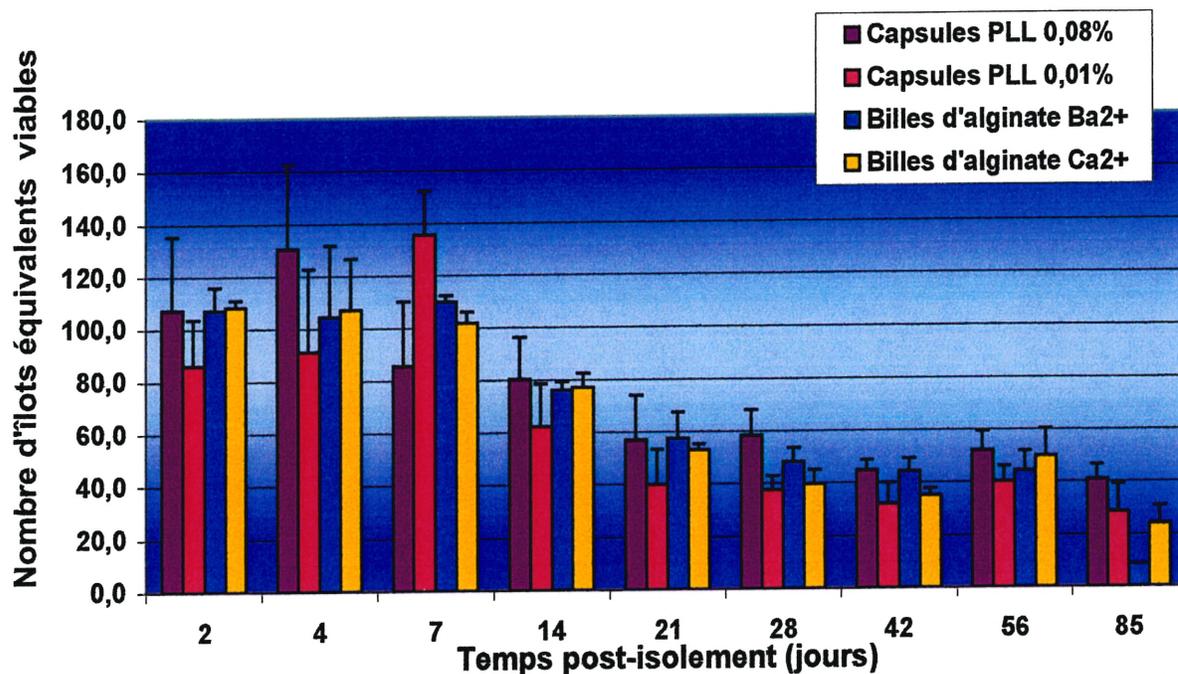


Figure 25. Nombre d'îlots équivalents viables en fonction du temps, cultivés dans le milieu de culture CMRL. Effet du seuil de perméabilité membranaire sur la viabilité *in vitro* des îlots de Langerhans encapsulés (études en fluorescence). Des îlots de rats Wistar sont isolés et encapsulés dans des microcapsules (PLL 0,01% et PLL 0,08%) ou dans des billes d'alginate (non recouvertes) et mis en culture à 37°C dans du CMRL-1066 (Gibco) contenant 10% de sérum de veau fœtal. Le dénombrement des îlots se fait par microscopie optique et est exprimé en nombre d'îlots équivalents (un îlots équivalent = un îlot de diamètre égal à 150µm). La viabilité est déterminée par une coloration à l'acridine orange et l'iodure de propidium. Les îlots sont ensuite observés en microscopie à fluorescence et analysés selon leur degré de viabilité. Une diminution du nombre d'îlots équivalents viable est observée. Cette diminution se stabilise à partir du jour 21 jusqu'au jour 85. Il n'y a pas de différence significative entre les types d'implants ce qui indique que le seuil de perméabilité membranaire n'a pas d'effet sur le nombre d'îlots équivalents viables. (n = 3 pour tous les implants à tous les temps sauf pour les billes d'alginate de Ba²⁺ ou n = 2 à 42 jour et n = 1 à 85 jours).

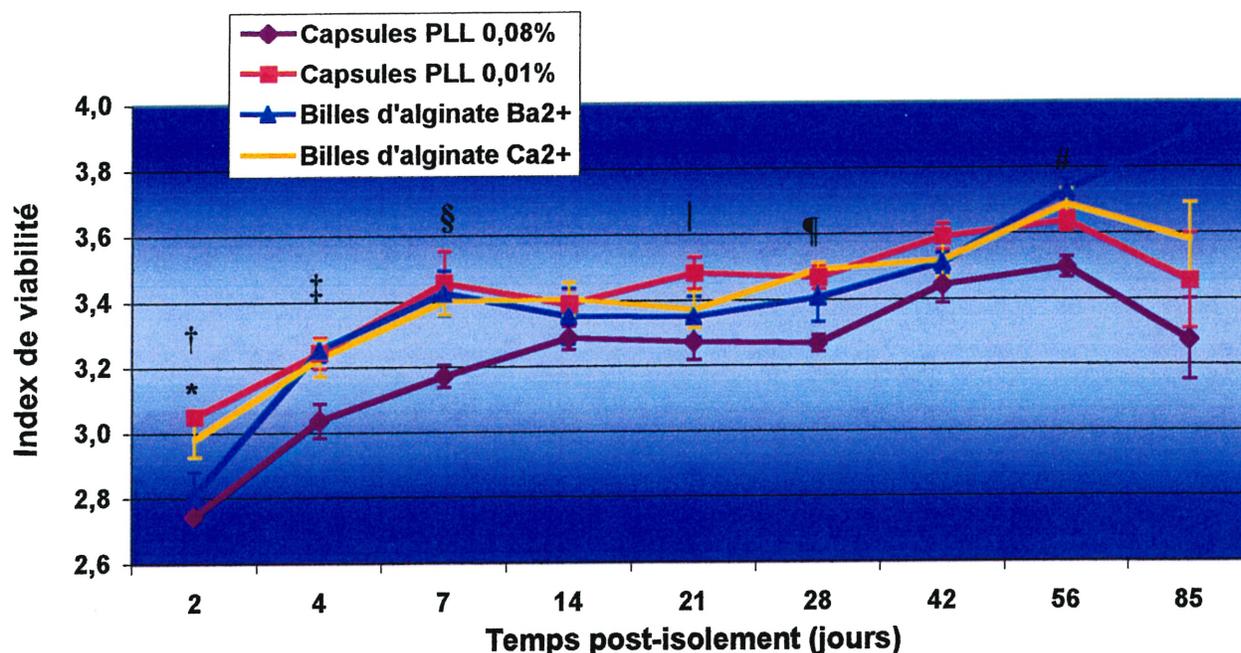


Figure 26. Index de viabilité des îlots en fonction du temps cultivés dans le milieu de culture CMRL. Effet du seuil de perméabilité membranaire sur la viabilité *in vitro* des îlots de Langerhans encapsulés (études en fluorescence). Des îlots de rats Wistar sont isolés et encapsulés dans des microcapsules (PLL 0,01% et PLL 0,08%) ou dans des billes d'alginate (non recouvertes) et mis en culture à 37°C dans du CMRL-1066 (Gibco) contenant 10% de sérum de veau fœtal. Le dénombrement des îlots se fait par microscopie optique et est exprimé en nombre d'îlots équivalents (un îlots équivalent = un îlot de diamètre égal à 150µm). La viabilité est déterminée par acridine orange et iodure de propidium. Les îlots sont ensuite observés en microscopie à fluorescence et analysés selon leur degré de viabilité. L'index de viabilité tient compte du degré de viabilité où 4 = très viable et 0 = non viable. Il n'y a pas de différence significative entre les types d'implants ce qui indique que le seuil de perméabilité membranaire n'a pas d'effet sur le nombre d'îlots équivalents viables. (n = 3 pour tous les implants à tous les temps sauf pour les billes d'alginate de Ba²⁺ ou n = 2 à 42 jour et n = 1 à 85 jours).

* p < 0,05 entre capsules PLL 0,08% et capsules PLL 0,01% ainsi que billes d'alginate Ca²⁺

† p < 0,05 entre capsules PLL 0,01% et billes d'alginate Ba²⁺

‡ p < 0,05 entre capsules PLL 0,08% et capsules PLL 0,01% ainsi que billes d'alginate de Ba²⁺

§ p < 0,05 entre capsules PLL 0,08% et billes d'alginate Ca²⁺ ainsi que Ba²⁺

_ p < 0,05 entre capsules PLL 0,01% et capsules PLL 0,08%

¶ p < 0,01 entre capsules PLL 0,08% et capsules PLL 0,01% ainsi que billes d'alginate Ca²⁺

p < 0,05 entre capsules PLL 0,08% et capsules PLL 0,01% + billes d'alginate Ca²⁺ + Ba²⁺

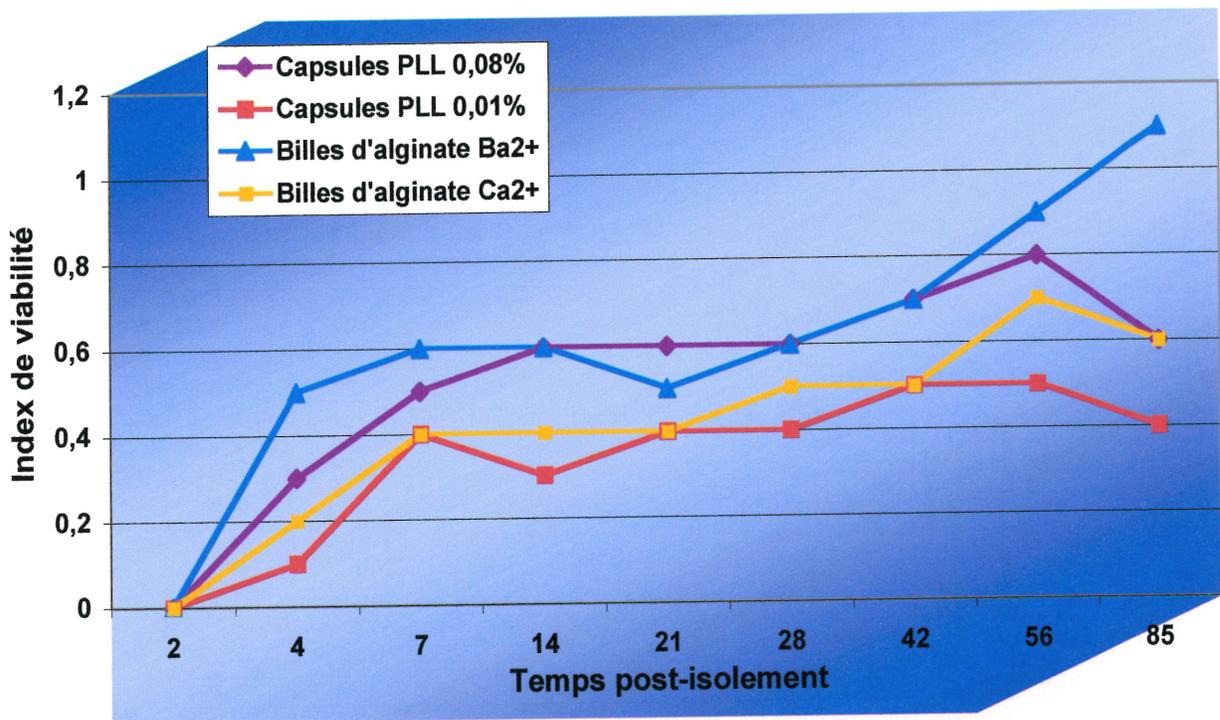


Figure 27. Delta entre le jour 2 et les temps 4, 7, 14, 21, 28, 42, 56 et 85 de l'index de viabilité en fonction du temps des îlots cultivés dans le milieu de culture CMRL. Effet du seuil de perméabilité membranaire sur la viabilité *in vitro* des îlots de Langerhans encapsulés (études en fluorescence). Des îlots de rats Wistar sont isolés et encapsulés dans des microcapsules (PLL 0,01% et PLL 0,08%) ou dans des billes d'alginate (non recouvertes) et mis en culture à 37°C dans du CMRL-1066 (Gibco) contenant 10% de sérum de veau foetal. Le dénombrement des îlots se fait par microscopie optique et est exprimé en nombre d'îlots équivalents (un îlots équivalent = un îlot de diamètre égal à 150µm). La viabilité est déterminée par coloration à l'acridine orange et l'iodure de propidium. Les îlots sont ensuite observés en microscopie à fluorescence et analysés selon leur degré de viabilité. L'index de viabilité tient compte du degré de viabilité où 4 = très viable et 0 = non viable. Le delta tient compte du jour 2, i.e. du jour 1 après l'encapsulation pour voir l'effet du processus d'encapsulation. Il n'y a pas de différence significative entre les types d'implants ce qui indique que le seuil de perméabilité membranaire n'a pas d'effet sur le nombre d'îlots équivalents viables. (n = 3 pour tous les implants à tous les temps sauf pour les billes d'alginate de Ba2+ ou n = 2 à 42 jour et n = 1 à 85 jours).

PLL 0,08% ont un index de viabilité légèrement inférieur aux autres types d'implants. Par contre, les trois autres types d'encapsulation ont le même profil de viabilité. Le même phénomène s'observe à la figure 22 (page, 71) où le delta de l'index est calculé.

