

Université de Montréal

**Amélioration de la résistance à l'hypoxie des îlots de Langerhans
microencapsulés par l'utilisation d'agrégats de cellules dispersées**

par

Stéphanie Bilodeau

Département de Sciences Biomédicales

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine

en vue de l'obtention du grade de maîtrise

en Sciences Biomédicales

option Générale

Août 2010

© Stéphanie Bilodeau, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

**Amélioration de la résistance à l'hypoxie des îlots de Langerhans
microencapsulés par l'utilisation des agrégats de cellules dispersées**

Présenté par :
Stéphanie Bilodeau

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Sylvie Lesage, président-rapporteur
Dr Jean-Pierre Hallé, directeur de recherche
Dr Stevens Paraskevas, membre du jury

Résumé

La transplantation d'îlots de Langerhans microencapsulés est un traitement prometteur du diabète de type 1. La microcapsule protège l'îlot du système immunitaire, tout en permettant la diffusion de petites molécules. Comme la microcapsule empêche la revascularisation des îlots, leur oxygénation se fait par diffusion d'oxygène et ils sont exposés à l'hypoxie. Le manque d'oxygène est un facteur limitant dans la survie des îlots microencapsulés. Il est connu que les plus petits îlots sont plus résistants à l'hypoxie à cause d'une meilleure diffusion de l'oxygène. À cette fin, les agrégats de cellules dispersées d'îlots seront étudiés. Lorsque les cellules des îlots sont dispersées, elles ont la propriété de se ré-assembler dans une structure semblable à celle des îlots. La présente étude a permis de mettre au point une technique de formation des agrégats, de les caractériser et de comparer la résistance à l'hypoxie des îlots et des agrégats. Ceux-ci ont une structure semblable aux îlots et ils sont de plus petite taille. Pour cette raison, ils sont plus viables après un choc hypoxique tout en renversant efficacement l'hyperglycémie de souris diabétiques. Les agrégats sont une alternative intéressante pour la transplantation d'îlots microencapsulés puisque leur oxygénation est plus efficace.

Mots-clés : Diabète, Îlot de Langerhans, Microencapsulation, Agrégats, Hypoxie, Oxygénation

Abstract

Transplantation of microencapsulated islets of Langerhans is a promising treatment for type 1 diabetes mellitus. The microcapsule allows the diffusion of small molecules, while protecting the islet from the antibodies and immune cells. However, microcapsule prevents islet revascularization, thus oxygenation depends on diffusion and islets are exposed to hypoxia. Poor oxygenation is a major limitation in microencapsulated islet survival. It was shown that smaller islets are more resistant to hypoxia because of a better oxygen diffusion. In this study, dispersed islet cell aggregates will be used to improve the oxygenation. When islet cells are dispersed into single cells, they have the ability to re-associate into an islet-like structure. This study allowed to set up a technique to form aggregates, to characterize them and to compare the resistance to hypoxia of islets and aggregates. Aggregates have a similar structure than islets and they are smaller. For this reason, they survive better to a hypoxic treatment, while restoring efficiently normoglycemia in diabetic mice. Aggregates are an interesting solution for microencapsulated islet transplantation because they have a better oxygenation.

Keywords : Diabetes, Islet of Langerhans, Microencapsulation, Aggregates, Hypoxia, Oxygenation

Table des matières

Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures	ix
Liste des abréviations.....	xi
Remerciements.....	xiii
A. Introduction	1
<i>A.1. Le diabète</i>	2
A.1.1 Description du diabète.....	2
A.1.2 Physiologie des îlots de Langerhans	4
A.1.3 Actions générales de l'insuline sur l'organisme	6
<i>A.2. Les traitements du diabète</i>	9
A.2.1 L'injection d'insuline exogène.....	9
A.2.2 La transplantation de pancréas et d'îlots.....	10
<i>A.3 La microencapsulation</i>	12
A.3.2 Techniques de microencapsulation	14
A.3.3 Cause de l'échec de la transplantation d'îlots microencapsulés	15
<i>A.4. Réponse des îlots à l'hypoxie</i>	19
A.4.1 Définition de l'hypoxie	19
A.4.2 Rôle de HIF-1	20
A.4.3 Effet de l'hypoxie sur les îlots	21
<i>A.5 Facteurs limitant la diffusion d'oxygène</i>	23
A.5.1 Le site de transplantation	23
A.5.2 La microcapsule	24
A.5.3 La taille de l'îlot	24
<i>A.6 Les agrégats de cellules dispersées d'îlots pour améliorer la diffusion d'oxygène</i> ..	25
A.6.1 Les agrégats de cellules dispersées d'îlots	25
A.6.2 L'organisation cellulaire des agrégats.....	26
A.6.3 La fonction est dépendante de la structure	27
<i>A.7. Hypothèses et objectifs du projet</i>	29

B. Formation et caractérisation des agrégats.....	30
<i>B.1 Matériel et méthodes</i>	30
<i>B.2 Résultats</i>	32
B.2.1 Formation des agrégats.....	32
B.2.2 Organisation cellulaire.....	33
B.2.3 Fonction.....	34
<i>B.3 Discussion</i>	36
B.3.1 Formation des agrégats.....	36
B.3.2 Organisation cellulaire.....	39
B.3.3 Fonction.....	40
<i>B.4 Conclusion</i>	42
C. Comparaison de la résistance à l'hypoxie	44
<i>C.2 Introduction</i>	46
<i>C.3 Material and methods</i>	48
<i>C.4 Results</i>	53
C.4.1 Aggregate characterization.....	53
C.4.2 Comparison of islet and re-aggregate resistance to hypoxia.....	54
C.4.3 Comparison of cellular response to hypoxia	56
C.4.4 Ability of aggregates to reverse diabetes in mice.....	57
<i>C.5 Discussion</i>	58
D. Diffusion d'oxygène et réponse des agrégats à l'hypoxie.....	63
<i>D.1 Matériel et méthodes</i>	63
<i>D.2 Résultats</i>	65
D.2.1 Évaluation de la résistance à l'hypoxie selon la taille des agrégats	65
D.2.2 Fonction des îlots et des agrégats suite à un choc hypoxique	68
D.2.3 Évaluation de la résistance à l'hypoxie des îlots et des agrégats microencapsulés	69
D.2.4 Diminution du diamètre des microcapsules	70
<i>D.3 Discussion</i>	72
D.3.1 Évaluation de la résistance à l'hypoxie selon la taille des agrégats	72

D.3.2	Fonction des îlots et des agrégats suite à un choc hypoxique	75
D.3.3	Évaluation de la résistance à l'hypoxie des îlots et des agrégats microencapsulés	77
D.3.4	Diminution du diamètre des microcapsules	78
D.4	<i>Conclusions</i>	80
E.	<i>Conclusions</i>	81
E.1	<i>Résumé de l'étude</i>	81
E.2	<i>Discussion des résultats</i>	83
E.2.1	Viabilité des îlots et des agrégats après un choc hypoxique.....	83
E.2.2	Marqueurs d'hypoxie.....	83
E.2.3	Sécrétion d'insuline en réponse au glucose des agrégats	85
E.2.4	Transplantation d'îlots et d'agrégats microencapsulés.....	85
E.2.5	Comparaison avec une étude similaire	88
E.3	<i>Recommandations</i>	89
E.3.1	Amélioration l'oxygénation.....	89
E.3.2	Amélioration de la composition.....	90
E.3.3	Autres utilisation prometteuses	91
E.4	<i>Conclusion</i>	93
F.	<i>Annexe</i>	I
F.1	<i>Bibliographie</i>	I
F.2	<i>Preuve de soumission article</i>	XIV
F.3	<i>Autres contributions</i>	XVII
F.4	<i>Chapitre</i>	XVIII

Liste des tableaux

<u>Tableau 1</u> :	Récapitulation des objectifs et des résultats de cette étude	80
--------------------	--	----

Liste des figures

Figure de l'introduction

Figure A : Représentation de l'organisation cellulaire d'un îlot de rongeur	5
Figure B : Mécanisme de sécrétion d'insuline	7
Figure C : Actions générales de l'insuline	9
Figure D : Causes d'échec de la transplantation d'îlots microencapsulés	17
Figure E : Double rôle de HIF-1 et exemples de réponse protectrice des îlots	20
Figure F : Effets de l'hypoxie sur les îlots	21

Figures des résultats

Figure 1 : Formation des agrégats	32
Figure 2 : Organisation cellulaire des agrégats	33
Figure 3 : Sécrétion d'insuline en réponse au glucose	35
Figure 4 : Viability of islets and aggregates after hypoxic incubation*	53
Figure 5 : Mean diameter of islets and aggregates after hypoxic incubation*	54
Figure 6: a) Percentage of activated caspase-3 positive cells and b) iNOS positive cells after hypoxic incubation*	56
Figure 7: Glycemias (mmol/L) of STZ-induced diabetic SCID mice transplanted with a) 100 Ieq of islets b) 100 Ieq of aggregates*	57
Figure 8: Effet de la taille sur la résistance à l'hypoxie	66

Figure 9 : Sécrétion d'insuline en réponse au glucose suite à un choc hypoxique.....	68
Figure 10 : Viabilité des îlots et des agrégats microencapsulés.....	69
Figure 11 : Diamètre des petites billes.....	71

* Figures présentées dans l'article

Liste des abréviations

α	Alpha
β	Beta
δ	Delta
ε	Epsilon
μm	Micromètre
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
AO/IP	Acridine orange/Iodure de propidium
ADN	Acide désoxyribonucléique
AH	Agrégats incubés en hypoxie
AN	Agrégats incubés en normoxie
APA	Alginate-poly-L-lysine-alginate
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BaCl ₂	Chlorure de Baryum
CAM	<i>Cellular adhesion molecule</i>
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
DAB	diamino-3,3'benzidine
DAG	diacylglycérol
ECAD	E-cadhérine
HIF-1	<i>Hypoxia-inducible factor-1</i>
HRE	<i>Hypoxia response element</i>

IEq	Îlot équivalents
IL-1 β	Interleukine-1 β
iNOS	<i>Inducible nitric oxyde synthase</i>
IH	Îlots incubés en hypoxie
IN	Îlots incubés en normoxie
INF- γ	Interféron - γ
IP3	inositol 1,4,5-triphosphate
IRS	<i>Insulin recepteur substrate</i>
J	Jour
KDa	KiloDalton
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
MEC	Matrice extracellulaire
mmHg	millimètres de mercure
NCAM	<i>Neural Cellular Adhesion Molecule</i>
NO	Oxyde nitrique
O ₂	Oxygène
PBS	Solution bicarbonate phosphate
PLC	Phospholipase C
pO ₂	Pression partielle d'oxygène
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor- α</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

Remerciements

Je tiens à remercier Dr Jean-Pierre Hallé pour son accueil dans son laboratoire. Un gros merci pour toute la confiance qu'il m'a accordée ainsi que toutes les opportunités d'apprentissage qu'il m'a offertes. Sa passion et sa motivation contagieuses m'ont initié à la recherche de façon inattendue.

Merci, à ma complice, Susan, sur qui je sais que je peux toujours compter. Elle est toujours prête à aider, avec une grande gentillesse et une patience infinie. J'ai appris beaucoup à ses côtés et nous avons surmonté tous les obstacles ensemble. Merci pour cette belle collaboration!