3.3.3. CMRL versus RPMI.

Le choix des types d'encapsulation s'est fait après l'étude de perméabilité. L'alginate LVG s'est révélée être le meilleur choix pour poursuivre les études *in vitro*. Nous avons choisi les billes d'alginate non recouvertes de PLL pour les implants ayant un seuil de perméabilité élevé. Toutes les études *in vitro* faites à ce moment utilisaient des implants cultivés dans un milieu appelé RPMI. Ce milieu était caractérisé dans la littérature comme étant le plus approprié pour la culture d'îlots de Langerhans de rats (Anderson, 1978).

Cependant, selon des études préliminaires effectuées, les billes d'alginate de calcium (grand seuil de perméabilité) perdaient leur intégrité dans le milieu RPMI. Celles-ci gonflaient en raison de l'absence de recouvrement de PLL et du manque de calcium dans le milieu. Les billes gonflaient jusqu'à l'explosion et/ou perdaient leurs caractéristiques de sphéricité, s'opacifiaient en raison de la complexion du phosphate avec les billes etc. Donc, on ne pouvait faire l'étude des implants dans le RPMI puisque l'on éliminait dès le départ un implant et du fait même le seuil de perméabilité membranaire élevé. La solution fut de choisir un autre milieu contenant assez de calcium pour ne pas causer d'altérations aux implants, entre autres aux billes d'alginate de calcium.

Un autre milieu déjà utilisé dans le laboratoire était le CMRL. Celui-ci était utilisé pour la culture d'îlots également, mais des îlots de provenance canine. L'essai du CMRL fut concluant, la teneur en calcium était assez élevée pour préserver les billes d'alginate de calcium. L'étude dans le RPMI a quand même été réalisée, mais sans les billes d'alginate (calcium et baryum). Comme pour les études *in vitro* dans le CMRL, l'étude des centres nécrosés a été effectuée (Figure 28, page 79). On peut voir que la proportion d'îlots équivalents encapsulés ayant un centre nécrosé augmente jusqu'à 28 jours. L'augmentation est plus marquée aux temps courts avec les capsules PLL 0,08%. Tandis qu'avec les

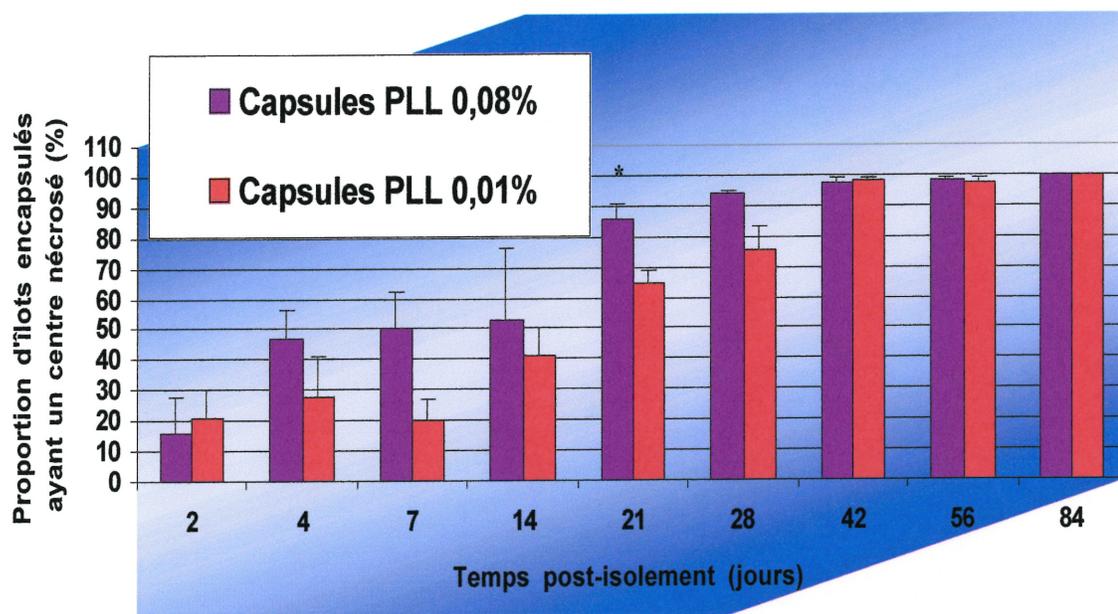


Figure 28 . Proportion d'îlots équivalents encapsulés ayant un centre nécrosé en fonction du temps, cultivés dans le milieu de culture RPMI. Effet du seuil de perméabilité membranaire sur la viabilité *in vitro* des îlots de Langerhans encapsulés (études sur culture fraîche en microscopie optique). Des îlots de rats Wistar sont isolés et encapsulés dans des microcapsules PLL 0,01% et PLL 0,08%, mis en culture à 37°C dans du RPMI-1640 (Gibco) contenant 10% de sérum de veau fœtal. L'apparence de centre nécrosé est évaluée par observation en microscopie optique. Le diamètre des îlots nécrosés est mesuré à l'aide d'un oculaire gradué. On observe que la proportion d'îlots nécrosés augmente en fonction du temps. Ce phénomène suggère que le RPMI n'est pas le milieu idéal afin de cultiver des îlots à long terme. Cependant, la proportion d'îlots nécrosés varie aux temps courts entre les types d'implants, ce qui pourrait indiquer que le seuil de perméabilité membranaire a un effet sur la nécrose des îlots *in vitro*. Mais cette tendance ne se maintient pas. (n=3 pour tous les implants à tout les temps).

* $p < 0,05$ entre capsules PLL 0,01% et capsules PLL 0,08%

capsules PLL 0,01%, l'augmentation des centres nécrosés se fait plus rapidement durant les jours 14, 21 et 28. Les deux types de capsules ont la presque totalité de leurs îlots nécrosés à partir de 42 jours. En comparaison avec le CMRL (Figure 22, page 71), le RPMI a une proportion d'îlots ayant un centre nécrosé beaucoup plus élevée.

L'étude de la viabilité a également été effectuée dans le RPMI, mais encore une fois avec les capsules recouvertes de PLL. Le nombre d'îlots équivalents viables a été analysé en fonction du temps (Figure 29, page 81). On peut voir une diminution du nombre d'îlots viables plus rapidement au départ pour les temps 2 et 4 jours avec les capsules PLL 0,08% pour finalement diminuer de façon constante par la suite. Le même phénomène est observé avec les capsules PLL 0,01%, mais la grande diminution s'effectue entre 4 et 7 jours. En se référant à la figure 25 (page 75), on peut voir que la perte du nombre d'îlots viables se fait majoritairement avant 21 jours et qu'ensuite ce nombre reste constant jusqu'à la fin. Par contre, dans le RPMI, la diminution du nombre d'îlots viables perdure jusqu'à la fin où il n'y a pratiquement plus d'îlots viables.

3.4. Études *in vivo*

Transplantations dans des souris diabétiques

Les résultats des études *in vitro* démontrent qu'il n'y a pas vraiment d'écart entre les différents seuils de perméabilité pour l'analyse de viabilité et l'observation des centres de nécrose. Les études *in vitro* donnent une réponse intéressante, mais non complète du phénomène qui se produit lors de transplantation. Elles tiennent compte de la biocompatibilité de la capsule envers l'îlot. Cependant, il y a aussi la réaction de l'hôte contre la capsule qui joue un grand rôle. C'est pourquoi, à partir de ces *conclusions in vitro* nous avons décidé d'explorer *in vivo* si l'on pouvait observer un effet du seuil de perméabilité membranaire sur la survie et aussi la fonction des îlots transplantés.

L'encapsulation d'îlots de rats Wistar a été effectuée dans les quatre même types d'implants que pour les études *in vitro*, c'est-à-dire les capsules PLL 0,08% 5 minutes, les

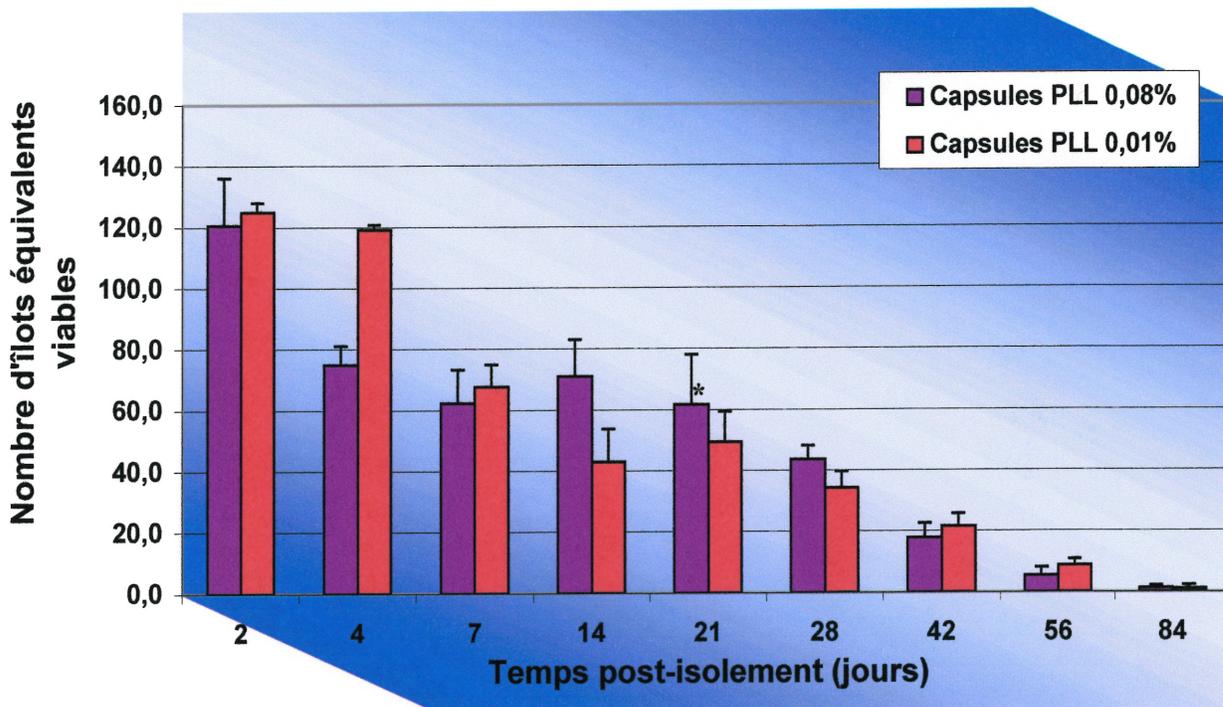


Figure 29. Nombre d'îlots équivalents viables en fonction du temps, cultivés dans le milieu de culture RPMI. Effet du seuil de perméabilité membranaire sur la viabilité *in vitro* des îlots de Langerhans encapsulés (études en fluorescence). Des îlots de rats Wistar sont isolés et encapsulés dans des microcapsules (PLL 0,01% et PLL 0,08%) mis en culture à 37°C dans du RPMI-1640 (Gibco) contenant 10% de sérum de veau fœtal. Le dénombrement des îlots se fait par microscopie optique et est exprimé en nombre d'îlots équivalents (un îlots équivalent = un îlot de diamètre égal à 150µm). La viabilité est déterminée par coloration à l'acridine orange et l'iodure de propidium. Les îlots sont ensuite observés en microscopie à fluorescence et analysés selon leur degré de viabilité. Une diminution du nombre d'îlots équivalents viable est observée en fonction du temps. Il n'y a pas de différence significative entre les types d'implants sauf le temps 21 jour. Tout indique que le seuil de perméabilité membranaire n'a pas d'effet sur le nombre d'îlots équivalents viables. (n = 3 pour tous les implants à tous les temps).

* p < 0,05 entre capsules PLL 0,01% et capsules PLL 0,08%

capsules PLL 0,01% 5 minutes, les billes d'alginate de calcium et les billes d'alginate de baryum.

Une fois encapsulés, les îlots sont mis en culture pour une nuit dans de l' Ultra culture (#12-725F, Bio-Whitaker, Cambrex compagny, Walkersville, Maryland). Le lendemain, les îlots sont transplantés dans des souris *scid* ou normales B57BL/6 ayant préalablement été rendues diabétiques par la streptozotocine (qui détruit les cellules β du pancréas). La glycémie est évaluée plusieurs jours avant la transplantation pour certifier que les animaux sont diabétiques.

Chaque souris transplantée reçoit un implant total qui contient 500 îlots équivalents encapsulés (une capsule peut contenir un îlot ou plus). La glycémie des souris est ensuite prise à tous les jours la semaine suivant la transplantation et ensuite deux fois par semaine jusqu'à la récurrence du diabète.

Les transplantations chez les souris *scid* (Figure 30, page 83) nous permet de voir si les îlots réussissent à survivre, mais également s'ils sont fonctionnels. On peut remarquer qu'il y a moins de récurrence avec les billes (calcium et baryum) qu'avec les capsules. Les capsules PLL 0,01% sont les premières à provoquer la récurrence de l'hyperglycémie chez les souris à presque 40 jours. Par la suite, ce sont les souris transplantées avec les capsules PLL 0,08% où l'observation de la récurrence se fait voir à plus de 50 jours. Ensuite viennent les souris transplantées avec les billes d'alginate de calcium (une sur cinq). La seule mortalité avec les billes au baryum n'est pas une récurrence du diabète puisque cette souris est morte avec une glycémie normale.

Les mêmes observations à propos des récurrences pour les capsules et les billes sont remarquées chez les souris normales C57BL/6, mais la récurrence semble apparaître plus tôt qu'avec les souris *scid* (Figure 31, page 84). En effet, les premières souris démontrant une récurrence du diabète, à moins de 20 jours, sont celles transplantées avec les capsules PLL 0,01%. Les deuxièmes étant également, aux alentours de 20 jours, les souris ayant les capsules PLL 0,08% comme implants. La seule différence se situe au niveau des billes d'alginate. Les billes d'alginate de calcium provoquent des récurrences variées. Deux d'entre

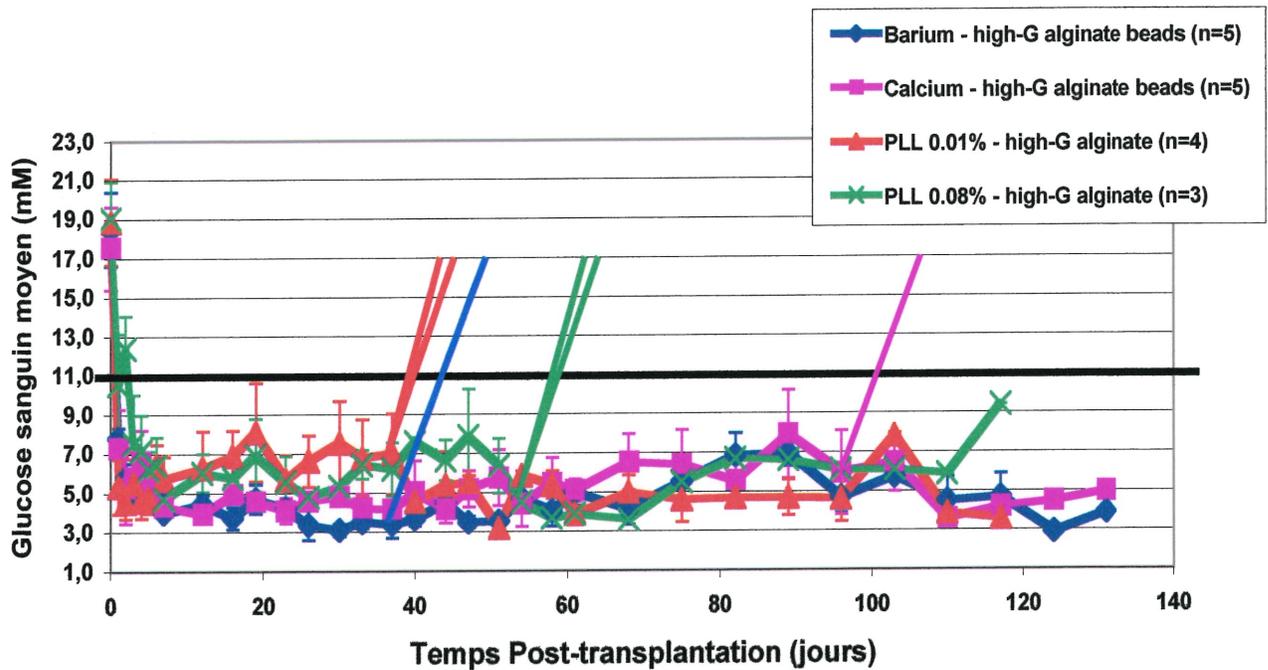


Figure 30 . Xénotransplantations intrapéritonéales de 500 îlots équivalents de rats encapsulés (modèle de masse minimale) dans des souris STZ-*scid*. Effet du seuil de perméabilité membranaire sur la survie *in vivo* des îlots de Langerhans microencapsulés transplantés chez des souris STZ-*scid* diabétiques. Des îlots de rats Wistar sont isolés et encapsulés dans des microcapsules (PLL 0,01% et PLL 0,08%) ou dans des billes d'alginate (non recouvertes) et mis en culture à 37°C dans l'Ultra-Culture (12-725F, Bio-Whitaker, Cambrex compagny, Walkersville, Maryland) contenant 10% de sérum de veau foetal décomplémenté. La glycémie est contrôlée à tous les jours la première semaine et ensuite 2 fois par semaine pendant 2 mois et finalement une fois par semaine jusqu'à la récurrence de la maladie. Les souris transplantées avec des billes d'alginate non recouvertes sont présentement toujours normoglycémiques, ce qui indique qu'une simple barrière empêche l'attaque des îlots par le système immunitaire. On considère une glycémie normale à un taux égal ou inférieur à 11 mM.

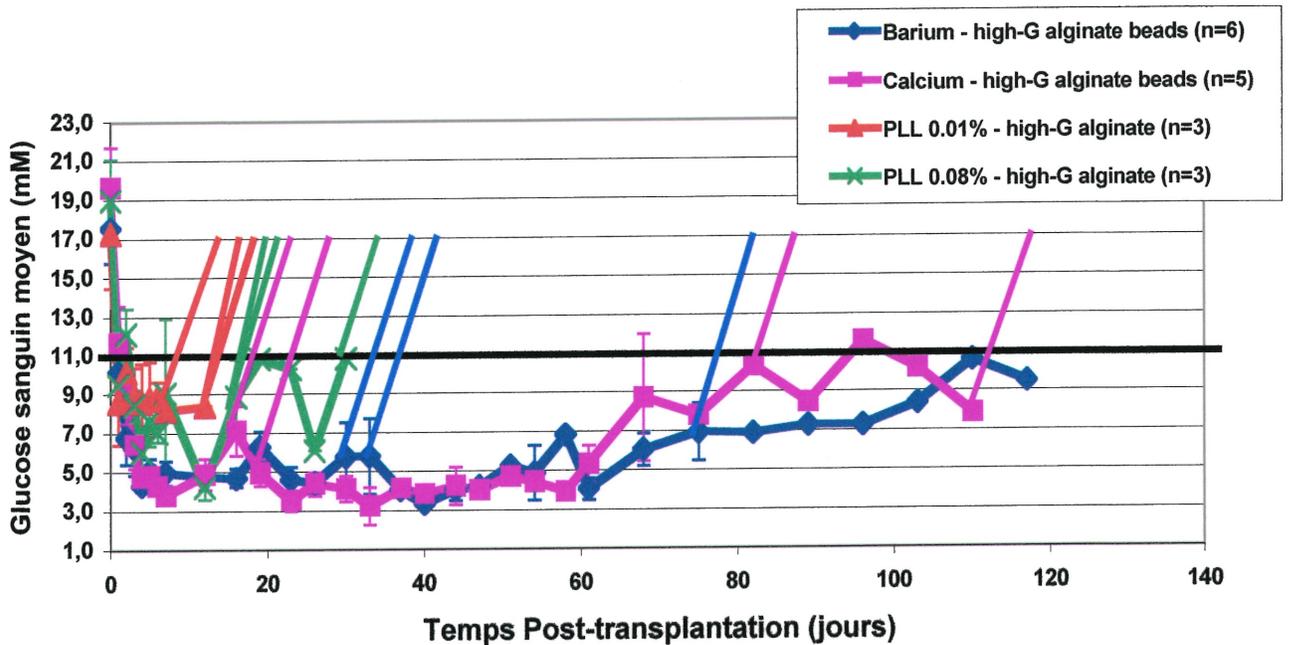


Figure 31 . Xénotransplantations intrapéritonéales de 500 îlots équivalents de rats encapsulés (modèle de masse minimale) dans des souris C57BL/6. Effet du seuil de perméabilité membranaire sur la survie *in vivo* des îlots de Langerhans microencapsulés transplantés chez des souris STZ- C57BL/6 diabétiques. Des îlots de rats Wistar sont isolés et encapsulés dans des microcapsules (PLL 0,01% et PLL 0,08%) ou dans des billes d'alginate (non recouvertes) et mis en culture à 37°C dans l'Ultra-Culture (12-725F, Bio-Whitaker, Cambrex compagny, Walkersville, Maryland) contenant 10% de sérum de veau foetal décomplémenté. La glycémie est contrôlée à tous les jours pour la première semaine, 2 fois par semaine pendant 2 mois et finalement une fois par semaine jusqu'à la récurrence de la maladie. Les souris transplantées avec des billes d'alginate non recouvertes sont présentement toujours normoglycémiques, ce qui indique qu'une simple barrière empêche l'attaque des îlots par le système immunitaire. On ne peut conclure que la récurrence du diabète avec les capsules est essentiellement au seuil de perméabilité membranaire. La PLL serait peut être un facteur à évaluer plus en profondeur. On considère une glycémie normale à un taux égal ou inférieur à 11 mM.

elles sont aux alentours de 20 jours et les deux autres se situent au-delà de 80 jours. Jusqu'à ce jour, quatre des cinq souris transplantées ont récidivé. Pour les billes d'alginate de baryum, deux récidives ont été observées aux environs de 30 jours et une autre à 75 jours. Jusqu'à maintenant trois souris sur six ont récidivé.

4. Discussion

Dans le cadre de la présente étude, nous avons tenté de déterminer l'impact que peut avoir la perméabilité de la microcapsule sur l'efficacité d'un greffon constitué de cellules microencapsulées. Pour ce faire, nous avons d'abord cherché à moduler la perméabilité de la membrane en modifiant certains paramètres de la fabrication de la microcapsule comme la concentration de poly-L-lysine. Après caractérisation des différents types de microcapsules obtenus, nous avons mesuré l'impact de la modulation de la perméabilité sur la survie et la fonction du transplant.

D'entrée de jeu, nous savions que pour que le transplant (ici des îlots de Langerhans) demeure viable tout en étant protégé à l'intérieur d'une microsphère, celle-ci se doit d'être poreuse. En effet, la membrane de la capsule doit permettre l'apport nutritionnel (nutriments, acides aminés, facteurs de croissance, oxygène etc.) dont le transplant a besoin. La membrane doit également affecter au minimum l'élimination des déchets métaboliques produits par le transplant. Pour ces raisons, les pores de la microcapsule doivent être le plus grand possible. Mais en contre partie, ces mêmes pores ne doivent pas être trop grands afin que la microcapsule puisse remplir son rôle de protection contre les médiateurs sériques et cellulaires du système immunitaire de l'hôte. C'est pourquoi, l'optimisation du seuil de perméabilité membranaire représente un enjeu si important.

Paradoxalement, malgré le rôle apparemment simple de ce paramètre, aucune équipe n'a, jusqu'à ce jour, pu déterminer quel serait le seuil de perméabilité optimal pour une microcapsule. Notre étude a donc été élaborée pour tenter de répondre à cette question simple, mais qui pourrait avoir un impact de premier plan sur le succès de la transplantation de cellules microencapsulées. Cette interrogation ne touche qu'une partie d'un immense projet qui consiste à établir la formulation optimale pour la réussite de la transplantation de cellules microencapsulées. La composition chimique de la microcapsule, la pureté de ses constituants, les méthodes de recouvrement, ainsi que les substances d'enrobage sont autant de facteurs pouvant affecter la réussite de l'entreprise au même niveau que le seuil de perméabilité. C'est pourquoi chaque protocole de microencapsulation devrait être

caractérisé et analysé sous plusieurs aspects pour pouvoir ainsi espérer une réussite de la transplantation d'îlots microencapsulés.

Notre étude s'est donc déroulée en trois temps. D'abord, nous avons réalisé une étude de certains paramètres physico-chimiques de la microcapsule afin de trouver des conditions permettant la préparation de microcapsules possédant des seuils de perméabilité préétablis. Les formulations retenues devaient de plus assurer le maintien d'une bonne résistance mécanique pour les microcapsules. Par la suite, nous avons réalisé une étude *in vitro* afin de déterminer l'impact de la modulation de la perméabilité sur la survie et la fonction des îlots microencapsulés. Enfin, nous avons étudié l'efficacité des différents types de microcapsules dans un contexte de transplantation *in vivo*. Cette dernière série d'expériences devait nous permettre de répondre à notre question initiale : le seuil de perméabilité de la microcapsule influence-t-il l'efficacité et la survie du greffon?

4.1. Étude de la résistance et de la perméabilité des microcapsules

La résistance, comme plusieurs autres paramètres, a une portée sur la réussite de la transplantation d'îlots microencapsulés. La stabilité et la durabilité des microcapsules sont étroitement liées à la résistance de celles-ci au stress physique qui leur est imposé. Une résistance adéquate améliorera donc les chances de réussite d'une transplantation. Les résultats de notre étude démontrent que tant la concentration de poly-L-lysine que le temps d'incubation dans cette dernière ont une incidence directe sur la résistance mécanique de la microcapsule. En effet, nous avons démontré dans cette étude qu'il existe une corrélation entre la concentration de la solution de PLL utilisée et la résistance des microcapsules. Il en va de même pour le temps d'incubation dans la solution de PLL. Ces résultats sont conformes à ceux obtenus dans des études antérieures à la nôtre (Ma, 1991 et 1994; Leblond, 1996). On note que l'utilisation d'une concentration de PLL inférieure à 0.01% réduit drastiquement la résistance des microcapsules qui sont alors très fragiles et inutilisables pour des fins de transplantation. Le pourcentage de gonflement c'est-à-dire la différence entre la taille de la capsule finale et celle de la bille d'origine est également relié à la résistance. Nous avons, en effet, noté que l'augmentation du taux de gonflement

s'accompagne d'une diminution importante de la résistance mécanique. Nous avons observé un taux élevé de rupture spontanée dans les préparations de capsules ayant un gonflement membranaire élevé corroboré par plusieurs équipes (Darrabie, 2001).

La composition en acide uronique de l'alginate utilisée pour la préparation des billes initiales a également un impact sur la résistance. Nos résultats démontrent qu'à la même concentration de PLL et au même temps d'incubation, l'alginate High G produit des capsules présentant une plus grande résistance que l'alginate High M. Nos résultats en ce sens, corroborent ceux obtenus au préalable par d'autres groupes (Soon-Shiong, 1994; Beate, 1996; De Vos, 1997_b et 2002_{a,b}).