Merci à Julie Dusseault pour son accueil dans le laboratoire. Avec sa patience d'ange et ses conseils judicieux, elle a su m'initier au travail de laboratoire.

Merci à Geneviève Langlois pour son enthousiasme et son positivisme. Elle m'a souvent redonné la motivation de continuer.

Je n'aurais pu réussir mes études sans le support de ma famille. Christiane et Yvan, merci d'être toujours là pour moi. Ils sont un modèle pour moi et je leur dois beaucoup. Nick, merci de me redonner confiance dans les moments difficiles, de trouver les bons mots pour m'encourager et de m'appuyer dans mes choix.

A. Introduction

Le diabète de type 1 est une maladie auto-immune où les cellules β des îlots de Langerhans sont détruites. Les patients ne sécrètent plus d'insuline et doivent contrôler leur glycémie à l'aide d'injections quotidiennes d'insuline. Un traitement à l'étude est la transplantation d'îlots, mais il nécessite la prise d'immunosuppresseurs qui peuvent être toxiques. Pour éviter cela, notre laboratoire étudie la transplantation d'îlots microencapsulés. La microcapsule est une membrane d'alginate semi-perméable permettant la diffusion des petites molécules comme l'insuline et le glucose, mais elle bloque l'accès aux anticorps et aux cellules immunitaires. La survie de ces îlots est cependant limitée. Une des principales raisons est que la microcapsule empêche la revascularisation des îlots. Leur oxygénation se fait par diffusion seulement et les îlots sont exposés à des conditions hypoxiques. L'hypoxie a des effets néfastes sur la fonction et la viabilité des îlots, ce qui mène à l'échec de la transplantation. Le présent projet de recherche consiste à améliorer la résistance à l'hypoxie des îlots afin qu'ils soient fonctionnels et viables à plus long terme. À cette fin, la taille des îlots doit être réduite puisqu'il est connu que les plus petits îlots sont les plus résistants à l'hypoxie, à cause d'une meilleure diffusion de l'oxygène. Pour se faire, les agrégats de cellules dispersées d'îlots sont étudiés. Lorsque les îlots sont dispersés en cellules simples, celles-ci se ré-agrègent en une structure semblable à celle des îlots, tout en étant de plus petite taille. En étant plus petits, les agrégats devraient être plus résistants à l'hypoxie, donc ils devraient être plus efficaces

que les îlots pour normaliser la glycémie. Le but de cette étude est donc de caractériser les agrégats et de comparer leur résistance à l'hypoxie à celle des îlots afin d'évaluer la faisabilité de la transplantation d'agrégats microencapsulés.

Le premier objectif est de mettre au point la formation des agrégats et de les caractériser afin de vérifier si l'organisation cellulaire est la même que celle des îlots et s'ils sécrètent de l'insuline en réponse au glucose comme les îlots (section B). Deuxièmement, des expériences ont permis de comparer la résistance à l'hypoxie des îlots et des agrégats en terme de viabilité et de fonction (résultats présentés sous forme d'article, section C). Finalement, des expériences supplémentaires sont présentées visant à mieux comprendre la réponse à l'hypoxie des agrégats et d'évaluer la diffusion d'oxygène dans les microcapsules. Quelques essais ont été faits pour diminuer la taille des microcapsules afin qu'elles soient plus adaptées aux agrégats (Section D).

A.1. Le diabète

A.1.1 Description du diabète

Le diabète est une maladie endocrinienne qui affecte la sécrétion d'insuline et le glucose sanguin. Il y a deux types de diabète ; le type 1 (aussi nommé le diabète juvénile, autoimmun ou insulino-dépendant) et le type 2. Le premier est causé par une destruction auto-immune des cellules β sécrétrices d'insuline des îlots de Langerhans. Elles ne produisent alors plus d'insuline. Les

patients doivent donc s'injecter de l'insuline exogène plusieurs fois par jour. Dans le diabète de type 2, les patients ont une résistance à l'insuline, en plus d'une diminution de sa production. Des médicaments sont disponibles pour améliorer la sensibilité de l'insuline. En 2010, environ 285 millions de personnes dans le monde sont affectées par le diabète (type I et II), dont 37 millions en Amérique du Nord. Le diabète est la cause de près de 16% de la mortalité mondiale [1].

Environ 10% de toutes les personnes diabétiques sont atteintes du diabète de type I. Les causes exactes ne sont pas parfaitement comprises. Le diabète de type 1 semble être causé par des facteurs génétiques et environnementaux, comme l'exposition à un virus et la diète [2]. Le diabète de type 1 est une maladie auto-immune caractérisée par une infiltration lymphocytaires et une destruction des îlots. La conséquence principale du manque d'insuline est l'augmentation du glucose sanguin. L'hyperglycémie à long terme est toxique pour l'organisme. Elle augmenterait le stress oxydatif [3, 4], le stress du réticulum endoplasmique [5] et la glycation protéique [6]. Si la glycémie n'est pas contrôlée adéquatement, le diabète peut mener à des complications néfastes, telles la rétinopathie, la néphropathie, la neuropathie, la maladie coronarienne, l'accident vasculaire cérébral, l'insuffisance artérielle périphérique et l'amputation [7]. Le diabète est l'une des plus grandes causes de cécité, d'insuffisance rénale, d'amputation des membres inférieurs et de mortalité due aux maladies cardiaques [1]. Il est donc crucial pour les patients de contrôler rigoureusement leur glycémie. Une vaste

étude clinique a montré qu'un bon contrôle du glucose sanguin diminue les risques de complications neurologiques et vasculaires [8, 9] et peut les retarder [10, 11].

A.1.2 Physiologie des îlots de Langerhans

Le pancréas est un organe digestif composé de deux parties : une exocrine et une endocrine. Le pancréas exocrine est composé de cellules acinaires et cellules ductales. Les cellules acinaires sécrètent dans le duodénum des pro-enzymes digestives comme la lipase et l'amylase. Les cellules ductales sécrètent principalement du bicarbonate qui régule le pH du suc pancréatique. La portion endocrine du pancréas est formée des îlots de Langerhans. Ce sont des structures multicellulaires composées d'environ 1500 à 2000 cellules ayant un diamètre moyen de 150 μm , variant entre 50 μm et 400 μm [12, 13]. Ils sont composés de différentes cellules endocrines, soit α , β , δ , ϵ et pp [14-16] qui sécrètent chacune une hormone spécifique, respectivement le glucagon, l'insuline, la somatostatine, la ghréline et le polypeptide P. Le glucagon est sécrété lorsque le glucose sanguin est bas et il active la néoglucogénèse et la glycogénolyse afin de produire du glucose endogène [17]. La somatostatine est une hormone inhibitrice de la sécrétion des hormones digestives [18, 19]. La ghréline est sécrétée principalement par l'estomac, elle augmente la sécrétion d'hormone de croissance et elle régule l'apport alimentaire et l'équilibre énergétique [20]. Le rôle exact du polypeptide P est inconnu, mais il est impliqué dans la digestion [21]. La structure des îlots humains et de rongeurs est différente. Chez les rongeurs, les cellules β sont regroupées au centre et les autres cellules sont en périphérie [22],

alors qu'elles sont organisées plus aléatoirement chez les humains. La structure des îlots de rongeurs est représentée dans la figure A. Le pourcentage de chaque type cellulaire est légèrement différent, mais dans les deux cas, les cellules β sont les plus nombreuses [16, 23].

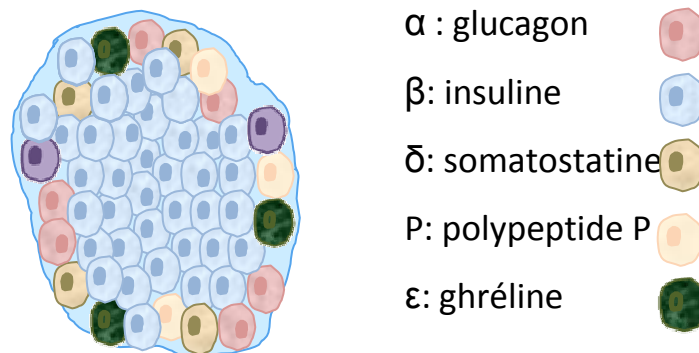


Figure A : Représentation de la structure des îlots de rongeurs. Un îlot de rongeur est constitué d'environ 85% de cellules β sécrétrices d'insuline, principalement situées au centre. Les autres cellules, α , δ , PP et ϵ , sont localisées en périphérie. Chaque type de cellule secrète une hormone différente, soit le glucagon, la somatostatine, le polypeptide P et la ghréline, respectivement.

Aussi, les îlots ont une grande demande métabolique. Ils sont très vascularisés [24-26] pour recevoir l'apport en oxygène adéquat et afin de détecter rapidement les variations de glucose sanguin et y répondent en sécrétant des hormones. Les îlots reçoivent environ 10% du flux sanguin total du pancréas même s'ils ne représentent que 1 à 2% de la masse du pancréas [27]. Le système vasculaire des îlots est très spécialisé et il ressemble à un glomérule : les

artérioles entrent vers le centre de l'îlot et le sang est ensuite drainé dans un réseau de capillaires vers la périphérie [26]. Ils reçoivent ainsi une pression partielle d'oxygène (pO_2) élevée, soit d'environ 40 mmHg. Aussi, les capillaires sont très fenestrés pour accélérer la sécrétion des hormones dans le sang [28].

A.1.3 Actions générales de l'insuline sur l'organisme

Après un repas, le glucose sanguin augmente et cette hausse est détectée par les îlots. Le glucose entre dans les cellules β via un transporteur de glucose membranaire, GLUT-2. Le glucose est oxydé par la glycolyse, ce qui génère de l'adénosine triphosphate (ATP). L'augmentation de la concentration d'ATP induit la fermeture des canaux potassiques, ce qui entraîne la dépolarisation de la cellule. Ceci amène l'ouverture des canaux calciques et une entrée de calcium dans la cellule. La phospholipase C (PLC) est alors activée et clive le lipide membranaire phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate en inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) et en diacylglycérol (DAG). IP3 lie un récepteur sur la membrane du réticulum endoplasmique (RE), ce qui entraîne le relâchement de calcium du RE et l'augmentation du calcium intracellulaire. Cette hausse déclenche l'exocytose des vésicules de sécrétion contenant l'insuline dans le sang. Ce mécanisme est illustré dans la figure B ci-dessous. Les acides aminés et les acides gras peuvent aussi stimuler la sécrétion d'insuline [29].