Le test de stress mécanique utilisé dans cette étude s'avère une méthode simple et précise pour évaluer la résistance des microcapsules à un stress environnemental. Bien que les conditions utilisées durant le test soient beaucoup plus drastiques que celles rencontrées *in vivo*, cette méthode permet de départager rapidement les différents types de microcapsules selon leur résistance au test. L'étude de la résistance des microcapsules pourrait cependant être complétée par une nouvelle méthode évaluant la stabilité des microcapsules par un test de pression osmotique imitant les conditions rencontrées *in vivo* (Van Raamsdonk, 2001).

Quant au seuil de perméabilité, la chromatographie par exclusion de taille inversée demeure une des méthodes des plus précises offrant une évaluation assez complète de la perméabilité (Stewart, 1993; Brissova, 1996; Powers, 1997; Robitaille, 2000). Elle permet en effet l'utilisation de différents types de marqueurs (protéines ou autres) sans nécessiter d'appareillage sophistiqué. Une technique complémentaire à la chromatographie d'exclusion de taille inversée comme celle décrite par Brissova pourrait être utile pour vérifier les résultats obtenus (Brissova, 1998). Cette technique est basée sur la diffusion de protéines. La pénétration des protéines est ensuite révélée par immunocytochimie ou quantifiée par réduction de la protéine dans le milieu (spectrophotométrie). L'étude de la résistance et de la perméabilité nous a permis de cibler des microcapsules ayant des seuils de perméabilité membranaires distincts et possédant une résistance convenable.

Selon les résultats obtenus, on peut conclure que la résistance des microcapsules est améliorée lorsque l'on utilise l'alginate purifié HG, alors que la perméabilité se trouve augmentée. Dupuy a prouvé que l'alginate HM se lie plus fortement à la PLL que l'alginate HG (Dupuy, 1994). L'augmentation de la perméabilité avec l'alginate HG serait donc causé par une moins bonne liaison entre l'alginate HG et la PLL, ce qui aurait comme effet de donné un treillis moléculaire plus lâche. La présence du baryum comme agent gélifiant diminue la perméabilité des billes d'alginate HG non recouvertes.

Cette étude a dévoilé que la modulation de la perméabilité constitue un défi de taille. Elle confirme également le fait que les paramètres des microcapsules sont très étroitement liés, c'est-à-dire que l'augmentation de la perméabilité fragilise énormément les microcapsules et que l'augmentation de la résistance diminue la perméabilité des microcapsules. Notre plan d'étude a donc du être révisé puisqu'avec les méthodes prévues initialement, seulement deux seuils de perméabilité différents ont pu être obtenus. Les billes d'alginate non recouvertes ont été impliquées dans l'étude afin de pallier à ce manque. Cependant, l'introduction d'un autre cation divalent, le baryum, ajoute une autre variable qui peut biaiser notre étude. La liaison entre l'alginate se fait différemment en présence de baryum ou de calcium. Des études de liaisons physico-chimiques devront être faites pour analyser les différences potentielles entre l'emploi du baryum et du calcium pour conclure sur le sujet.

D'autres solutions seraient intéressantes à étudier ultérieurement pour moduler la perméabilité. Un exemple serait de jouer avec la concentration d'alginate formant la bille de départ lors de la fabrication. Mais un changement de concentration à cette étape implique énormément de mise au point puisque cette étape est cruciale. De nombreuses imperfections apparaissent au niveau des capsules suite à un changement de concentration d'alginate comme par exemple la perte de sphéricité (billes beaucoup plus ovales), l'apparition de billes possédant une malformation conique, etc (Hallé, 1994). Une concentration élevée implique un alginate très visqueux et la stérilisation de celle-ci ne peut alors se faire par filtration (Van Schilfgaarde, 1999). La stérilité est un facteur primordial dans la réussite de la transplantation, l'augmentation de la concentration et du fait même de la viscosité de l'alginate est donc limitée par ce principe. C'est pourquoi il a été établi que

la concentration recommandée d'alginate pour la fabrication de microcapsules se situe entre 1-2% (Desai, 2000).

Une autre possibilité serait d'utiliser un biomatériau qui serait plus solide tout en étant plus poreux, mais on recommence du début pour la mise au point de la fabrication, pour le recouvrement de la bille d'alginate etc. L'ajout d'une molécule aidant à augmenter la résistance (liens covalents au lieu de liens électrostatiques) sans interférer avec la perméabilité serait également très intéressant. En ce sens, on note plusieurs molécules à l'étude comme des co-polymères, exemple l'acrylate (Iwata, 1989) ou le methacrylate (Crooks, 1990). Des modifications de la capsule d'alginate standard font aussi objet d'analyse comme le remplacement de la PLL par le glycol chitosan (Sakai, 2000), l'inclusion de polyéthylène glycol (PEG), d'agents de liaison comme la carbodiimide (EDC) et la glutaraldehyde (Ga) (Chandy, 1999). Des polymères photosensibles sont également à l'étude (Dupuy, 1988, Chandy, 1999; Chang, 2002). De nouvelles et prometteuses méthodes d'encapsulation basées sur la technique de Lim et Sun d'alginate-PLL-alginate (APA) (Lim, 1980) ont vu le jour. Notamment, la conception d'une microcapsule multicouche (Pommersheim, 1998). Donc, plusieurs études ont été faites et sont en cours sur la perméabilité, mais il reste encore beaucoup de travail à faire.

4.2. Études *in vitro*

Après l'étude de perméabilité qui nous a permis de déterminer les conditions pour préparer des capsules ayant chacune l'un des trois seuils de perméabilité préétablis, nous avons poursuivi avec les études *in vitro*. Cette étape devait nous permettre de répondre à la question: Est-ce que le seuil de perméabilité membranaire a un effet sur la survie des îlots de Langerhans dans un environnement non-hostile?

Plusieurs auteurs ont affirmé que cette question est encore aujourd'hui sans réponse (Powers, 1997; Schneider, 2001). L'ensemble des résultats des études *in vitro* ne démontre pas de façon claire et précise l'effet de différents seuils de perméabilité membranaire sur la survie des îlots. Il n'existe en fait aucune étude dans la littérature confirmant ou infirmant

ces résultats. Plusieurs articles démontrent la perméabilité ou l'imperméabilité à certaines molécules, comme aux IgG par exemple, d'un seul type de capsule *in vitro* (Gaserod, 1999; Desai, 2000; Sakai, 2000; Lahooti, 2000). Aucun groupe n'a cependant comparé divers seuils de perméabilité avec un seul type d'encapsulation.

Même si on ne voit aucune différence entre les différents seuils de perméabilité pour les études *in vitro*, certaines informations peuvent cependant être tirées de nos résultats et être très utiles pour l'amélioration des conditions entourant la transplantation. Tout d'abord, l'étude des îlots ayant des centres nécrosés démontre que ce sont les îlots de plus grand diamètre qui nécrosent principalement. Ce phénomène peut s'expliquer par le manque d'oxygène au centre de l'îlot. De nombreuses études ont fait mention de ce phénomène qui a pour conséquence l'apparition d'une zone de nécrose au cœur de l'îlot (Dionne, 1989; Schrezenmeir, 1992; Dionne, 1993; Rafael, 1999). On note toutefois que la proportion d'îlots équivalents encapsulés ayant un centre nécrosé se stabilise dans le temps à partir de 21 jours. Ceci s'explique par le fait que tous les îlots de diamètre élevé sont touchés par la nécrose et que les petits îlots n'ayant pas été atteints restent sains par la suite. Ce phénomène de nécrose est important puisqu'il aura des conséquences graves *in vivo*. En effet, la limitation de la diffusion d'oxygène peut causer l'atrophie des tissus ou la nécrose ce qui affectera la viabilité du greffon (Dionne, 1993). La viabilité aura des répercussions directes sur la sécrétion d'insuline et la normalisation de la glycémie (Dionne, 1993).

Ensuite, on observe une perte du nombre d'îlots, une diminution de la masse et une diminution de la viabilité des îlots. Ces phénomènes se stabilisent environ au jour 21. Ces diminutions sont certainement reliées au phénomène de nécrose. On peut supposer que la nécrose des îlots de grande taille affecte la masse de tissu total encapsulé. La diminution de la viabilité est inversement proportionnelle à la nécrose. Et la perte du nombre d'îlots peut s'expliquer par la mort et/ou la dégradation des îlots affectés par la nécrose. Aucune publication ne mentionne l'apparition de ces phénomènes dans une culture de si longue durée. La cryopréservation est préférée à la culture à long terme en raison des risques d'infection (Clayton, 1996). Toutefois, il a été publié que les conditions optimales pour la culture d'îlots ne sont pas très bien définies en terme de nutriments, de perméabilité membranaire optimale etc. (Clayton, 1996).

Les résultats concernant la viabilité et les centres nécrosés des îlots cultivés dans deux différents milieux soit le RPMI et le CMRL démontrent que le RPMI s'avère inadéquat pour la culture d'îlots de rats microencapsulés. Anderson fut le premier à conclure que le RPMI était le milieu de culture de choix pour ces îlots (Anderson, 1978). Cependant, les travaux Davalli *et al.* reportent que seulement le TCM 199 augmente la sécrétion d'insuline et que la culture d'îlots dans le RPMI ou le CMRL diminue cette sécrétion (Davalli, 1992). Ils proposent même que la haute teneur en glucose des milieux Ham's F12 et RPMI peut être toxique pour les îlots (Davalli, 1992). D'autres groupes font mention du fait que le choix du milieu de culture des îlots devrait dépendre de la provenance de ceux-ci. Ainsi, le meilleur milieu pour la culture d'îlots de rats est Iscove's MEM (James, 1994). Toutefois, ces études n'ont pas été prolongées à 85 jours.

Un autre facteur influençant la survie en culture des îlots est la température. Il serait bon dans les prochaines études de déterminer la différence entre des îlots cultivés à 37°C et à 22°C ou 24°C. En effet, des études ont démontré qu'à 37°C les îlots se dissociaient et se désintégraient. Par contre, à 27°C, la viabilité était meilleure et l'intégrité des îlots conservée (Tai, 1994). Un autre groupe a démontré qu'à 22°C la viabilité était meilleure qu'à 37°C (Lakey, 1994). La co-culture avec d'autres cellules, qui sécrètent des facteurs essentiels à la survie des îlots, pourrait également améliorer la culture *in vitro*. Des résultats en ce sens ont déjà été publiés (Metrakos, 1994).

Finalement, les études *in vitro* ne démontrent aucun effet du seuil de perméabilité membranaire sur la survie en culture des îlots. Donc, peu importe le seuil de perméabilité membranaire, les îlots survivent bien *in vitro*. La sécrétion d'insuline par ces différents implants serait un facteur primordial à analyser pour compléter l'étude. C'est pourquoi l'étude *in vivo* a été entreprise.

4.3. Études *in vivo*

Les résultats *in vitro* n'ont pas démontré de différence flagrante entre les quatre types d'implants. L'analyse du nombre de centres nécrosés, de leur diamètre ainsi que l'étude de la viabilité n'ont pas révélé d'effet du seuil de perméabilité membranaire sur la survie. Les résultats des transplantations *in vivo* démontrent que les capsules (PLL 0,01% et 0,08%) provoquent une récurrence plus précoce du diabète que les billes d'alginate non recouvertes. On observe que les capsules PLL 0,01% sont les premières à entraîner la récurrence suivie des capsules PLL 0,08%. Pour les billes, le nombre de récurrence est moins élevé et s'effectue plus tardivement. Plusieurs facteurs peuvent expliquer cette observation. Le seuil de perméabilité membranaire peut avoir un effet sur la survie du greffon, mais la fragilité des capsules, la stabilité chimique et la présence de la PLL peuvent également jouer des rôles. La fragilité des capsules PLL 0,01% serait possiblement la cause de leurs récurrences. On observe un pourcentage de bris plus élevé pour cet implant (88,7%) que pour les autres. Pour les capsules PLL 0,08%, la cause de la récurrence est un peu plus difficile à établir. Mais la présence de la PLL apparaît une des causes les plus probables puisque les billes procurent une glycémie normale plus longtemps. Plusieurs études dénotent l'absence de réaction cellulaire au pourtour d'un transplant constitué de microcapsules vides (Weber, 1990 et 1994_a; Ricker, 1986; Lanza, 1995; Soon-Shiong, 1992). Par contre, d'autres groupes observent une réaction autour de leurs capsules vides transplantées (Mazaheri, 1991, Gin, 1992). La contamination avec des endotoxines, l'impureté des composants et l'emploi d'alginate HM contribueraient au manque de biocompatibilité de ces microcapsules (Soon-Shiong, 1991). En effet, plusieurs études qualifient l'alginate HM comme étant plus immunogénique que l'alginate HG (Soon-Shiong, 1999; Kulseng, 1999). Elle serait également moins stable *in vivo* que l'alginate HG (Cochrum, 1995; De Vos, 1997_{ab}).

Le choix de l'alginate HG purifié s'est fait dans notre étude pour une raison de stabilité et de résistance des microcapsules. La pureté de l'alginate joue également un rôle primordial dans la réaction contre le transplant (Lacik, 2001; De Vos, 1993, 1994 et 1997_{ab}; Van Schilfgaarde, 1999). La présence d'imperfections au niveau de la membrane de la

microcapsule peut également causer une stimulation de la réaction immunitaire (Weber, 1999; Chang, 1992; De Vos, 1994; Van Schilfgaarde, 1999).

La présence de PLL dans la membrane de la capsule peut également avoir un effet négatif sur la transplantation. La PLL recouvrant les billes d'alginate, se trouve à son tour recouverte d'une couche d'alginate diluée. Cependant, on ne sait pas si ce recouvrement est uniforme et si la PLL est entièrement recouverte par l'alginate. Si le recouvrement de la PLL est inadéquat et/ou partiel, des petits bouts de PLL peuvent être reconnus par le système immunitaire de l'hôte. Comme la PLL n'est pas du tout biocompatible, cette reconnaissance pourrait entraîner une réaction en chaîne du système immunitaire du receveur ayant pour but l'attaque et la destruction de la capsule. À ce moment, on assiste à l'attaque de la capsule et à sa destruction par les cellules de l'hôte, ce qui résulte également dans la destruction de l'îlot. La réaction provoquée par la PLL peut aussi conduire à l'agglomération des cellules du système immunitaire autour des capsules dans le but d'isoler du corps étranger pour ensuite prévoir sa destruction à venir, ce qui a pour conséquence de boucher entièrement les pores de la capsule et d'interrompre toute diffusion entre l'îlot et le milieu. De plus, on sait que la PLL est reconnue pour augmenter la réaction inflammatoire (Clayton, 1991; De Vos, 2002).

Les résultats en ce qui concerne les billes d'alginate non recouvertes sont très prometteurs. En effet, les souris transplantées avec des billes d'alginate de baryum permettent de rétablir une glycémie normale et ce pendant plus de 120 jours. Ces souris sont toujours normoglycémiques jusqu'à ce jour. Les expériences sont toujours en cours pour déterminer la durée de survie du greffon. Des évaluations seront faites sur les microcapsules récupérées suite à la récurrence du diabète. Nos résultats rejoignent ceux de Duvivier-Kali en démontrant que de simples billes d'alginate de baryum permettent la protection du greffon transplanté (Duvivier-Kali, 2001). Le baryum est reconnu pour augmenter la solidité de la membrane (Van Raamsdonk, 2001). C'est sans doute ce qui explique que nous observions une récurrence plus précoce pour les greffons encapsulés dans des billes d'alginate de calcium. Le haut degré de pureté de l'alginate et la réduction du niveau d'endotoxines jouent également un rôle dans le succès de ces transplantations (Duvivier-Kali, 2001). Ces résultats mettent en doute la nécessité de la présence de la PLL. Plusieurs chercheurs se posent présentement de nombreuses questions sur la PLL et sa pertinence dans la fabrication de microcapsules. Les

résultats de cette étude appuient l'hypothèse selon laquelle la PLL ne serait pas nécessaire à la réussite d'une allogreffe d'îlots microencapsulés.

À la lumière des résultats de nos expériences *in vivo* de transplantation, on ne peut conclure quel seuil de perméabilité membranaire est le plus approprié pour la survie et la fonction des îlots microencapsulés puisque trop d'autres facteurs, comme une réaction de l'hôte contre la PLL, peuvent entrer en ligne de compte dans l'explication de l'échec de certains types de greffons. Cependant, nos résultats suggèrent que bien que le seuil de perméabilité des billes de baryum permette le passage de plusieurs cytokines, la barrière que crée cette membrane entre l'îlot et l'hôte suffit à protéger le greffon (Duvivier-Kali, 2001). Ils appuient également l'hypothèse que l'utilisation de la PLL joue un rôle dans la limitation de la durée de normoglycémie.

5. Conclusion

L'enjeu de cette étude était de déterminer le seuil de perméabilité membranaire idéal des microcapsules afin d'obtenir la meilleure survie possible tout en maintenant la qualité fonctionnelle des îlots de Langerhans. Différentes microcapsules ont été fabriquées et évaluées afin d'obtenir des implants ayant une résistance adéquate et des seuils de perméabilité différents. Quatre conditions d'encapsulation ont été établies afin d'étudier trois différents seuils de perméabilité membranaire. Ainsi les îlots de rats Wistar ont été encapsulés soit dans des capsules (PLL 0.01% et PLL 0.08%) ou dans des billes d'alginate (Ba^{2+} et Ca^{2+}). Les résultats des études *in vitro* suggèrent que le seuil de perméabilité membranaire n'a pas d'effet sur la survie de l'îlot. Une observation importante des études *in vitro* est la perte importante du nombre d'îlots durant les 21 premiers jours. Cette perte est d'autant plus importante du fait que la majorité des îlots atteints sont ceux de plus grand diamètre. Une explication possible de cette perte d'îlots de grande taille serait le manque de diffusion de l'oxygène et des nutriments vers le centre de l'îlot ce qui causerait sa dégradation et du fait même l'apparition de centre nécrosé. Cette observation a des répercussions sur les transplantations *in vivo* puisque, pour avoir un nombre suffisant d'îlots viables afin d'assurer une normoglycémie il faut contourner cette perte en transplantant un nombre supérieur d'îlots.

Les études *in vitro* ont également permis de comparer deux milieux de culture. Le RPMI était reconnu dans le domaine pour être le milieu de choix pour la culture des îlots de Langerhans de rats. Toute fois, sa faible teneur en calcium ne permet pas de garder l'intégrité des billes d'alginate de calcium. La comparaison du RPMI avec le CMRL a établi que le CMRL permet de garder une viabilité acceptable des îlots plus longtemps qu'avec le RPMI. Ce résultat est inattendu, puisque le CMRL est plus utilisé pour les îlots de chien, alors que le RPMI était préféré pour le rat.

Les résultats des transplantations *in vivo* ne permettent pas de déterminer de façon certaine si le seuil de perméabilité membranaire a un effet sur la survie du greffon. En effet, les résultats pourraient s'expliquer par l'effet de la PLL sur la biocompatibilité des microcapsules. Une autre explication pourrait être un effet toxique direct de la PLL sur la survie des îlots. Mais les résultats des études *in vitro* ne corroborent pas cette hypothèse. La stabilité chimique aurait également un rôle dans la réussite puisque les billes d'alginate de calcium provoquent une récurrence du diabète avant celles faites avec du baryum. Il est connu que le baryum lie plus fortement l'alginate que le calcium. Donc la fragilité de l'implant aurait peut-être un rôle à jouer, tout comme la biocompatibilité, dans la réussite de la transplantation.

Ainsi, à la lumière des résultats obtenus dans cette recherche, une étude approfondie de l'implication de la PLL dans la réaction contre la microcapsule devrait être effectuée dans un futur rapproché. Il serait également intéressant de voir si la présence de la PLL est justifiée ou plutôt nuisible.

Il reste encore de nombreuses facettes à explorer pour faire le portrait global de la microencapsulation. Cependant, ces efforts sont justifiés, puisque la réussite d'une transplantation microencapsulée ne sera pas seulement bénéfique pour les patients atteints de diabète mais pourra être applicable dans de nombreux domaines où le manque de donneurs est difficile à combler.

Sources documentaires

Alejandro R., Mintz D.H., Noel J., Latif Z., Koh N., Russell E., Miller J.

Islet cell transplantation in type 1 diabetes mellitus.

Transplant. Proc., 19:2359. 1987

American Association of Diabetes Educators.

Position statement: education for continuous subcutaneous insulin infusion pump users.

Diabetes Educ., 13:10. 1986.

Andersson, A.

Isolated mouse pancreatic islets in culture : Effects of serum and different culture media on the insulin production of the islets.

Diabetologia, 14 : 397-404. 1978.

Aoki TT, Grecu EO, Arcangeli MA, Benbarka MM, Prescott P, Ahn JH.

Chronic intermittent intravenous insulin therapy: a new frontier in diabetes therapy.

Diabetes Technol. Ther., 3(1) : 111-23. 2001.

Appels, B., V. Burkart, M. Kantwerk-Funke.

Spontaneous cytotoxicity of macrophages against pancreatic islet cells.

J. Immunol., 142: 3803-3808. 1989.

Baekkeskov, S., H. Jan-Aanstoot, S. Christgau.

Identification of the 64K autoantigen in insulin-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.

Beate, T., Per, B., Terje, E., Olav, S., Patrick, S.S., Gudmund, S.B.

Alginate polycation microcapsules : II. Some functional properties.

Biomaterials, 17 : 1069-1079. 1996.

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

Syngeneic transfer of autoimmune diabetes from diabetic NOD mice to healthy neonates: requirement for both L3T4+ and Lyt2+ T cells.

J. Exp. Med., 166 : 823-832. 1987.

Bibergeil H, Huttl I, Felsing W.

36 Months continuous subcutaneous insulin infusion (CSII) in insulin dependent diabetes (IDDM) influence on early stages of retinopathy, nephropathy and neuropathy: psychological analysis.

Exp. Clin. Endocrinol., 90 : 51-61. 1987.

Bischof F, Meterhoff C, Pfeiffer EF.

Quality control of intensified insulin therapy: Hb_{A1} versus blood glucose.

Horm. Metab. Res., 26 : 574-578. 1994.

Bode BW, Steed DR, Davidson PC.

Reduction in severe hypoglycemia with long-term continuous subcutaneous insulin infusion in type 1 diabetes.

Diabetes Care, 19 : 324-327. 1996.

Boker, A., Rothenberg, L., Hernandez, C., Kenyon, N.S., Ricordi, C. and Alejandro, R.

Human Islet Transplantation: Update

World Journal of Surgery, 25 : 481-6. 2001.

Bonifacio, E., V. Lampasona, S. Genovese.

Identification of protein tyrosine phosphatase-like IA-2 (islet cell antigen 512) as the insulin dependent diabetes-related 37/40K autoantigen and a target of islet-cell antibodies. *J. Immunol.*, 155: 5419-5426. 1995.

Bretzel, R.G., Flesch, B.K., Brennenstuhl, G., Greiner, I., Hering, B.J., Woehrle, M., Federlin, K.

Rat pancreatic islet pretreatment with anti-MHC class II monoclonal antibodies and culture: in vitro MLIC test response does not predict islet allograft survival. *Acta Diabetol.*, 30 : 49-56. 1993.

Bridgett, M., M. Cetkovic-Cvrlje, R. ORourke, et al.

Differential protection in two transgenic lines of NOD/Lt mice hyperexpressing the autoantigen GAD65 in pancreatic beta-cells. *Diabetes*, 47 : 1848-1856. 1998.

Brissova, Lacik, I., Powers, A.C., Anilkumar, A.V. and Wang, T.

Control and measurement of permeability for design of microcapsule cell delivery system. *J. Biomed. Mater. Res.*, 39 : 61-70. 1998.

Brissova, M., Petro, M., Lacik, I., Powers, A.C. and Wang, T.

Evaluation of microcapsule permeability via inverse size exclusion chromatography. *Analytical Biochemistry*, 242 : 104-111. 1996.

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

Insulins.

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

Calfiore, R.

Perspectives in pancreatic and islets cell transplantation for the therapy of IDDM. *Diabetes Care*, 20 : 889-896. 1997.

Chandy, T., Mooradian, D.L. and Rao, G.H.R.

Evaluation of modified alginate-chitosan-polyethylene glycol microcapsules for cell encapsulation.

Artificial Organs, 23 : 894-903. 1999.

Chang, S.J., Lee, C.H., Hsu, C.Y., Wang, Y.J.

Biocompatible microcapsules with enhanced mechanical strength.

J. Biomed. Mater. Res., 59 : 118-126. 2002.

Chang, T.

Artificial cells in immobilization biotechnology.

Artif. Cells & Immob. Biotechnol., 20 : 1121-1143. 1992.

Chang, T.M.S.

Applications of artificial cell in medicine.

Biomat. Artif. Cells Artif. Organs, 15 : 1-20. 1987.

Chang, T.M.S.

Semipermeable microcapsules.

Science, 146 : 524-525. 1964.

Chang, T.M.S., MacIntosh, F.C. and Mason, S.G.

Semipermeable aqueous microcapsules. I. Preparation and properties.

Can. J. Physiol. Pharmacol., 44 : 115-128. 1966.

Chantelau E, Lange G, Sonnenberg GE, et al.

Acute cutaneous complications and catheter needle colonization during insulin-pump treatment.

Diabetes Care, 10 : 478-482. 1987.

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. and Lauris, V.

Beta cell culture on synthetic capillaries : An artificial endocrine pancreas.

Science, 187 : 847-848. 1975_a.

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_b.

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

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.

Clayton, H.A. and London, N.J.M

Survival and function of islets during culture.

Cell Transplantation, 5 : 1-12. 1996.

Clayton, H.A., London, N.J.M., Colloby, P.S., Bell, P.R.F., James, R.F.L.

The effect of capsule composition on the biocompatibility of alginate-poly-L-lysine capsules.

J. Microencapsulation, 8 : 221-33. 1991.

Cochrum, K., Jemtrud, S. and Dorian, R.

Successful xenografts in mice with microencapsulated rat and dog islets.

Transplant. Proc., 27 : 3297-3301. 1995.

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

Microencapsulated islet grafts in the BB/E rat : a possible role for cytokines in graft failure.
Diabetol., 35 : 231-237. 1992.

Colton, C.K.

Implantable biohybrid artificial organs.
Cell Transplantation, 4 : 415-436. 1995.

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

Bioengineering in the development of the hybrid artificial pancreas.
Journal of Biomechanical Engineering, 113 : 152-170. 1991.

Corbett, J.A. & M.L. McDaniel.

Does nitric oxide mediate autoimmune destruction of β cells? Possible therapeutic interventions in IDDM.
Diabetes, 41 : 897-903. 1992.