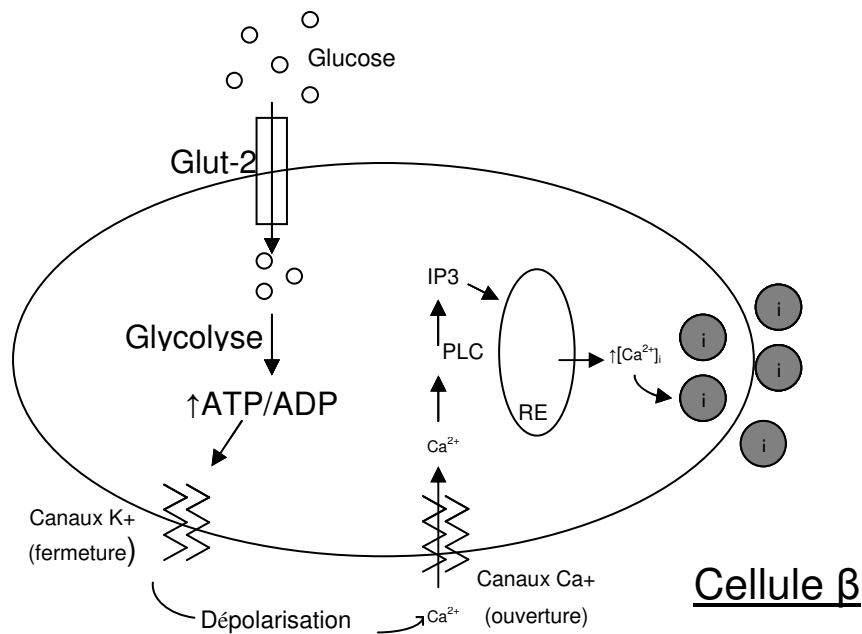


Figure B : Mécanisme de stimulation de la sécrétion d'insuline dans les cellules β . Le glucose sanguin entre dans les cellules β en liant le transporteur glut-2. Il entre dans la voie de la glycolyse, ce qui augmente le ratio ATP/ADP. Ceci induit la fermeture des canaux potassiques, une dépolarisation de la cellule, l'ouverture des canaux calciques et l'entrée de calcium. Cela entraîne l'activation de la PLC, puis de IP3, qui se lie au réticulum endoplasmique, ce qui entraîne le relâchement de calcium, puis l'exocytose des vésicules d'insuline dans le sang.

La sécrétion d'insuline est pulsatile et cette pulsatilité implique une coordination entre tous les îlots du pancréas. Il y a aussi une coordination entre les cellules β d'un îlot pour synchroniser leurs sécrétions. La dépolarisation de la membrane plasmique induite par le glucose se propage ainsi dans tout l'îlot. Des oscillations de concentrations de calcium intracellulaires sont donc observées et elles sont synchronisées entre les cellules β d'un même îlot. La coordination

intercellulaire se fait par un couplage électrophysiologique entre les cellules β via les jonctions communicantes, formées de connexines-36 [30].

L'insuline agit principalement sur le foie, les muscles, les adipocytes et le cerveau. L'entrée de glucose dans le cerveau est indépendante de l'insuline, mais elle y a toutefois un rôle dans le métabolisme énergétique [31]. L'insuline lie le récepteur insulinique sur la membrane plasmique. Le récepteur change alors de conformation et s'autophosphoryle. Les substrats du récepteur à l'insuline (IRS) sont activés et déclenchent une série de réactions intracellulaires. La voie PI3-kinase est activée et induit la translocation de GLUT, le transporteur de glucose, à la membrane plasmique afin que la cellule puisse faire entrer le glucose. Il y a cinq isoformes des GLUT, qui ont chacun une localisation et des particularités différentes. L'activation de la voie PI3-kinase inactive aussi la glycogène synthase kinase 3 (GSK3). Cette enzyme active alors la glycogène synthase et le glucose est emmagasiné sous forme de glycogène. Lorsqu'elle lie le récepteur d'insuline sur le foie, l'insuline inhibe la production de glucose en bloquant la néoglucogénèse et la glycogénolyse. L'insuline stimule aussi l'entrée d'acides aminés dans la cellule et la synthèse protéique. Elle stimule l'entrée d'acide gras, la synthèse lipidique et elle inhibe la lipolyse. L'insuline peut aussi activer la voie mitogénique MAPK [32]. Les actions générales de l'insuline sur l'organisme sont résumées à la figure C.

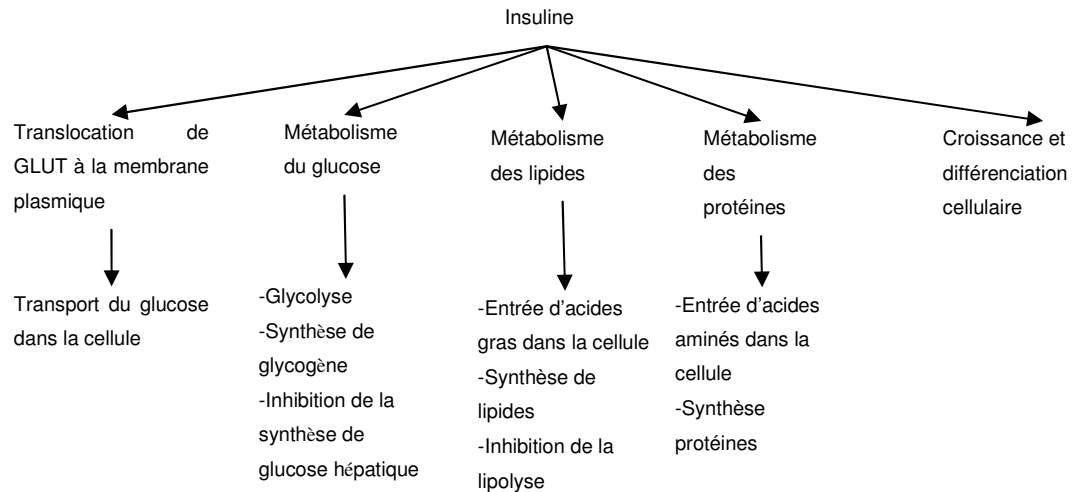


Figure C : Actions générales de l'insuline sur l'organisme. L'insuline joue plusieurs rôles dans l'organisme, comme la translocation des transporteurs de glucose à la membrane, le métabolisme du glucose, des lipides et des protéines, ainsi que l'activation de voies métaboliques cellulaires impliquées dans la croissance et la différenciation.

A.2. Les traitements du diabète

A.2.1 L'injection d'insuline exogène

Pour les patients ayant diabète de type 1, il existe peu de moyens pour contrôler le glucose sanguin: l'injection d'insuline est le plus commun. Pour ce faire, les patients doivent ajuster leurs doses d'insuline en mesurant leur glycémie environ quatre fois par jour. Les doses varient selon le repas, l'activité physique, le stress, les saisons, les cycles menstruels, etc. Ce traitement demande beaucoup d'attention et de rigueur : un mauvais contrôle de la glycémie peut mener à des

comas hypoglycémiques. Les pompes à insuline sont maintenant disponibles. Un capteur sous-cutané mesure la glycémie et la pompe libère automatiquement les doses d'insuline pour un contrôle plus précis et physiologique. La pompe libère continuellement de l'insuline de façon basale, selon une dose déterminée par l'utilisateur. Il doit aussi s'administrer des doses supplémentaires lors des repas, en appuyant sur un bouton sur la pompe.

A.2.2 La transplantation de pancréas et d'îlots

La transplantation de pancréas est un traitement possible et démontre un bon taux de succès [33]. Cependant, c'est une procédure qui nécessite une chirurgie importante et qui comporte un fort risque de rejet. Comme les risques associés à la chirurgie et les effets secondaires sont importants, c'est une transplantation réservée pour les cas très sévères de diabète ou en combinaison avec une autre greffe, comme le rein. Les cas sont considérés sévères lorsque la glycémie est difficilement contrôlée avec le traitement standard ou que le patient ait des hypoglycémies fréquentes.

La transplantation d'îlots est une alternative qui a comme avantages de nécessiter une chirurgie moins exhaustive et requiert un traitement immunosuppresseur moins agressif. Comme les îlots ne représentent que 1 à 2% de la masse totale du pancréas, ils sont moins immunogéniques que le pancréas complet. Cependant, le taux de succès de la transplantation d'îlots est encore limité. Entre 1990 et 1999, seulement 11% des patients recevant une transplantation d'îlots demeuraient insulino-indépendants pendant 1 an [34]. En

2000, le groupe d'Edmonton a obtenu des meilleurs résultats avec le « protocole d'Edmonton » [35]. Ils ont établi de nouvelles normes. Par exemple, ils ont amélioré la procédure d'isolation, ils ont augmenté la qualité et le nombre d'îlots à transplanter et ils ont modifié le cocktail d'immunosuppresseurs. Dernièrement, le *Collaborative Islet Transplant Registry group* (CITR) a rapporté que le taux d'indépendance à l'insuline avec de meilleurs immunosuppresseurs est de 45% un an après la transplantation et que la fréquence d'hypoglycémies a fortement diminuée [36]. La principale limitation de la transplantation d'îlots reste toutefois la survie limitée des îlots. La transplantation est efficace à court terme seulement. En plus, elle demande une très grande quantité d'îlots pour compenser leur faible viabilité. Une seule transplantation demande entre deux et quatre donneurs cadavériques [37].

Un des principaux désavantages de la transplantation d'îlots est qu'elle nécessite la prise d'immunosuppresseurs. Ceux-ci sont des composés qui peuvent mener à des effets secondaires importants. Ils diminuent la défense immunitaire contre les infections et les cancers [38, 39], ils peuvent être toxiques pour le rein et le foie et ils peuvent induire de l'hypertension [37, 40]. En plus, ils peuvent être dommageables pour les cellules β [41]. Comme la prise d'immunosuppresseurs a plusieurs effets négatifs importants, la transplantation d'îlots est réservée au cas de diabète les plus sévères. Le CTIR a rapporté que 35% des cas ont subi des effets secondaires dus à la chirurgie ou aux immunosuppresseurs. Il est possible d'éviter la prise d'immunosuppresseurs en

immuno-isolant les îlots à l'aide de la microencapsulation. La microencapsulation des îlots est donc un traitement qui permettrait d'éviter la prise d'immunosuppresseurs toxiques.

A.3 La microencapsulation

La microencapsulation est une technique permettant d'immunoprotéger les cellules transplantées. Elle permet d'éviter la prise d'immunosuppresseurs. La microcapsule est constituée d'une membrane semi-perméable qui permet la diffusion des petites molécules comme l'insuline, le glucose et l'oxygène, mais bloque l'accès des anticorps et des cellules du système immunitaire aux îlots. La microcapsule empêche les lymphocytes T de l'hôte de reconnaître les complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) du donneur et elle prévient la cytotoxicité des anticorps qui peuvent détruire le greffon et mener à l'échec de la greffe.

La microencapsulation est utilisée dans des cas de maladies endocriniennes. Elle permet de les traiter en remplaçant les cellules défectueuses. Par exemple, des hépatocytes [42] et des cellules parathyroïdiennes [43] ont pu être transplantés avec succès. Des recherches sont en cours pour le traitement de maladies dégénératives telles les maladies d'Huntingdon et le Parkinson [44, 45].

La transplantation d'îlots nécessite un très grand nombre d'îlots. Comme il y a peu de donneurs, peu de patients pourraient bénéficier d'une transplantation. Une alternative à ce manque de donneurs est l'utilisation d'îlots d'origine animale

(xénogreffe). Toutefois, il y a plusieurs craintes face à la xénogreffe, à cause des infections animales et du rejet qu'elle pourrait amener. La microcapsule pourrait contrer le manque de donneurs puisqu'elle pourrait permettre la xénogreffe en protégeant l'îlot du système immunitaire. Quelques études ont montré que la xénogreffe peut être fonctionnelle avec la microencapsulation, mais que le taux d'échec est encore très élevé [46-48].

A.3.1 Historique de l'immunoisolation

Chang a été le premier à développer le concept d'immunoisolation en 1964 [49]. Par la suite, des dispositifs intravasculaires ont été développés [50, 51], mais les complications vasculaires ont limité leur utilisation [52]. Les dispositifs extravasculaires ont alors été mis au point. Plusieurs types de dispositifs différents ont été créés comme les macrocapsules et les chambres de diffusion en forme de disque ou de tube. Des microcapsules ont ensuite été élaborées. La microencapsulation d'îlots a été mise au point par Lim et Sun en 1980 [53]. En transplantant des îlots microencapsulés, ils ont réussi à normaliser la glycémie chez le rat diabétique pendant 2 à 3 semaines, alors que les îlots non encapsulés étaient fonctionnels seulement 6 à 8 jours.

Des essais ont été faits dans différents modèles animaux avec des réussites variant de quelques mois à plus d'un an [54-57]. La première transplantation d'îlots microencapsulés dans un grand modèle animal a été faite en 1992 chez le chien. Elle a été une réussite pour 7 à 24 semaines. L'une des premières

transplantations bien documentée d'îlots microencapsulés chez les humains a aussi eu lieu dans les années 1990 [58]. L'indépendance à l'insuline n'a pas été atteinte, mais le greffon s'est avéré fonctionnel et les doses d'insuline requises ont été diminuées. Deux études cliniques récentes ont montré que malgré que l'indépendance à l'insuline ne soit pas atteinte, le transplant est fonctionnel parce qu'il y a production de peptide C et parce que la glycémie des patients est améliorée et qu'ils subissent moins d'épisodes hypoglycémiques [59, 60].

A.3.2 Techniques de microencapsulation

Plusieurs matériaux peuvent être utilisés pour microencapsuler des cellules, comme le polyéthylène glycol (PEG), l'agarose, le chitosan, le polyhydroxyethylmetacrylate-méthyl methacrylate (HEMA-MMA) ou des polymères d'acétonitrile. Le matériel le plus commun pour la microencapsulation est l'alginate, un polysaccharide isolé des algues. C'est un hydrogel qui permet l'encapsulation des cellules dans des conditions physiologiques. Il est composé d'acides β -D-mannuroniques (M) et de α -L-guluroniques (G).

Pour microencapsuler les îlots, ceux-ci sont mis en solution avec l'alginate et il y a formation de microgouttelettes qui polymérisent dans une solution dicationique de baryum ou de calcium. Différentes techniques peuvent être utilisées pour former des microgouttelettes : la vibration, le jet d'air ou l'émulsion. La technique utilisée au laboratoire est l'application d'un champ électromagnétique. L'alginate est poussé à travers une aiguille à vitesse constante

et le champ électromagnétique permet que l'alginate s'écoule sous forme de microgouttelettes et tombe dans la solution gélifiante.

A.3.3 Cause de l'échec de la transplantation d'îlots microencapsulés

La transplantation d'îlots microencapsulés a un fort potentiel. La réussite de la transplantation est cependant d'une durée limitée puisque la survie des îlots est limitée. En effet, il a été montré que, suite à la transplantation d'îlots microencapsulés, il y a une perte d'environ 40% de la masse des cellules β [55]. Les causes exactes de cette mort cellulaire sont inconnues. Toutefois, elle ne serait pas due à un rejet causé par la reconnaissance de l'allogreffe, puisque les autogreffes et les allogreffes ont le même taux de survie [61]. La section suivante présente les causes possibles de l'échec de la greffe et elles sont résumées dans la figure D.

La biocompatibilité des microcapsules

Le manque de biocompatibilité de la microcapsule peut être l'une des causes de l'échec de la greffe. Lorsque que le système immunitaire reconnaît un corps étranger non biocompatible, une réponse immunitaire s'active. Il y a adhésion de protéines à la surface des microcapsules, activation des macrophages et des fibroblastes, puis il y a une fibrose qui se forme autour des microcapsules. La biocompatibilité des microcapsules d'alginate dépend de la composition et de la pureté de l'alginate, ainsi que de l'intégrité des microcapsules. L'alginate non

purifié contient des contaminants, comme des protéines, des endotoxines et des polyphénols [62, 63]. Plusieurs études ont montré que l'alginate doit être purifié pour être biocompatible [64, 65]. L'intégrité des microcapsules est importante puisque des irrégularités ou des microcapsules instables peuvent activer la réponse immunitaire [61, 66]. Aussi, certains îlots peuvent être incomplètement encapsulés et ils peuvent être reconnus par le système immunitaire et être responsables du manque de biocompatibilité [67].

L'inflammation non spécifique est l'une des causes de l'échec de la greffe et elle serait causée en partie par les macrophages [68, 69]. Ceux-ci seraient responsables de la perte de fonction des îlots [70]. Ils sécrètent des cytokines comme de l'interleukine-1 β (IL-1 β), du *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) et de l'interféron- γ (INF- γ), qui sont néfastes pour les cellules β [71]. Lorsqu'ils sont stimulés par ces cytokines, les îlots sécrètent alors des cytokines qui attirent et activent encore plus de macrophages, ce qui crée un cercle vicieux et nuit encore plus à la biocompatibilité [72, 73]. Il faut noter que les cytokines peuvent pénétrer dans la microcapsule puisque celle-ci permet aux molécules de poids moléculaire inférieurs à environ 45KDa de diffuser à l'intérieur de la microcapsule [74].

Les dommages causés par l'isolation des îlots

Une autre cause de la mort des îlots est le processus d'isolation des îlots du pancréas. Il cause des stress mécaniques et chimiques et il soumet les îlots à un manque d'oxygène. Ces facteurs diminuent le rendement et la qualité des îlots.

La digestion du pancréas détruit l'environnement trophique, la matrice extracellulaire (MEC), les vaisseaux sanguins et les nerfs entourant les îlots. Ces changements structuraux induisent une mort cellulaire importante due à l'apoptose [75-77]. En plus, les îlots isolés relâchent une plus grande quantité de cytokines et ils ont une diminution de la sécrétion d'insuline par rapport aux îlots situés dans le pancréas [78, 79].

L'hypoxie

Une des causes les plus importantes de la mort cellulaire post-transplantation est l'hypoxie puisque la microcapsule empêche la revascularisation des îlots. Leur oxygénation dépend donc uniquement de la diffusion d'oxygène. Comme l'oxygène a une distance de diffusion limitée (150-200 μm) [80], plusieurs îlots sont soumis à de l'hypoxie. Il y a des gradients de pO_2 à l'intérieur des îlots, pouvant passer de 40mmHg en périphérie de l'îlot à 0 mmHg à l'intérieur [81]. L'hypoxie entraîne une diminution de la sécrétion d'insuline [82], une augmentation de la mort cellulaire et ultimement, l'échec de la greffe [83-86]. Le présent projet de recherche porte sur cette cause de l'échec de la greffe.

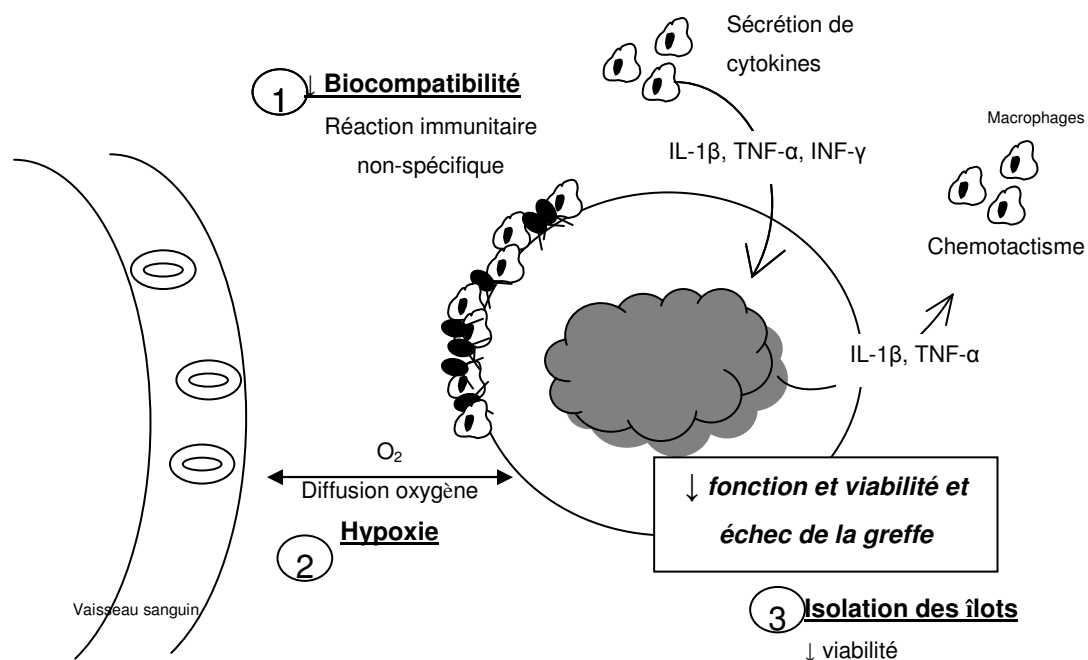


Figure D : Représentation des trois causes les plus importantes de l'échec de la transplantation microencapsulés. 1) la biocompatibilité, 2) l'hypoxie, 3) l'isolation des îlots. Une microcapsule non biocompatible favorise l'adhésion de protéines et de macrophages à sa surface. Ceux-ci sécrètent des cytokines dommageables pour les îlots, qui en sécrètent à leur tour, ce qui attire plus de macrophages et crée un cercle vicieux. Plus la distance entre les vaisseaux sanguins et les microcapsules est grande, moins les îlots recevront d'oxygène et plus ils seront exposés à de l'hypoxie néfaste. Finalement, l'isolation des îlots détruit l'environnement trophique de l'îlot, ce qui diminue sa viabilité.

A.4. Réponse des îlots à l'hypoxie

A.4.1 Définition de l'hypoxie

L'oxygène a une importance primordiale pour l'organisme, car il est responsable de la production de la majorité de l'énergie cellulaire, l'ATP. Après son entrée dans la cellule, le glucose entre dans la voie de la glycolyse et il est transformé en pyruvate avec une production finale de deux ATP. Le pyruvate entre alors dans le cycle de Krebs avec la production de l'équivalent de un ATP, ainsi que des molécules ayant un pouvoir réducteur qui seront utilisées dans la phosphorylation oxydative. L'oxygène, dans la chaîne de transport mitochondriale, attire les électrons pour fournir le gradient de protons nécessaire à la phosphorylation oxydative, nécessaires à la formation de l'ATP. Au total, une molécule de glucose produit de 36 à 38 ATP en aérobie. En anaérobie, il y a tout de même production d'ATP, mais en quantité beaucoup moindre. La cellule active la glycolyse anaérobie où le glucose est métabolisé en pyruvate avec la formation de 2 ATPs, puis le pyruvate est métabolisé en lactate avec production de deux ATPs.