Crooks, C.A., Douglas, J.A., Broughton, R.L. and Sefton, M.V.

Microencapsulation of mammalian cells in a HEMA-MMA copolymer : effects on capsule morphology and permeability.
J. Biomed. Mater. Res., 24 : 1241-1262. 1990.

Cruise, G.M., Hegre, O.D., Lamberti, F.V. *et al.*

In vitro and in vivo performance of porcine islets encapsulated in interfacially photopolymerized poly(ethylene glycol) diacrylate membranes.
Cell Transplant., 8 : 293-306. 1999.

Dahl-Jorgensen K, Bjoro T, Kierulf P, et al.

Long-term glycemic control and kidney function in insulin-dependent diabetes mellitus.
Kidney Int., 41 : 920-923. 1992.

Darrabie, M., Freeman, B.K., Kendall, W.F., Hobbs, J.H.A., Opara, E.C.
Durability of sodium sulfate-treated polylysine-alginate microcapsules.
J. Biomed. Mater. Res., 54 : 396-399. 2001.

Darquy, S., Chicheportiche, D., Capron, F., Boitard, C., and Reach, G.
Comparative study of microencapsulated rat islets implanted in different diabetic models in mice.
Horm. Metab. Res., Suppl. 25 : 209-213. 1990.

Darquy, S. and Reach, G.
Immunoisolation of pancreatic beta cells by microencapsulation : an in vitro study.
Diabetol., 28 : 776-780. 1985.

Darquy, S., Pueyo, M.E., Capron, F. and Reach, G.
Complement activation by alginate-polylysine microcapsules used for islet transplantation.
Artif. Organs, 18 : 898-903. 1994.

Davalli, A.M., Bertuzzi, F., Socci, C., Scaglia, L., Gavazzi, F., Berra, C., Ferrari, P.,
DiCarlo, V., Pontiroli, A.E., Pozza, G.
In vitro function of adult pig islets : Effect of culture in different media.
Transplant. Proc., 24 : 2794-2795. 1992.

David E.R. Sutherland, M.D., Rainer W.G. Gruessner, M.D., and Angelika C. Gruessner,
Ph.D.
Pancreas Transplantation for Treatment of Diabetes Mellitus
World Journal of Surgery, 25 : 487-96. 2001.

Dawson, R.M., Broughton, R.L., Stevenson, W.T., Sefton, M.V.
Microencapsulation of CHO cells in a hydroxyethyl methacrylate-methyl methacrylate
copolymer.
Biomaterials, 8 : 360-366. 1987.

Desai, N.P., Sojomihardjo, A., Yao, Z., Ron, N. and Soon-Shiong, P.

Interpenetrating polymer networks of alginate and polyethylene glycol for encapsulation of islets of Langerhans.

J. Microencapsulation, 17 : 677-690. 2000.

De Vos, P., De Haan, B., Van Schilfgaarde, R.

Effect of the alginate composition on the biocompatibility of alginate-polylysine microcapsules.

Biomaterials, 18 : 273-78. 1997_a.

De Vos, P., De Haan, B., 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_b.

De Vos, P., Hamel, A.F., Tatarkiewicz, K.

Considerations for successful transplantation of encapsulated pancreatic islets.

Diabetologia, 45 : 159-173. 2002_a.

De Vos, P., Hoogmoed, C.G.; Busscher, H.J.

Chemistry and biocompatibility of alginate-PLL capsules for immunoprotection of mammalian cells.

J. Biomed. Mater. Res., 60 : 252-259. 2002_b.

De Vos, P., Wolters, G.H.J., Fritschy, W.M., Van Schilfgaarde, R.

Obstacles in the application of microencapsulation in islet transplantation.

Int. J. Art. Org., 16 : 205-212. 1993.

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

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

Tranplant. Proc., 26 : 782-783. 1994.

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

Isolated human islet transplanted into diabetic nude mice after ultraviolet B irradiation.
Transplantation Proceedings, 24 : 2853. 1992.

Diabetes Control and Complications Trial Research Group.

Implementation of treatment protocols in the Diabetes Control and Complications Trial.
Diabetes Care; 18 : 361-376. 1995.

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

Effect of oxygen on isolated pancreatic tissue.

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

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

Effect of hypoxia on insulin secretion by isolated rat and canine islets of Langerhans.
Diabetes, 42 : 12-21. 1993.

Douzdjian V, Abecassi MM, Cooper JL, et al.

Incidence, management and significance of surgical complications after pancreatic transplantation.

Surg. Gynecol. Obstet., 177 : 451-456. 1993.

Dunca, 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.

Dupuy, B., Arien, A., Minnot, A.P.

FT-IR of membranes made with alginate/polylysine complexes. Variations with the mannuronic or guluronic content of the polysaccharides.

Cell Blood Subs. And Immob. Biotech., 22 : 71-82. 1994.

Dupuy, B., Gin, H., Bacquey, C. and Ducassou, D.

In situ polymerization of a microencapsulating medium round living cells.

J. Biomed. Mater. Res., 22 : 1061-1070. 1988.

Duvivier-Kali, V.F., Omer, A., Parent, R.J. O'Neil, J.J. and Weir, G.C.

Complete protection of islets against allorejection and autoimmunity by a simple barium-alginate membrane.

Diabetes, 50 : 1698-1705. 2001.

Eisenbarth, G.S., Stegall, M.

Islet and pancreatic transplantation—autoimmunity and alloimmunity.

N. Engl. J. Med., 335 : 888-90. 1996.

Engelking, L.R.

Physiology of the endocrine pancreas.

Semin. Vet. Med. Surg. (Small Anim), 12 : 224-229. 1997.

Falko JM, O'Dorizio TM, Cataland S.

Improvement of high-density lipoprotein-cholesterol levels: ambulatory type I diabetics treated with the subcutaneous insulin pump.

JAMA., 247 : 37-39. 1982.

Fan, M.Y., Lum, Z.P., Fu, X.W., Lévesque, L., Tai, I.T. and Sun, A.M.

Reversal of diabetes in BB rats by transplantation of encapsulated pancreatic islets.

Diabetes, 39 : 519-522. 1990.

Faulkner-Jones, B.E., D.S. Cram, J. Kun & L.C. Harrison.

Localization and quantitation of expression of two glutamate decarboxylase genes in pancreatic beta-cells and other peripheral tissues of mouse and rat.

Endocrinol. 133: 2962-2972. 1993.

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 Compagny, Austin, p. 129-139. 1994.

Feldt-Rasmussen B, Mathiesen ER, Deckert T, et al.

Effect of 2 years of strict metabolic control on progression of incipient nephropathy in insulin-dependent diabetes.

Lancet, 2 :1300-1304. 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.

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

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

Transplantation International, 7 : 264-271. 1994.

Fritschy, W.M., Strubbe, J.H., Wolter, G.H.J., and Van Schilfgaarde, R.

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

Diabetol., 34 : 542-547. 1991.

Gåserød, O, Sannes, A., Skjåk-Braek, G.

Microcapsules of alginate-chitosan. II. A study of capsule stability and permeability.

Biomaterials, 20 : 773-783. 1999.

Gin, H.C., Cadic, C., Gaquey, C. & Dupuy, B.

Peritoneal exudates from microencapsulated rat islets of Langerhans xenografted microencapsulated presenting characteristics of potentially cytotoxic non-specific inflammation.

J. Microencapsulation, 9 : 489-494. 1992.

Goss, J.A., Flye, M.W., Lacy, P.E.

Induction of allogeneic islet survival by intrahepatic islet preimmunization and transient immunosuppression.

Diabetes, 45 : 144-7. 1996_a.

Goss, J.A., Flye, M.W., Lacy, P.E.

Successful transfer of immune unresponsiveness to concordant rat islet xenografts.

Transplantation, 61 : 9-13. 1996_b.

Grohn, P., Klöck, G., Schmitt, J.

Large-scale production of Ba(2+)-alginate-coated islets of Langerhans for immunoisolation.

Exp. Clin. Endocrinol., 102 : 380-87. 1994.

Gruessner A.C., Sutherland D.E.R., Gruessner A., Sutherland D.E.R.

Analysis of United States (US) and non-US pancreas transplants as reported to the International Pancreas Transplant Registry (IPTR) and to the United Network for Organ Sharing (UNOS). In Clinical Transplants 1998, Cecka, J.M., Terasaki, P.I., editors, Los Angeles, UCLA Tissue Typing Laboratory, pp. 53-71. 1999.

Gruessner R.W.G., Sutherland D.E.R., Drangstveit M.D., Wrenshall L.E., Humar A., Gruessner, A.

Mycophenolate mofetil in pancreas transplantation.

Transplantation, 66 : 318. 1998.

Guerci B, Meyer L, Delbachian I, et al.

Blood glucose control on Sunday in IDDM patients: intensified conventional insulin therapy versus continuous subcutaneous insulin infusion.

Diabetes Res. Clin. Pract., 40 : 175-180. 1998.

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

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

Transplant. Proc., 24 : 219-219. 1992.

Haakens K, Hanssen KF, Dahl-Jorgensen K, et al.

Early morning glycaemia and the metabolic consequences of delaying breakfast/morning insulin: a comparison of continuous subcutaneous insulin infusion and multiple injection therapy with human isophane or human ultralente insulin at bedtime in insulin-dependent diabetics.

Scand. J. Clin. Lab. Invest., 49 : 653-659. 1989.

Haardt MJ, Berne C, Dorange C, et al.

Efficacy and indications of CSII revisited: the Hotel Dieu cohort.

Diabetic Med., 14 : 407-408. 1997.

Hallé, J.-P., Cousineau, S., De Villers, F., Ianni, F. and Beaudry, M.

Microencapsulation of islets of Langerhans for transplantation : Studies on membrane permeability. Club de Recherches cliniques du Québec, Pointe-aux-Pic, 6-8 octobre 1988.

Med./Sci, 1(Suppl.1), 23A. 1988.

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., Landry, D., Fournier, A. & Chevalier, S.
Arginine esterase release by microencapsulated prostatic cells as a measure of membrane permeability to proteins.
First International Congress of the Cell Transplant Society, Pittsburg PA.
Cell Transplantation, 1 : 166. 1992_b.
- Hallé, J.-P., Leblond, F.A., Pariseau, J.-F., Jutras, P., Brabant, M.-J. & Lepage, Y.
Studies on small (<300µm) 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. & Yalle, J.-F.
Protection of islets of Langerhans from antibodies by microencapsulation with alginate-poly-L-lysine microcapsules.
Transplantation, 55 : 350-354. 1993.
- Hammer, C.
Physiological obstacles after xenotransplantation.
Ann N.Y. Acad. Sci., 862 : 19-27. 1998_a.
- Hammer, C., Linke R, Wagner F, Diefenbeck M.
Organs from animals for man.
Arch. Allergy Immunol., 116 : 5-21. 1998_b.
- Hammer, K., Stemme, S. Geng, Y.J.& Holm, J.
Evolutionary and immunological aspects of xenotransplantation.
Transplantation Proceedings, 24 : 2397-2400. 1992.
- Hardy, M.A. & Oluwole, S.F.
Effect of ultraviolet radiation on immunogenicity of tissues and organ allografts.
Transplantation Review, 5 : 46-62. 1991.

Heinemann, L. & Richter, B.

Clinical pharmacology of human insulin.

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

Heinemann, L., Pflutzner, A., Heise, T.

Alternative routes of administration as an approach to improve insulin therapy: update on dermal, oral, nasal and pulmonary insulin delivery.

Curr. Pharm. Des., 7 : 1327-51. 2001.

Heller A

Implanted electrochemical glucose sensors for the management of diabetes.

Annu. Rev. Biomed. Eng., 1:153-75. 1999.

Helve E, Laatikainen L, Merenmies L, et al.

Continuous insulin infusion therapy and retinopathy in patients with type I diabetes.

Acta Endocrinol. (Copenh). 115 : 313-319. 1987.

Hering B.J., Brendel M.D.

On the occasion of the 7th World Congress of the IPITA, International Islet Transplant Registry Newsletter 8

Sydney, Australia, August 22-25, 1999.

Hisano, N., Morikawa, N., Iwata, H., Ikada, Y.

Entrapment of islets into reversible disulfide hydrogels.

J. Biomed. Mater. Res., 40 : 115-23. 1998.

Home PD, Marshall SM.

Problems and safety of continuous subcutaneous insulin infusion.

Diabet Med., 1 : 41-44. 1984.

Hopt UT, Drognitz O.

Pancreas organ transplantation. Short and long-term results in terms of diabetes control.
Langenbecks Arch. Surg, 385 : 379-89. 2000.

Horcher, A., Zekorn, T., Siebers, U., Klöck, G., Frank, H., Houben, R., Bretzel, R.G.,
Zimmermann, U. and 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.

Humar, A., Kandaswamy, R., Granger, D., Gruessner, R.W., Gruessner, A.C., Sutherland,
D.E.R.

Decreased Surgical Risks of Pancreas Transplantation in the Modern Era
Annals of Surgery, 231 : 269-275. 2000.

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.

James, R.F.L., Holmes, M.A., Chadwick, D.R., Bell, P.R.F., London, N.J.M.

Tissue culture of rat, porcine and human islets of Langerhans : A comparison of ten
different culture media.

Horm. Metab. Res., 26 : 69. 1994.

James, T., Jin, M.X., Chowbury, N.C. and Oluwole, S.F.

Tolerance induction to rat islet allografts by intrathymic inoculation of donor spleen cells.

Transplantation, 56 : 1148-1152. 1993.