L'hypoxie, en causant un manque d'ATP, affecte plusieurs fonctions cellulaires importantes. De plus, il est bien connu que les cellules exposées à des stress environnementaux déclenchent la mort cellulaire par apoptose, via la régulation des membres de la famille Bcl-2. L'apoptose est déclenchée lorsque la proportion de protéines pro-apoptotiques est plus grande que les anti-

apoptotiques. Le manque d'oxygène entraîne l'apoptose puisque le bon fonctionnement des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 est dépendant de l'entrée l'ATP dans la mitochondrie [87].

A.4.2 Rôle de HIF-1

Un des acteurs importants de la réponse à l'hypoxie est le *hypoxia inducible factor-1* (HIF-1). C'est un facteur de transcription hétérodimérique composé de HIF-1 α et HIF-1 β [88]. En présence de concentrations normales d'oxygène, HIF-1 α est hydroxylé, ubiquitiné et dégradé par le protéasome. Lors d'hypoxie, l'hydroxylase est inhibée, HIF-1 α est stabilisé et il est alors libre de lier HIF-1 β pour former le facteur de transcription actif. Il lie le *hypoxia response element* (HRE) situé dans le promoteur de plusieurs gènes et il active la transcription des gènes impliqués dans la réponse à l'hypoxie [89, 90].

Il semble que HIF-1 ait un double rôle : un rôle d'adaptation à l'environnement et un rôle d'activation de l'apoptose dans des cellules qui ne peuvent pas survivre à cet environnement. En effet, HIF-1 déclenche d'abord une réponse protectrice permettant à la cellule de s'adapter au manque d'oxygène. Par exemple, HIF-1 permet à la cellule d'augmenter son apport en oxygène, en activant des gènes impliqués dans l'angiogénèse, comme le VEGF [83, 91]. Des mécanismes modifiant le métabolisme cellulaire peuvent être activés pour compenser le manque d'énergie. La cellule peut augmenter l'entrée de glucose en augmentant la transcription de *glut-1* [92]. Elle peut passer en glycolyse anaérobie en augmentant la transcription de la lactate déshydrogénase et

l'aldolase [83, 93]. Si l'hypoxie est trop sévère ou chronique pour que la cellule puisse s'adapter, l'apoptose est déclenchée [83, 94, 95].

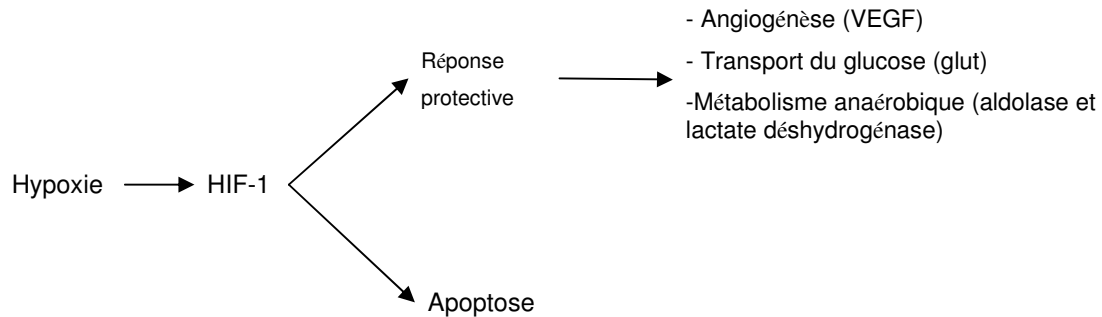


Figure E : Double rôle de HIF-1 et exemples de réponse protectrice des îlots. La cellule répond à l'hypoxie en activant des mécanismes protecteurs, comme l'augmentation de son apport en oxygène et en glucose. Si ces mécanismes ne suffisent pas à rétablir des niveaux d'énergie adéquats, la cellule déclenche les mécanismes d'apoptose.

A.4.3 Effet de l'hypoxie sur les îlots

Comme mentionné précédemment, l'hypoxie est très dommageable pour les îlots. Lors d'un manque d'oxygène, les îlots passent en glycolyse anaérobie et ils produisent du lactate [96]. L'hypoxie affecte directement la fonction [82] puisque la sécrétion d'insuline en réponse au glucose est ATP-dépendante. Par exemple, lorsque la pO_2 est de 27 mmHg, la sécrétion d'insuline en réponse au glucose est diminuée de 50%. L'hypoxie peut aussi causer une importante augmentation de la mort cellulaire. Des noyaux picnotiques sont identifiés après seulement six heures d'incubation à 1% d'oxygène et le centre des îlots est complètement dégradé après 48 heures [83]. L'activation de HIF-1 lors du

manque d'oxygène a été démontrée chez les îlots et elle a été corrélée avec l'expression de la caspase-3, protéine impliquée dans l'apoptose [83, 97].

Il a aussi été démontré que l'hypoxie induit l'expression de l'*inducible nitric oxide synthase* (iNOS) dans les îlots [86, 98]. Le iNOS est responsable de la production de l'oxyde nitrique (NO), un radical libre très dommageable pour les cellules. Dans d'autres types cellulaires, il a été montré que l'expression de iNOS peut être activée par HIF-1 [99, 100]. L'hypoxie active aussi la *AMP-activated protein kinase* (AMPK) dans les cellules β [101]. Dans ce cas, la caspase-3 est activée et la production de radicaux libres dommageables pour les cellules est augmentée. Finalement, l'hypoxie augmente aussi l'expression de *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) dans les îlots microencapsulés [98]. MCP-1 est une cytokine qui attire des macrophages et d'autres cellules immunitaires [102]. Ainsi, en plus des conséquences sur la fonction et la survie, l'hypoxie peut aussi mener à l'échec de la greffe en contribuant à diminuer la biocompatibilité de la microcapsule.

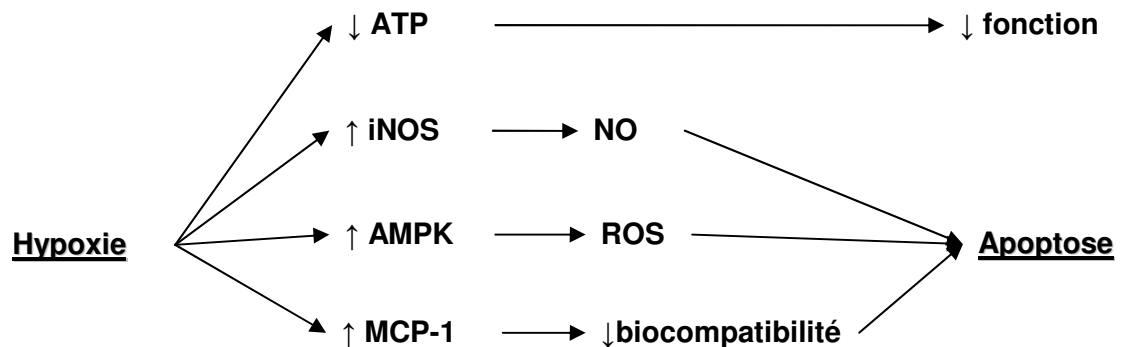


Figure F : Effets de l’hypoxie sur les îlots. L’hypoxie diminue l’ATP dans la cellule, ce qui affecte la sécrétion d’insuline. Aussi, elle induit l’activation de plusieurs protéines, telles que iNOS, AMPK et MCP-1, qui mènent toutes ultimement à l’apoptose.

A.5 Facteurs limitant la diffusion d’oxygène

A.5.1 Le site de transplantation

Puisque l’hypoxie est responsable de la perte de fonction des îlots, de la mort cellulaire et de l’échec de la greffe, il serait profitable d’améliorer l’oxygénation des îlots. À part le fait que les îlots microencapsulés ne soient pas revascularisés, d’autres facteurs limitent la diffusion d’oxygène dans les îlots. Un de ces facteurs est le site de transplantation parce qu’il détermine la pO_2 que le transplant recevra, ainsi que la distance entre les vaisseaux sanguins et les microcapsules. Le site de transplantation pour les îlots microencapsulés est le péritoine parce que c’est le seul qui soit assez volumineux pour accueillir les microcapsules. Ce n’est pas un site idéal puisqu’il est peu vascularisé, les

microcapsules ne sont pas en contact direct avec les vaisseaux et il contient beaucoup de macrophages. Le sang qui oxygène les îlots du pancréas a une pO_2 d'environ 40 mmHg, alors que la concentration d'oxygène dans le péritoine est très variable dépendamment de la proximité des vaisseaux sanguins. Il serait important de trouver de nouveaux sites de transplantation mieux oxygénés et plus adéquats pour améliorer le succès de la transplantation. Des sites intéressants seraient la capsule rénale et la veine portale. Ces sites ont des pO_2 d'environ 15 mmHg [103]. Ce n'est pas aussi élevé que dans le pancréas, mais au moins, toutes les microcapsules recevraient la même concentration d'oxygène. À 15 mmHg, la sécrétion d'insuline serait diminuée d'environ 80% [82].

A.5.2 La microcapsule

Pour avoir accès à la capsule rénale ou la veine portale comme site de transplantations, la microcapsule doit être de plus petite taille puisque ces sites ont un volume plus limité que le péritoine. En plus, diminuer la taille de la microcapsule améliorerait aussi l'oxygénation des îlots. Plus la microcapsule est grande, plus l'oxygène a une grande distance à parcourir pour atteindre les îlots.

A.5.3 La taille de l'îlot

La taille des îlots peut aussi être diminuée pour améliorer la diffusion d'oxygène. Deux études ont montré que les îlots les plus petits sont les plus résistants à l'hypoxie [104, 105]. Mon projet de recherche consiste à diminuer la

taille des îlots pour que l'oxygène puisse mieux diffuser et atteindre toutes les cellules. De cette façon, les îlots microencapsulés subiraient moins les dommages causés par l'hypoxie et ils seraient plus efficaces pour normaliser la glycémie des patients diabétiques.

A.6 Les agrégats de cellules dispersées d'îlots pour améliorer la diffusion d'oxygène

A.6.1 Les agrégats de cellules dispersées d'îlots

Pour diminuer la taille des îlots, les agrégats seront utilisés. Il est connu que lorsque les îlots sont dispersés en cellules simples, celles-ci ont la propriété de se ré-associer en une structure semblable à celle des îlots. Les agrégats sont de plus petite taille que les îlots, tout en conservant la composition et l'organisation cellulaire des îlots de rongeurs. La microscopie électronique a permis de déterminer que l'ultrastructure cellulaire et les connections intercellulaires sont aussi préservées [106]. De plus, les agrégats sécrètent de l'insuline en réponse au glucose comme les îlots, de façon biphasique et proportionnellement à la concentration de glucose [106-113]. Quelques études ont aussi remarqué que les agrégats contenaient très peu de centres de nécrose comparativement aux îlots, et ce même lorsque cultivés *in vitro* à long terme [106, 112, 114]. Il a aussi déjà été montré que les agrégats non encapsulés, lorsque transplantés dans des rats, peuvent restaurer la normoglycémie, avec des doses réduites d'immunosuppresseurs [115].

A.6.2 L'organisation cellulaire des agrégats

Les premières études portant sur les agrégats avaient pour but de comprendre les mécanismes régissant l'organisation cellulaire particulière des îlots. Il s'agissait de comprendre pourquoi les cellules conservaient l'information nécessaire à l'organogenèse même une fois différenciées. Il a été montré que les *cell adhesion molecules* (CAMs) sont les molécules responsables pour cette organisation.

Les cellules β expriment surtout des E-cadhérines (ECAD) [116, 117] alors que les autres cellules expriment plutôt les *neurals cell adhesion molecules* (NCAMs) [118-120]. Selon la théorie de l'adhésion différentielle, dans les regroupements cellulaires comme les îlots, les cellules ayant la plus forte force cohésive se retrouvent au centre de l'amas cellulaire et les cellules ayant les liens les plus faibles se retrouvent en périphérie [121, 122]. Les liens intercellulaires ont des forces d'adhésion différentes selon la CAM impliquée. Dans les îlots de rongeurs, les cellules β se regrouperaient donc au centre puisque les liens homotypiques formés par les E-cadhérines sont plus forts que ceux des NCAMS [123]. Les connexines-36 sont aussi impliquées dans les liens entre les cellules β et elles forment des jonctions communicantes [124].

A.6.3 La fonction est dépendante de la structure

Les ECAD sont des protéines transmembranaires dépendantes du calcium impliquées dans les interactions intercellulaires homotypiques [125]. Leur domaine extracellulaire forme des liens homodimériques avec les cellules adjacentes. Le domaine cytoplasmique interagit avec les α - et β -caténines, qui relient les ECAD au cytosquelette d'actine. De plus, les ECAD auraient un rôle dans la signalisation intracellulaire de voies impliquées dans la prolifération (Wnt), des voie des récepteurs tyrosine kinases, Rho GTPase [126] et PI3-kinase [127].

Les liens intercellulaires sont importants pour la sécrétion d'insuline [128-130]. En effet, les cellules β dispersées secrètent peu ou pas d'insuline en réponse au glucose [111, 129, 131]. Plusieurs études suggèrent que ECAD aurait aussi un rôle dans la sécrétion d'insuline. Par exemple, la sécrétion d'insuline est proportionnelle à leur expression [132] et lorsque ECAD est bloqué, la synchronisation des oscillations de calcium est abolie et la sécrétion d'insuline est réduite [128]. Le contenu et la sécrétion basale d'insuline sont augmentés lorsque ECAD est supprimé dans les cellules MIN6, mais pas la sécrétion stimulée par le glucose [133]. De plus, une étude a montré que lorsque le *hepatocyte nuclear factor-1 α* (HNF-1 α) est inhibé dans les îlots, l'expression des ECAD et la sécrétion d'insuline sont diminuées. Les augmentations de calcium intracellulaires et la réponse au glucose sont abolies [134]. Par ailleurs, lorsque NCAM est surexprimé, l'organisation cellulaire est modifiée et la fonction

cellulaire est altérée [135]. Finalement, un autre signe que ECAD est impliqué dans la sécrétion d'insuline est à cause de son interaction avec l'actine (via les caténines). Lorsque la dépolymérisation de l'actine est inhibée par la latrunculine, la sécrétion d'insuline en réponse au glucose est augmentée. Aussi, le glucose modulerait l'organisation de l'actine et l'exocytose des granules de sécrétion d'insuline [136]. En plus, les connexines-36 des cellules β seraient impliquées dans les oscillations de calcium et influenceraient la sécrétion d'insuline [137].

Bref, les contacts intercellulaires dans un îlot sont très importants pour la sécrétion d'insuline, mais le mécanisme exact est encore inconnu. Ceci expliquerait que les cellules β isolées ne fonctionnent pas. Lors de formation des agrégats, la structure cellulaire est conservée, les contacts intercellulaires se reforment et la sécrétion d'insuline peut alors être restaurée.

Les agrégats sont donc des structures cellulaires similaires aux îlots. Comme mentionné précédemment, les études faites auparavant ont été faites pour comprendre l'organisation des îlots. Quelques études ont voulu utiliser les agrégats pour les transplanter, mais ils ont réalisé que la perte cellulaire lors de leur formation était trop importante et ils ont abandonné cette stratégie. Nous croyons que les agrégats pourront être avantageux : à cause de leur petite taille, ils seront plus résistants à l'hypoxie. Le faible rendement d'agrégation sera compensé par une meilleure viabilité et des techniques pourront être élaborées pour minimiser la perte cellulaire.

A.7. Hypothèses et objectifs du projet

Pour cette étude, les agrégats seront étudiés pour leur petite taille. Cet avantage sera utilisé pour améliorer la résistance à l'hypoxie des îlots et améliorer les succès des transplantations d'îlots microencapsulés.

L'hypothèse du projet est que, puisqu'ils sont plus petits que les îlots, les agrégats seront plus résistants à l'hypoxie et ils pourront normaliser la glycémie plus efficacement.

L'étude a donc pour but général de vérifier si les agrégats sont plus résistants à l'hypoxie que les îlots. Plus spécifiquement, mon projet consiste à mettre au point la technique de formation des agrégats, de les caractériser, de comparer leur résistance à l'hypoxie à celle des îlots et de mieux comprendre la diffusion d'oxygène et la réponse à l'hypoxie des îlots.

Le présent mémoire est composé de trois sections de résultats : 1) formation et caractérisation des agrégats, 2) comparaison de la résistance à l'hypoxie et 3) expériences supplémentaires consistant à mieux comprendre la diffusion de l'oxygène, la réponse à l'hypoxie et fabriquer des microcapsules plus adaptées aux agrégats.

B. Formation et caractérisation des agrégats

La première étape du projet a été de mettre au point la technique de formation des agrégats et de les caractériser. L'organisation cellulaire des agrégats a été déterminée et des expériences ont été faites pour vérifier leur sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Ce sont deux facteurs très importants pour la suite du projet.

B.1 Matériel et méthodes

Formation des agrégats

Les descriptions de l'isolation des îlots et de la formation des agrégats sont décrites dans la section C.3.

Organisation cellulaire (immunohistochimie/immunofluorescence)

L'organisation cellulaire des agrégats a été vérifiée par immunohistochimie et immunofluorescence. À cette fin, les cellules d'îlots dispersées ont été incubées à 37°C, 21% O₂ et 5% CO₂ afin de former des agrégats, puis environ 200 agrégats ont été sélectionnés après 3, 4, 5 et 6 jours, ainsi que 200 îlots après 6 jours. Ils ont été fixés dans le formol, puis dans l'agarose, emparaffinés et tranchés en coupes de 5 µm. Pour le marquage, les coupes ont alors été déparaffinées et traitées successivement avec de la trypsine, une peroxidase, un bloqueur de protéines universel, puis l'anticorps. Les cellules β ont été détectées avec un anticorps anti-insuline (10 minutes à la température de

la pièce, anticorps de cochon d'inde, prêt à l'usage, DAKO Diagnostics Inc (Mississauga, ON, Canada)). Les cellules α ont été détectées avec un anticorps anti-glucagon et les cellules δ avec un anticorps anti-somatostatine (incubation 18h, à 4°C, 1:100 et 1:200 respectivement, anticorps anti-lapin, Abcam, (Cambridge MA, USA)). Les lames ont ensuite été rincées avec une solution bicarbonate phosphate (PBS), puis l'anticorps secondaire a été appliqué. L'insuline a été détectée par immunohistochimie et le glucagon et la somatostatine ont été détectés par immunofluorescence. Pour le premier, le Kit LSAB2 (anticorps secondaire biotiné et streptavidine conjugué au HRP) a été utilisé comme anticorps secondaire et le diamino-3,3'benzidine (DAB) a été utilisé comme substrat, tous avec des incubations de 30 minutes. Les noyaux ont été colorés avec de l'hématoxyline et les lames ont été montées avec de l'*ultramount* chauffé 30 minutes à 70°C, puis les sections ont été observées au microscope optique. L'anticorps secondaire utilisé pour l'immunofluorescence était conjugué au FITC (incubation 10 minutes, 1:100, Invitrogen Life technologies, Burlington, ON, Canada) et les noyaux ont été colorés avec le DAPI (Vector laboratories, Burlingame, CA USA), puis les lames ont été observées au microscope fluorescent.

Évaluation de la fonction (Sécrétion d'insuline en réponse au glucose)

Pour évaluer la fonction des agrégats, la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose a été mesurée. Brièvement, 100 agrégats et îlots ont été sélectionnés et ils ont été mis dans des filtres de 40 μ m (Becton Dickinson, Mississauga, On, Canada) placés dans des pétris contenant du milieu de culture. Les îlots et les

agrégats ont été incubés 30 minutes à 37°C, 21% O₂ et 5% CO₂ dans une solution de RPMI contenant 3,3 mM de glucose, puis incubés successivement 2 heures dans du RPMI contenant 3,3mM, puis 16,5mM de glucose à 37°C, 21% O₂ et 5% CO₂. Les surnageants ont été conservés et l'insuline sécrétée a été dosée avec un essai radioimmunologique (Linco research, St. Charles, MO, USA) selon les indications du fabricant.

Tests statistiques

Tous les résultats présentés dans cette étude sont exprimés comme une moyenne \pm SEM. Les tests statistiques effectués sont des tests de t student apparié et où $p < 0,05$ est considéré significatif.

B.2 Résultats

B.2.1 Formation des agrégats

Afin de former des agrégats de structure semblable à celle des îlots, plusieurs techniques ont été expérimentées. La méthode la plus simple s'est avérée la plus efficace, soit de dissocier les îlots en cellules simples avec de la trypsine et de l'EDTA, d'incuber les cellules dans un pétri de polystyrène (non adhérent) et de les laisser s'agréger pendant 6 jours. La figure 1 montre les différentes étapes de formation des agrégats, soit la dispersion des cellules (J0), l'alignement (J1), les cellules prenant une forme sphérique (J2), puis la formation finale des agrégats (J3 à J6).

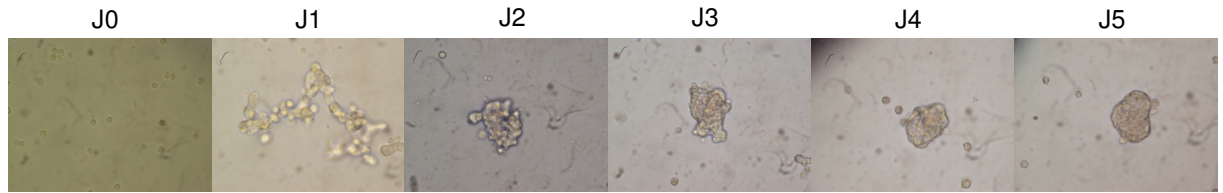


Fig. 1 : Formation des agrégats. Photos représentatives des différentes étapes de formation des agrégats prises chaque jour après la dispersion des îlots, grossissement 10x.

B.2.2 Organisation cellulaire

Comme mentionné précédemment, les îlots de rats ont une organisation cellulaire particulière avec les cellules β regroupées au centre et les autres types de cellules localisées en périphérie. Il est important de vérifier que les agrégats possèdent aussi cette structure, puisque la fonction est influencée par l'organisation cellulaire. Pour ce faire, les cellules β ont été détectées par immunohistochimie contre l'insuline et les cellules α et δ ont été détectées par immunofluorescence contre le glucagon et la somatostatine respectivement. Les techniques sont différentes puisqu'elles étaient plus efficaces selon l'anticorps utilisé. Les résultats (fig. 2) montrent que les agrégats sont constitués d'une majorité de cellules β et que les autres cellules sont en périphérie, comme les îlots isolés et les îlots du pancréas. L'organisation cellulaire des agrégats a été vérifiée à chaque jour de formation (de J3 à J6) afin suivre l'organisation cellulaire avec le temps. Seulement les résultats représentatifs de J3 et J6 sont présentés dans la Fig. 2. Dès le 3^e jour, la conformation est adéquate.