Jaremko, J. & Rorstad, O.

Advances toward the implantable artificial pancreas for treatment of diabetes.

Diabetes Care, 21 : 444-450. 1998.

Jindal, R.M., Sidner, R.A., Milgrom, M.L.

Post-transplant diabetes mellitus. The role of immunosuppression.

Drug Saf., 16 : 242-57. 1997.

Kahan, B.

The three faces of immunosuppression in the next millennium: selectivity, synergy and specificity.

Transplant. Int., 9 : 527. 1998.

Katzung, B.G.

Basic & Clinical pharmacology.

Appleton & Lange, Paramount Publishing Business and Professional Group, 1046 p. 1995.

Kaufman D.B., Platt J.L., Rabe F.L., Dunn D.L., Bach F.H., Sutherland D.E. Differential roles of Mac-1+ cells, and CD4+ and CD8+ T lymphocytes in primary nonfunction and classic rejection of islet allografts.

J. Exp. Med., 29 : 79. 1990.

Kelly W.D., Lillehei R.C., Merkel F.K., Idezuki T., Goetz F.C.

Allotransplantation of the pancreas and duodenum along with the kidney in diabetic nephropathy.

Surgery, 61 : 827. 1967.

Kendall WF Jr, Collins BH, Opara EC.

Islet cell transplantation for the treatment of diabetes mellitus.

Expert Opin. Biol. Ther. Jan, 1 : 109-19. 2001.

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.

Kerner W.

Implantable glucose sensors: Present status and future developments.

Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes, 109(Suppl 2) : S341-S346. 2001.

Kessler, L., Jesser, C., Lombard, Y., Karsten, V., Belcourt, A., Pinget, M. and Poindron, P.

Cytotoxicity of peritoneal murine macrophages against encapsulated pancreatic rat islets :
in vivo and in vitro studies.

J. Leukoc. Biol., 60 : 729-736. 1996.

Kessler, L., Pinger, M., Aprahamian, M., Dejardin, P. and Damgé, C.

In vitro and in vivo studies of the properties of an artificial membrane for pancreatic islet
encapsulation.

Horm. Metabol. Res. 23 : 312-317. 1991.

Kim, J., W. Richter, H.J. Aanstoot, et al.

Differential expression of GAD65 and GAD67 in human, rat, and mouse pancreatic islets.

Diabetes, 42 : 1799-1808. 1993.

King, G.A., Daugulis, A.J., Faulkner, P., and Goosen, M.F.A.

Alginate-Polylysine Microcapsules of controlled membrane molecular weight cutoff for
mammalian cell culture engineering.

Bio/Technology, 3 : 231-240. 1987.

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

Production of purified alginates suitable for use in immunoisolated transplantation.

Appl. Microbiol. Biotechnol., 40 : 638-43. 1994.

Klöck, G., Pfeffermann, A., Ryser, C., Gröhn, P., Kuttler, B., Hahn, H.J., Zimmermann, U.

Biocompatibility of mannuronic acid-rich alginates.

Biomaterials, 18 : 707-13. 1997.

Kobayashi T, Sawano S, Itoh T, et al.

The pharmacokinetics of insulin after continuous subcutaneous infusion or bolus subcutaneous injection in diabetic patients.

Diabetes, 32 : 331-336. 1983.

Koivisto VA, Yki-Jarvinen H, Karonen S-L, et al.

Pathogenesis and prevention of the dawn phenomenon in diabetic patients treated with CSII.

Diabetes, 35 : 78-82. 1986.

Krishnamurthi V, Philosophe B, Bartlett ST.

Pancreas transplantation: contemporary surgical techniques.

Urol. Clin. North Am., 28 : 833-8. 2001.

Kulseng, B., Skajk-Braek, G., Ryan, L., Andersson, A., King, A, Faxvaag, A. and Espevik, T.

Transplantation of alginate microcapsules.

Transplantation, 67 : 978-984. 1999.

Kulseng, B., Thu, B., Espevik, T. and Skajk-Braek, G.

Alginate polylysine microcapsules as immune barrier : permeability of cytokines and immunoglobulins over the capsule membrane.

Cell Transplantation, 6 : 387-394. 1997.

Lacik, I., Anilkumar, A.V. and Wang, T.G.

A two-step process for controlling the surface smoothness of polyelectrolyte-based microcapsules.

J. Microencapsulation, 18 : 479-490. 2001.

Lacy, P.E.

Status of islet cell transplantation.

Diabetes Review, 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.

Lahooti, S., Sefton, M.

Effect of an immobilization matrix and capsule membrane permeability on the viability of encapsulated HEK cells.

Biomaterials, 21 : 987-995. 2000.

Lakey, J.R.T., Rajott, R.V., Warnock, G.L., Kneteman, N.M.

Human pancreas preservation prior to islet isolation.

Transplantation 59:689. 1995.

Lakey, J.R.T., Warnock, G.L., Kneteman, N.M., Ao, Z., Rajotte, R.V.

Effects of precryopreservation culture on human islet recovery and in vitro function.

Transplant. Proc., 26 : 280. 1994.

Lakey, J.R.T., Warnock, G.L., Rajotte, R.V., Suarez-Alamazor, M.E., Ao, Z., Shapiro A.M., Kneteman N.M.

Variables in organ donors that affect the recovery of human islets of Langerhans.

Transplantation, 61: 1047. 1996.

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. 1992_a.

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. 1992_b.

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

Immunoisolation : at a turning point.

Immunology Today, 18 : 135-139. 1997.

Lanza, R.P., Kuhlreiber, W., Ecker, D., Staruk, J & Chick, W.

Xenotransplantation of porcine and bovine islets without immunosuppression using
uncoated microspheres.

Transplantation, 59 : 1377-1384. 1995.

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

Islet transplantation with immunoisolation.

Diabetes, 41 : 1503-1510. 1992_c.

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.

Lauritzen T, Pramming S, Deckert T, et al.

Pharmacokinetics of continuous subcutaneous insulin infusion.

Diabetologia, 24 : 326-329. 1983.

Lawson P, Trayner I, Rosenstock J, et al.

The effect of continuous subcutaneous insulin infusion on serum lipids.

Diabete Metab., 10 : 239-244. 1984.

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 implantation of small alginate poly-L-lysine microcapsules.

Cell Transplantation, 8 : 327-37. 1999.

Lee, C.S., Chu, I.M.

Characterization of modified alginate-poly-L-lysine microcapsules.

Artif. Organs, 21 : 1002-1006. 1997.

Lenhard, M.J., MD; Grafton D. Reeves, MD.

Continuous Subcutaneous Insulin Infusion :A Comprehensive Review of Insulin Pump Therapy. Arch. Intern. Med., 161 : 2293-2300. 2001.

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.

Like, A.A., C.A. Biron, E.J. Weringer, et al.

Prevention of diabetes in Biobreeding/Worcester rats with monoclonal antibodies that recognize T-lymphocytes or natural killer cells.

J. Exp. Med., 164 : 1145-1159. 1986.

Like, A.A., Appel, M.C., Williams, R.M., Rossini, A.A.

Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis in mice. Morphologic and physiologic studies.
Lab Invest, 38 : 470-86. 1978

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

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

Lim, F. & Sun, A.M.

Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas.
Science, 210 : 908-910. 1980.

Linetsky E., Bottino R., Lehmann R., Alejandro R., Inverardi L., Ricordi C.

Improved human islet isolation using a new enzyme blend, Liberase.
Diabetes, 46 : 1120. 1997.

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

Xenografts of rat islets into diabetic mice.
Transplantation, 53 : 1180-1183. 1992.

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

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

Diabetes, 40 : 1511-1515. 1991.

Ma, X., Vacek, I. and Sun, A.M.

Studies on the parameters of making alginate poly-L-lysine-alginate biomicrocapsules for cell transplantation.

Artif. Organs, 15 :274. 1991.

Ma, X., Vacek, I. and Sun, A.M.

Generation of alginate-poly-L-lysine (APA) biomicrocapsules : The relationship between the membrane strength and the reaction conditions.

Art. Cells Blood Subst. Immob. Biotech., 22 : 43-69. 1994.

Makino, S., M. Harada, Y. Kishimoto & Y. Hayashi.

Absence of insulinitis and overt diabetes in athymic nude mice with NOD genetic background.

Exp. Anim., 35: 495-499. 1986.

Mandrup-Poulsen T., K. Bendtzen, C. Dinarello & J. Nerup.

Human tumor-necrosis factor potentiates human interleukin 1-mediated rat pancreatic beta cell-cytotoxicity.

J. Immunol., 139 : 4077-4082. 1987.

Marieb, E.N.

Anatomie et physiologie humaines.

Édition du Renouveau Pédagogique Inc., 1014 p. 1993.

Mazaheri, R., Atkison, P., Stiller, C., Dupré, J., Vose, J. and O'Shea, G.

Transplantation of encapsulated allogeneic islets into diabetic BB/W rats (Effects of immunosuppression).

Transplantation, 51 : 750-754. 1991.

McKeage K, Goa KL.

Insulin glargine: a review of its therapeutic use as a long-acting agent for the management of type 1 and 2 diabetes mellitus.

Drugs, 61 : 1599-624. 2001.

McKnight, C.A., Ku, A., Goosen, M.F.A., Dun, D. & Penney, C.

Synthesis of chitosan-alginate microcapsules membranes.

Journal of Bioactive and Compatible Polymers, 3 : 334-355. 1988.

Mecklenburg RS, Benson EA, Benson JW Jr, et al.

Acute complications associated with insulin pump therapy: report of experience with 161 patients.

JAMA., 252 : 3265-3269. 1984.

Metrakos, P., Yuan, S., Agapitos, D., Rosenberg, L.

Paracrine signalling (duct→ islet) in the pancreas and maintenance of islet cell mass –
Potentiel implications for islet transplantation.

Transplant. Proc., 26 : 637-638. 1994.

Midthjell K, Kapelrud H, Bjornerud A, et al.

Severe or life-threatening hypoglycemia in insulin pump treatment.

Diabetes Care, 17 : 1235-1236. 1994.

Mintz D.H. , Alejandro R.

Human islet transplantation: the University of Miami experience. In Transplantation of the
Endocrine Pancreas in Diabetes Mellitus.

Van Schilfgaarde, R., Hardy, M.A., editors, Amsterdam, Elsevier, pp. 234–239. 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.

Morel P., Goetz F.C., Moudry-Munns K.C., Freier E.F., Sutherland D.E.R.

Long term glucose control in patients with pancreatic transplants.

Ann. Intern. Med., 115 : 694. 1991.

Mullen, Y., Maryyama, M., Smith, C.V.

Current progress and perspectives in immunoisolated islet transplantation.
Journal of Hepatobiliary Pancreat. Surg., 7 : 347-357. 2000.

Newgard C.G., McGarry D.

Metabolic coupling factors in pancreatic beta cell signal transduction.
Annu. Rev. Biochem., 64 : 689. 1995.

Noorchashm, H., N. Noorchashm, J. Kern, et al.

B-cells are required for the initiation of insulinitis and sialitis in nonobese diabetic mice.
Diabetes, 46 : 941-946. 1997.

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

Encapsulation of rat islets of Langerhans prolongs xenograft survival in diabetic mice.
Diabetes, 35 : 943-946. 1986.

Odorico, J.S., O'Connor, T., Campos, L., Barker, C.F., Posselt, A.M., Naji, A.

Examination of the mechanisms responsible for tolerance induction after intrathymic inoculation of allogeneic bone marrow.
Ann. Surg, 218 : 525-31; discussion 31-3. 1993.

Ogawa, M., T. Maruyama, T. Hasegawa, et al.

The inhibitory effect of neonatal thymectomy on the incidence of insulinitis in non-obese diabetes (NOD) mice.
Biomed. Res., 6 : 103-106. 1985.

Ohgawara H.

Strategies for immunoisolation in islet transplantation: challenges for the twenty-first century.
J. Hepatobiliary Pancreat. Surg., 7 : 374-9. 2000.

Owens, D.R., Zinman, B., Bolli, G.B.

Insulins today and beyond.

Lancet, 358 : 739-46. 2001.

Ozaki CF, Stratta RJ, Taylor RJ, et al.

Surgical complications in solitary pancreas and combined pancreas-kidney transplantation.

Am. J. Surg., 164 : 546-551. 1992.

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.

Peterson, C.M.

Symposium on optimal insulin delivery. Introduction : History and goals of insulin treatment.

Diabetes Care, 5 (Suppl.1) : 1-5. 1982.

Pickup JC, White MC, Keen H, et al.

Long-term continuous subcutaneous insulin infusion in diabetics at home.

Lancet, 2 : 870-873. 1979.

Pietri A, Raskin P.

Cutaneous complications of chronic continuous subcutaneous insulin infusion therapy.

Diabetes Care, 4 : 624-626. 1981.

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.

Pommershaim, R., Löwe, H., Hessel, V. Ehrfeld, W.

Immobilisation of living cells and enzymes by encapsulation. Microtechnologies and minniaturization.

IBC Conferences Limited, Frankfurt/Main, Germany. 1998.

Powers, A.C., Brissova, M., Lacik, I., Anilkumar, A.V., Shahrokhi, K. and Wang, T.G.

Permeability assessment of capsules for islet transplantation.

Annals of the NY Academy of Sciences, 831 : 208-216. 1997.

Rabinovitch, A.

An update on cytokines in the pathogenesis of insulin dependent diabetes mellitus. Diabetes Metab. Rev., 14: 129-151. 1998.