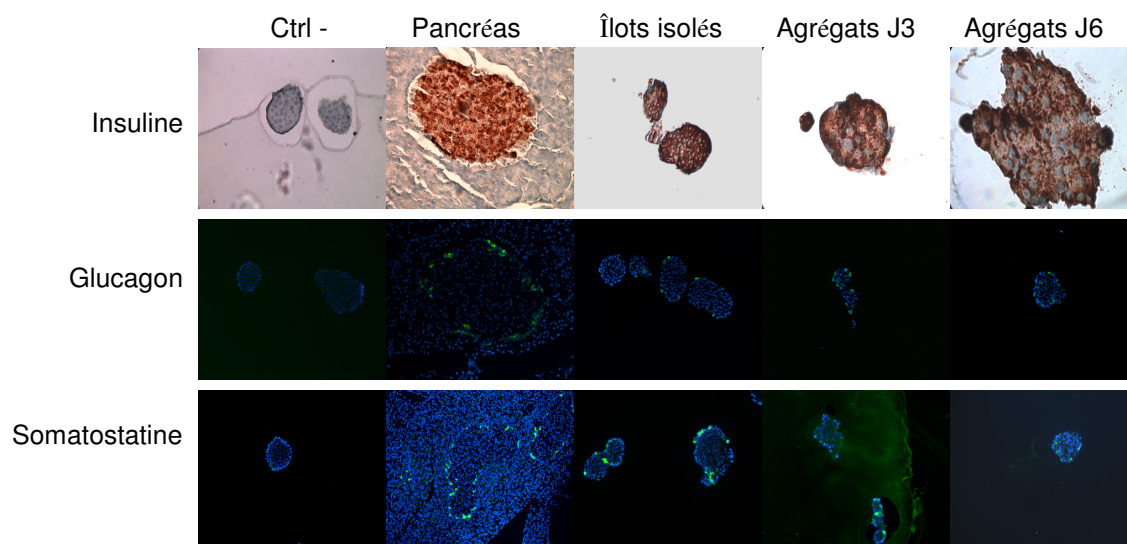


Fig. 2 : Organisation cellulaire des agrégats. La disposition des cellules β (insuline), α (glucagon) et δ (somatostatine) dans les îlots dans le pancréas, les îlots isolés, les agrégats après 3 et 6 jours de formation. Photos d'immunohistochimie et immunofluorescence représentatives pour chaque condition. *Expériences réalisées par Rania Gosselin-Papadopoulos (stagiaire été 2009) et Geneviève Langlois (assistante de recherche automne 2009)

B.2.3 Fonction

L'étape suivante a été de vérifier si les agrégats étaient fonctionnels. La fonction des agrégats a été évaluée comparativement à celle des îlots en mesurant la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Pour ce faire, les îlots et les agrégats sont incubés dans des milieux de culture ayant des concentrations de

glucose différentes (3,3 mM et 16,5 mM) puis l'insuline du surnageant est dosée à l'aide d'un essai radioimmunologique.

L'expérience n'a pas donné les résultats attendus pour ce qui est des îlots, qui sont un contrôle positif (Fig. 3). Il n'y a pas une augmentation de la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose aussi importante que celle décrite dans la littérature. La sécrétion d'insuline stimulée par le glucose des îlots n'est même pas le double (1,49 fois plus élevée) du niveau basal de glucose, alors qu'elle devrait être au moins quatre fois plus élevée [57, 76, 138]. Pour ce qui est des agrégats, l'augmentation moyenne de sécrétion d'insuline en réponse au glucose est semblable à celle des îlots, mais la réponse est plus variable.

La sécrétion basale des agrégats est plus faible que celle des îlots ($5,71 \pm 1,02$ ng/mL vs $7,62 \pm 0,61$ ng/mL). Il faut cependant tenir compte que pour chaque expérience, 100 îlots ou 100 agrégats ont été évalués. Il est clair que puisqu'ils sont de plus petites tailles (Section C.4.1), 100 agrégats contiennent moins de cellules β que 100 îlots. Il est attendu que la quantité d'insuline soit donc plus faible pour les agrégats. Ce qui importe est la différence entre le basal (3,3mM) et le stimulé (16,5mM). Toutefois, aucune conclusion fiable ne peut être tirée de ces expériences puisque les résultats sont trop variables. Les expériences doivent être répétées un nombre plus élevé de fois et la technique doit être améliorée pour plus de précision.

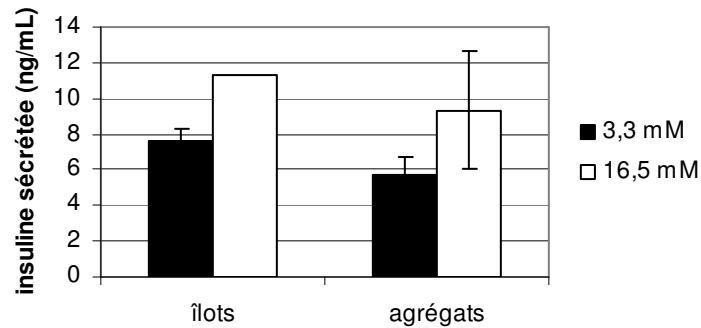


Fig.3. Sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Concentration d'insuline (ng/mL) dans le surnageant après 2 heures d'incubation dans un milieu de culture avec une concentration de glucose de 3,3mM (basal) et 16,5mM (stimulé) de 100 îlots ou 100 agrégats, incubés 7 jours à 21% O₂. L'insuline mesurée par un essai radioimmunologique. n entre 1 et 3, ns.

B.3 Discussion

B.3.1 Formation des agrégats

Quelques études ont aussi observé les quatre étapes de formation présentées à la figure 1 [106, 108, 111, 112]. Le groupe de Ono *et al* a montré, par tournage cinématographique, que la formation des agrégats se fait par accumulation des cellules et non par réplication [112]. En plus, *in vivo*, la réplication des cellules β est plutôt faible [139].

La formation des agrégats semble sujette à une grande variabilité selon la technique, l'enzyme et la concentration de cellules utilisées. Les techniques qui ont été expérimentées sont la culture en gouttelettes suspendues et l'incubation avec agitation des cellules. La première consiste à incuber les cellules dispersées sous forme de gouttelettes déposées sur le couvercle d'un pétri rempli de PBS. Cette technique aurait l'avantage de former des agrégats de forme et de taille plus uniformes [109]. Les tentatives pour reproduire cette technique ont cependant échoué ; les cellules ne survivaient pas ou ne formaient qu'un seul gros amas cellulaire. La deuxième technique, l'incubation avec agitation, a aussi été testée puisque le groupe de Matta *et al* [111] affirme qu'une plus grande quantité d'agrégats serait formée de cette manière. Cette méthode permettrait d'obtenir une plus faible proportion d'agrégats ne contenant que des cellules β . Il semble cependant que les agrégats seraient de plus grande taille, ce qui n'est pas avantageux pour ce projet. En plus, un groupe a montré que les agrégats formés que de cellules β seraient aussi performants que les agrégats de même composition que les îlots [140]. Cependant, comme la sécrétion d'insuline peut être influencée par les hormones sécrétées par les autres cellules, il sera important de vérifier si la composition des cellules influence la fonction des îlots. Les tentatives de reproduire cette technique ont aussi échoué. Finalement, la technique qui a fonctionné s'est avérée simple et efficace.

Il y a des modifications qui peuvent être faites au protocole pour améliorer l'agrégation. Entre autre, une autre enzyme que la trypsine aurait pu être utilisée

pour dissocier les îlots ; la dispase. Matta *et al* ont montré que le rendement d'agrégation est supérieur lorsque cette enzyme est utilisée [111]. La dispase est une protéase qui dégrade la fibronectine et le collagène [141]. Elle pourrait être moins dommageable pour les cellules puisque la trypsine, qui est une endopeptidase, clive des protéines transmembranaires et peut induire des changements physiologiques importants [142]. Cependant, la viabilité cellulaire après l'incubation dans la trypsine était assez élevée, soit aux alentours de 95%. Par ailleurs, le sérum utilisé dans le milieu de culture peut aussi avoir une influence sur l'agrégation : un groupe italien a montré que les agrégats formés avec le sérum de rat sont plus fonctionnels et plus gros que le sérum de bœuf fœtal [110]. Même l'acide rétinoïque a le potentiel d'améliorer la fonction des agrégats en améliorant l'adhésion cellulaire [143]. Bref, plusieurs conditions peuvent être étudiées pour obtenir une meilleure agrégation.

Par ailleurs, il serait important de déterminer la taille idéale pour les agrégats. Il semblerait que les îlots de tailles inférieures à 100 μm seraient les mieux oxygénés [144]. Il a été estimé que les îlots de tailles supérieures seraient plus susceptibles à une mort cellulaire nécrotique lorsqu'ils sont cultivés *in vitro*. Un des facteurs influençant la taille des agrégats est la concentration de cellules. Des concentrations trop élevées résultent en des agrégats de plus grande taille [108]. La concentration de cellules utilisée dans cette étude, soit de 250 000 à 300 000 cellules/mL, a été choisie selon ce qui est décrit dans la littérature [106]. Des études pourraient être faites pour déterminer plus précisément la

concentration optimale de cellule à utiliser. Aussi, pour obtenir une population d'agrégats plus uniforme, une autre option serait l'utilisation des plaques d'agrégation spécialement conçues à cette fin (AggreWell™ plates, Stemcell technologies, Vancouver, BC, Canada).

Bref, ces expériences ont permis de mettre au point une technique de formation des agrégats. Plus de travaux pourraient être faits afin d'optimiser la technique pour obtenir un meilleur rendement d'agrégation et une population d'agrégats plus uniforme et de plus petite taille.

B.3.2 Organisation cellulaire

Les agrégats ont une organisation cellulaire similaire à celle des îlots et elle se met rapidement en place (Fig.2). Plusieurs groupes ont montré la même tendance [106, 108-112]. Le groupe d'Hopcroft a cependant montré que les cellules δ étaient plus dispersées dans les agrégats que dans les îlots [106]. Dans notre étude, quelques cellules δ n'étaient pas situées en périphérie, mais la majorité des cellules était bien localisée. Comme mentionné dans la section A.6.2, les CAMs sont les molécules responsables de la structure appropriée des îlots. Il semble donc que les liens intercellulaire soient restaurés et que les CAMs retrouvent leurs fonctions peu de temps après la dissociation des îlots, permettant aux cellules de s'organiser adéquatement. La fonction pourrait donc aussi être restaurée puisqu'elle est dépendante, entre autres, de ces contacts cellules-cellules [128, 132, 133, 135]. Il serait intéressant de s'assurer de la bonne

disposition des CAMs en les localisant par immunohistochimie et vérifier qu'ils soient fonctionnels. La localisation des autres types cellulaires, P et ϵ , pourrait aussi être étudiée.