Rafael, E., Wernerson, A., Arner, P., Wu, G.S. and Tibell, A.

In vivo evaluation of glucose permeability of an immunoisolation device intended for islet transplantation : A novel application of the microdialysis technique.

Cell Transplantation, 8 : 317-326. 1999.

Rajotte , R.V., Lakey, J.R.T.

Adult Islet Cryopreservation. In : Methods in Cell Transplantation,

Ricordi, C., editor, Austin, TX, R.G. Landes, pp. 517-524. 1995.

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.

Reeves ML, Seigler DE, Ryan EA, et al.

Glycemic control in insulin-dependent diabetes mellitus: comparison of outpatient intensified conventional therapy with continuous subcutaneous insulin infusion.

Am. J. Med., 72 : 673-680. 1982.

Rehor, A., Canaple, L., Zhang, Z., Hunkeler, D.

The compressive deformation of multicomponent microcapsules : Influence of size, membrane thickness, and compression speed.

J. Biomater. Sci. Polymer. Edn., 12 : 157-170. 2001.

Ricker, A.T., Stockberger, S.M., Halbou, P.A., Eisenbarth, G.S. and Bower-Weis, S.

Hyperimmune response to microencapsulated xenogenic tissue in non obese diabetic mice.

The Immunology of Diabetes Mellitus, Jaworski, M.A., Molnar, G.D., Rajotte, R.V. and

Singh, B. (eds.), Exepta Medica, Amsterdam, p.193-200. 1986.

Ricordi C., Lacy P.E., Finke E.H., Olack B.J., Scharp D.W.

Automated method for isolation of human pancreatic islets.

Diabetes, 37 : 413. 1988.

Robitaille R, Leblond FA, Bourgeois Y, Henley N, Loignon M, Halle JP.

Studies on small (<350 microm) alginate-poly-L-lysine microcapsules. V. Determination of carbohydrate and protein permeation through microcapsules by reverse-size exclusion chromatography.

J. Biomed. Mater. Res., 50 : 420-7. 2000.

Robitaille, R., Leblond, F.A., Henley, N., Prud'homme, G.J., Drobetsky, E., Hallé, J.-P.

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

J. Biomed. Mater. Res., 45 : 223-30. 1999_a.

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. 1999_b.

Sakai, S., Ono, T., Ijima, H. and Kawakami, K.

Control of molecular weight cut-off for immunoisolation by multilayering glycol chitosan-alginate polyion complex on alginate-based microcapsules.

J. Microencapsulation, 17 : 691-699. 2000.

Santé Canada

Le diabète au Canada : Statistiques nationales et possibilités d'accroître la surveillance, la prévention et la lutte.

Publication par le ministère de la santé. 1999.

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.

Schiffrin A, Belmonte MM.

Comparison between continuous subcutaneous insulin infusion and multiple injections of insulin: a one-year prospective study.

Diabetes, 31 : 255-264. 1982.

Schnerder, S., Feilen, P.J., Slotty, V., Kampfner, D., Preuss, S., Berger, S., Beyer, J., Pommersheim, R.

Multilayer capsules : a promising microencapsulation system for transplantation of pancreatic islets.

Biomaterials, 22 : 1961-70. 2001.

Schrezenmeir, J., Gerö, L., Laue, C., Kirchgessner, J., Müller, A., Hüls, A., Passmann, R., Hahn, H.J., Kunz, L., Mueller-Klieser, W. and Altman, J.J.

The role of oxygen supply in islet transplantation.

Transplantation Proceedings, 24 : 2925-2929. 1992.

Selam JL, Millet P, Saluski S.

Beneficial effect of glycaemic improvement in non-ischaemic forms of diabetic retinopathy: a 3-year follow-up.

Diabet. Med., 3 :60-64. 1986.

Serreze, D.V., H.D. Chapman, D.S. Varnum.

B lymphocytes are essential for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes: analysis of a new "speed congenic" stock of NOD.IgFnull mice.

J. Exp. Med., 184 : 2049-2053. 1996.

Shapiro A.M., Lakey J.R., Ryan E.A., Korbitt G.S., Toth E., Warnock G.L., Kneteman N.M., Rajotte R.V.

Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen.

N. Engl. J. Med., 343 : 230. 2000.

Shiffrin, A. and Belmonte, M.M.

Comparisons between continuous subcutaneous insulin infusion and multiple injections of insulin. A one-year prospective study.

Diabetes, 31 : 255-264. 1982.

Shimizu H, Shimomura Y, Takahashi M.

Enteral hyperalimentation with continuous subcutaneous insulin improved severe diarrhea in poorly controlled diabetic patient.

J. Parenter. Enteral. Nutr., 15 : 181-183. 1991.

Siebers, U., Zekorn, T., Horcher, A., Hering, B., Bretzel, R.G., Zimmermann, U. and Federlin, K.

In vitro testing of rat and porcine islets microencapsulated in Barium alginate beads.
Transplantation Proceedings, 24 : 950-951. 1992.

Soon-Shiong, P.

Treatment of type I diabetes using encapsulated islets.
Advanced Drug Delivery Reviews, 35 : 259-270. 1999.

Soon-Shiong, P., Feldman, E., Nelson, R., Komtebedde, J., Smidsrod, O., Skjak-Braek, G., Espevik, T., Heintz, R.E. and 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 I diabetic patient after encapsulated islet transplantation.
The Lancet, 343 : 950-951. 1994.

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. 1990.

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

An immunologic basis for the fibrotic reaction to implanted microcapsules.

Transplantation Proceedings, 23 : 758-759. 1991.

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

The action profiles of human NPH insulin preparations.

Diabetic Medicine, 6 : 239-244. 1989.

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.

Stewart, W.W. and Swaisgood, H.E.

Characterisation of calcium alginate pore diameter by size-exclusion chromatography using protein standards.

Enzyme Microb. Technol., 15 : 922-927. 1993.

Storrs, R., Dorian, R., King, S.R., Lakey, J. and Rilo, H.

Preclinical Development of the Islet Sheet

Annals of the New York Academy of Sciences, 944 : 252-266. 2001.

Stratta, R.J.

Simultaneous use of tacrolimus and mycophenolate mofetil in combined pancreas-kidney transplant recipients: a multi-center report.

Transplant. Proc., 29 : 654. 1997.

Stratta, R.J.

Immunosuppression and pancreas transplantation: progress, problems, and perspective.

Transplant. Immunol., 6 : 69. 1998.

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

Microencapsulation of living cells- A long-term delivery system.

J. Controlled Release, 2 : 137-141. 1985.

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

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

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

Sutherland D.E.R., Cecka M., Gruessner A.C.

Report from the International Pancreas Transplant Registry (IPTR)—1998.

Transplant. Proc., 31 : 597. 1999.

Sutherland D.E.R., Gruessner R.W.G., Gores P.F., Brayman K.L., Wahoff D.C., Gruessner A.

Pancreas transplantation: an update.

Diabetes Metab. Rev., 11 : 337. 1995.

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, J., Tsang, A., Tze, W.J.W.

Effects of serum and medium supplements, pH and temperature on the viability of cultured porcine islets.

Tranplant. Proc., 26 : 818-819. 1994.

Tai, I.T., Vacek, I. and Sun, A.M.

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

Xenotransplantation, 2 : 37-45. 1995.

Tamborlane WV, Sherwin RS, Genel M, et al.

Outpatient treatment of juvenile-onset diabetes with a preprogrammed portable subcutaneous insulin infusion system.

Am. J. Med., 68 : 190-196. 1980.

Teutsch SM, Herman WH, Dwyer DM, et al.

Mortality among diabetic patients using continuous subcutaneous insulin-infusion pumps.

N. Engl. J. Med., 310 : 361-368. 1984.

The Kroc Collaborative Study Group.

Blood glucose control and the evolution of diabetic retinopathy and albuminuria: a preliminary multicenter trial.

N. Engl. J. Med., 311 : 365-372. 1984.

Thu, B., Bruheim, P., Espevik, T., Smidsrod, O., Soon-Shiong, P. and Skjak-Braek, G.

Alginate polycation microcapsules I- Interaction between alginate and polycation.

Biomaterials, 17 : 1031-1040. 1996_a.

Thu, B., Bruheim, P., Espevik, T., Smidsrod, O., Soon-Shiong, P. and Skjak-Braek, G.

Alginate polycation microcapsules II- Some functional properties.

Biomaterials, 17 : 1069-1079. 1996_b.

Tortora, G.J., Grabowski, S.R.

Principes d'anatomie et de physiologie.

Biological Sciences Textbooks, Centre Éducatif et Culturel inc. 1204 p. 1994.

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.

- Tze, W.J., Cheung, S., Tai, J., Tsang, A.
Xenotransplantation of adult porcine islets in diabetic mice. A study of UVB irradiation, cryopreservation and immunosuppression on graft survival time.
Horm. Metab. Res., 30 : 509-13. 1998.
- 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.
- Vandenbossche, G.M.R., Van Oostveldt, P., Remon, J.P.
A fluorescence method for the determination of the molecular weight cut-off of alginate-polylysine microcapsules.
J. Pharm. Pharmacol., 43 : 275-277. 1991.
- Van Raamsdonk, J.M., Chang, P.L.
Osmotic pressure test : A simple, quantitative method to assess the mechanical stability of alginate microcapsules.
J. Biomed. Mater. Res., 54 : 264-271. 2001.
- Van Schilfgaarde, R. and De Vos, P.
Aspects of immunoprotection of islets.
Transplantation Proceedings, 28 : 3516-3517. 1996.
- Van Schilfgaarde, R. and De Vos, P.
Factors influencing the properties and performance of microcapsules for immunoprotection of pancreatic islets.
J. Mol. Med., 77 : 199-205. 1999.
- 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.
Autologous islet transplantation to prevent diabetes after pancreatic resection.
Ann. Surg., 222 : 562. 1995.

Warnock G.L., Kneteman N.M., Ryan E., Seelis R.E.A., Rabinovitch A., Rajotte R.V
Normoglycemia after transplantation of freshly isolated and cryopreserved pancreatic islets
in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus.

Diabetologia, 34 : 55. 1999.

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

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

Transplantation Proceedings, 26 : 1116-1119. 1994_a.

Weber, C. & Reemtsma, K.

Microencapsulation in small animals-II : Xenografts. In pancreatic islet transplantation
series : Vol III : Immunoisolation of pancreatic islets. R. Lanza & W. Chick, Eds. : 59-79.

R. Landes. Austin, TX. 1994_b.

Weber, C., Safley, S., Hagler, M. and Kapp, J.

Evaluation of graft-host response for various tissue sources and animal models.

Annals of the NY Academy of Sciences, 875 : 233-254. 1999.

Weber, C.J., Zabinski, S., Koschitzky, T., Wicker, L., Rajotte, R., D'Agati, V., Peteron, L.,
Norton, J. and Reemtsma, K.

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

Transplantation, 49 : 396-404. 1990.

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., and Stiller, C.

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

Transplantation, 54 : 588-592. 1992.

Woodworth, J.P., Bowsher, R.R., Howey, D.C., Row, H.M. and Ferguson, A.L.

Pharmacokinetic and pharmacodynamic comparisons of [Lys B28, Pro B29] human insulin (Lyspro) to Humulin R.

Am. Ass. Pharm. Scientists Annual Meeting, 9(Suppl. 10), 95292. 1992.

Wong, F.S. & C.A. Janeway.

Insulin-dependent diabetes mellitus and its animal models.

Curr. Opin. Immunol., 11 : 643-647. 1999_a.

Wong, F.S., J. Karttunen, C. Dumont.

Identification of an MHC class I-restricted autoantigen in type 1 diabetes by screening an organ-specific cDNA library.

Nat. Med., 5 : 1026-1031. 1999_b.

Yoon, J.W. & H.S. Jun.

Insulin-dependent diabetes mellitus. In Encyclopedia of Immunology, 2nd Ed. I.M. Riott & P.J. Delves, eds. :1390-1398. Academic Press. London, UK, 1998.

Yoon, J.W., C.S. Yoon, H.W. Lim, et al.

Control of autoimmune diabetes in NOD mice by GAD expression or suppression in β cells.

Science, 284 : 1183-1187. 1999.

Yoon, J.W., H.S. Jun & P.S. Santamaria.

Cellular and molecular mechanisms for the initiation and progression of β -cell destruction resulting from the collaboration between macrophages and T cells. *Autoimmunity* 27: 109-122. 1998.

Yoon, J.W. and Jun, H.S.

Cellular and Molecular Pathogenic Mechanisms of Insulin-Dependent Diabetes Mellitus.

Annals of the New York Academy of Sciences, 928 : 200-211. 2001.

Zachary, T., Bloomgarden, M.D.

Treatment Issues in Type I Diabetes.

Diabetes Care, 25 : 230-238. 2002.

Zielinski, B.A., Aebischer, P.

Chitosan as a matrix for mammalian cell encapsulation.

Biomaterials, 15 : 1049-1056. 1994.

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_a.

Zekorn, T., Siebers, U., Horcher, Bretzel, R.G., Renardy, M., Planck, H., Zschocke, P. & Federlin, K.

Protection of islets of Langerhans from interleukin-1 toxicity by artificial membranes.

Transplantation, 50 : 391-394. 1990_b.

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

Barium-alginate beads for immunoisolated transplantation of islets of Langerhans.
Transplantation Proceedings, 24 : 937-939. 1992.

Zhang, Z.J., L. Davidsen, G.S. Eisenbarth, et al.

Suppression of diabetes in non obese diabetic mice by oral administration of porcine insulin.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88 : 10252-10256. 1991.