B.3.3 Fonction

Les résultats des sécrétions d'insuline n'étaient pas ce qui était attendu. Cependant, il faut noter que ce sont des îlots cultivés *in vitro* pendant 14 jours et qu'ils peuvent perdre leur capacité à répondre au glucose avec le temps. D'autres expériences ont été faites à d'autres temps de culture, mais les résultats n'étaient pas valables. L'insuline était trop concentrée et les valeurs étaient plus élevées que les limites de la courbe standard du test. Les résultats incorrects ont donc été rejetés et les expériences n'ont pas pu être refaites à temps. Un contrôle négatif consistant au milieu de culture sans cellule a aussi été fait et s'est avéré négatif.

Même si les résultats ne permettent pas de tirer les conclusions attendues à cause d'une trop grande variabilité, il est possible de conclure au moins que les agrégats sécrètent de l'insuline de façon basale. Plusieurs études montrent que les agrégats répondent au glucose [106, 108, 112]. Pourtant, le groupe de Linzel *et al* affirme que les agrégats ont une sécrétion d'insuline en réponse au glucose plus faible que celle des îlots [131] et le groupe d'Hopcroft *et al* montre que les agrégats répondent à l'arginine, mais pas de façon dose-dépendante [106]. Il aurait été très important d'obtenir des résultats valables pour ces expériences puisque les agrégats ne pourront pas être utilisés s'ils ne sont pas fonctionnels. La

transplantation d'îlots nécessite des îlots qui répondent adéquatement au glucose pour réguler précisément le glucose sanguin des patients.

Comme mentionné à la section A.6.3, la fonction est dépendante des liens intercellulaires et elle est régulée par des mécanismes complexes. À notre connaissance, aucune étude n'a montré que les jonctions communicantes intercellulaires des agrégats soient restaurées correctement. Il serait intéressant de voir si la sécrétion d'insuline des agrégats se fait par oscillations et si la dépolarisation des cellules se propage de la même manière que dans les îlots. Les jonctions communicantes sont importantes pour la transmission du signal à travers l'îlot. Ce sont des structures complexes et il serait intéressant de vérifier qu'elles soient bien reconstituées et fonctionnelles. Deux études ont montré par microscopie électronique que les jonctions communicantes semblent restaurées, mais elles n'ont pas vérifié si elles étaient fonctionnelles [106, 112].

Des améliorations peuvent être apportées à la technique pour obtenir des résultats plus précis. Outre augmenter le nombre de répétitions de l'expérience, d'autres types de filtres pour incuber les cellules pourraient être essayés ou les îlots pourraient être incubés simplement dans des *eppendorfs* et centrifugés pour changer de milieu de culture. Aussi, une plus grande quantité d'agrégats devraient être incubés pour avoir un meilleur signal, mais les dilutions doivent être plus grandes pour l'essai radioimmunologique. Les solutions avec les différentes concentrations de glucose pourraient aussi être contrôlées avec des bandelettes

mesurant le glucose. Les expériences doivent surtout être faites avec des îlots fraîchement isolés pour avoir un meilleur contrôle.

L'expérience effectuée était une incubation statique. Plusieurs groupes utilisent la périfusion dynamique, qui permet de renouveler continuellement le milieu de culture et de suivre plus précisément la sécrétion d'insuline avec le temps. L'essai sur les plaques hémolytiques est une autre technique utilisée. Les îlots sont déposés sur plaque contenant un tapis d'érythrocytes qui sont lysés lorsque l'insuline est sécrétée. Une plage de lyse de grosseur proportionnelle à la quantité d'insuline sécrétée est alors formée [145]. La PCR en temps réel pourrait aussi être utilisée pour évaluer l'expression de l'ARNm.

Un désavantage de l'incubation statique est qu'elle ne permet pas de différencier la première et la deuxième phase de sécrétion d'insuline. La première phase représente le relâchement de l'insuline déjà synthétisée dans la cellule et se produit dans les cinq minutes après la stimulation. La deuxième phase survient après que la cellule ait synthétisé l'insuline, elle est de moins forte intensité, mais de plus longue durée. La première phase est un signe de la sensibilité au glucose de l'îlot.

B.4 Conclusion

Les résultats présentés dans cette section n'ont pas été inclus dans l'article puisque ce sont des travaux de mises au point qui visaient à confirmer les

résultats de la littérature. La technique de formation des agrégats est mieux maîtrisée et les agrégats ont la même organisation cellulaire que les îlots. La fonction n'a pas encore été mesurée, mais il serait crucial de le faire. La section suivante est le cœur du projet et consiste à comparer la résistance à l'hypoxie des îlots et des agrégats pour évaluer la faisabilité de la transplantation d'agrégats microencapsulés. Elle est présentée sous forme d'article.

C. Comparaison de la résistance à l'hypoxie

Improved ability of islet cell aggregates to resist hypoxia and normalize glucose in vivo

Stéphanie Bilodeau, Susan K. Tam, Geneviève Langlois, Jean-Pierre Hallé

Revue soumise: *Artificial Organs*, le 21 août 2010. Preuve de soumission en annexe (section F.2)

Rôle des co-auteurs :

Susan K. Tam et Geneviève Langlois ont aidé lors d'isolation des îlots, elles ont participé à l'analyse de problèmes, elles ont amené plusieurs idées et ont révisé l'article. Dr Jean-Pierre Hallé a suggéré le sujet de recherche et l'hypothèse, il a participé à l'analyse des problèmes et des résultats, il a amené plusieurs idées et il a révisé l'article.

Improved ability of islet cell aggregates to resist hypoxia and normalize glucose in vivo

Stéphanie Bilodeau¹, Susan K. Tam^{1,2}, Geneviève Langlois¹, Jean-Pierre Hallé¹

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

¹ Research laboratory on bio-artificial therapies,

Centre de recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Université de

Montréal, Montréal,

Québec, H1T 2M4, Canada

² Biomedical Engineering Institute,

École Polytechnique de Montréal, Montréal, Québec, H3C 3A7,

Canada

* Corresponding author : Dr. Jean-Pierre Hallé

Centre de recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont

Pavillon Marcel-Lamoureux

5415 boul. de l'Assomption

Montréal, Qc Canada H1T 2M4

Fax : 514-252-3430

C.1 Abstract

A major limitation in microencapsulated islet transplantation is the oxygenation of transplanted cells. The microcapsule prevents revascularization thus oxygen supply depends on passive diffusion only. Moreover, islets are sensitive to hypoxia; it inhibits insulin secretion, induces cell death and leads to graft failure. To enhance the oxygenation of transplanted islets, islet cell aggregates were investigated. It was shown that dispersed islet cells have the ability to re-associate into an islet-like structure that are smaller than islets (62% of islet diameter). We investigated whether these smaller aggregates were more resistant to hypoxia than islets *in vitro*. When submitted to 1% oxygen incubation for three and seven days, the aggregates maintained a better survival ($73.6 \pm 0.8\%$ at 3 days and $81.5 \pm 4.4\%$ at 7 days) than the islets ($32.9 \pm 1.2\%$ at 3 days and $46.4 \pm 9.0\%$ at 7 days). The aggregates also expressed fewer cells that were positive for activated caspase-3 ($24.2 \pm 7.3\%$) and iNOS ($48.7 \pm 6.5\%$) in comparison to islets ($41.3 \pm 10.8\%$ for caspase-3 and $72.9 \pm 5.3\%$ for iNOS). Finally, the aggregates were more efficient for restoring normoglycemia in STZ-induced diabetic SCID mice. These results highlight the potential of aggregates for improving the performance of microencapsulated islet transplantation.

C.2 Introduction

Islet transplantation allows the normalization of blood glucose, but it requires life-long treatments involving toxic immunosuppressors. To avoid the

use of immunosuppressors, islet microencapsulation is a promising strategy. The alginate semi-permeable membrane of the microcapsule permits the diffusion of small molecules such as insulin and glucose yet blocks the access of antibodies and immune cells to the islets. It has been demonstrated that microencapsulated islets have the ability to reverse hyperglycemia in many animal models, but graft survival is still limited for some weeks to one year because, amongst other factors, the biocompatibility of microcapsule and the poor oxygenation of the islets [55, 61].

Indeed, because the microcapsule prevents revascularization of the islets by blocking physical contact with tissues, islet oxygenation depends upon passive diffusion. The use of the peritoneal cavity as a transplantation site worsens the situation because it is not well vascularized and microcapsules are generally free-floating rather than being in direct contact with blood vessels. In addition, islets are sensitive to hypoxia because of their important metabolic demand. A lack of oxygen affects their function [82], causes cell death [83] and thus leads to early graft failure [97]. It has been shown that when microencapsulated islets are transplanted, there is a gradual increase in central necrosis [55, 84] and that this is a consequence of oxygen deprivation [85]. It is crucial to optimize oxygen diffusion in order to achieve long-term graft success.

One possibility for enhancing oxygenation to transplanted islets is to decrease their size. Indeed, it was shown that smaller islets (< 150 μm) are more

resistant to hypoxia than larger ones [104, 105]. Oxygen does not reach the cells located in the center of larger islets because the distance to which oxygen can diffuse is limited to 200-250 μm [80]. An interesting strategy to reduce the average diameter of the islets without having to discard the larger islets is to use islet cell aggregates. It is known that dispersed islet cells have the ability to aggregate into an islet-like cluster. These aggregates have the same cellular architecture and glucose-stimulated insulin response as islets [107, 108, 111].

The present study aims to compare the resistance to hypoxia of islets and aggregates. The results of the present study show that aggregates smaller than islets can be produced, that they have a better viability after severe hypoxic incubation, that they express activated caspase-3 and iNOS to a smaller extent and that they can restore normoglycemia in streptozotocin (STZ)-induced diabetes mice more successfully than islets.

C.3 Material and methods

Materials

Pharmaceutical-grade sodium alginate Keltone LVCR® was purchased from ISP Corp. (New Jersey, USA). Endotoxins on non-disposable materials were removed by washing in Extran soap, HCl 2N and sterile water followed by EO gas treatment or autoclave. Caspase-3 and iNOS antibodies were purchased from Abcam (Cambridge MA, USA). Unless otherwise mentioned, islet

isolation solutions were purchased from Invitrogen Life technologies (Burlington, ON, Canada).

Islet isolation

Islets were isolated from the pancreases of Wistar rats weighing 250-400g, purchased from Charles River Institute (St-Constant, Qc, Canada). The islet isolation procedure has been previously described in detail [64, 146]. Briefly, pancreases were infused, via the common bile duct, with type V collagenase (Sigma-Aldrich Ltd. Oakville, ON, Canada) that was diluted (1 mg/ml) in a solution of Hank's balanced salt solution (HBSS) supplemented with 25mM HEPES, 4.2 mM sodium bicarbonate, 1% v/v penicillin-streptomycin (pen-strep). Pancreases were further digested for 30 min at 37°C. After mechanical harvesting, islets were purified by consecutive filtration (800 µm and 250 µm) followed by a discontinuous Euroficoll gradient (Mediatech Inc., Herndon, USA). Islets were handpicked (> 95% purity) under light microscope and then cultured overnight in RPMI 1640 medium (supplemented with 10% v/v new calf serum, 1% pen-strep, 23.8 mM sodium bicarbonate, 15 mM HEPES) at 37°C and 5% CO₂. Approximately 400 islet-equivalents (IEqs) were isolated from each rat. All animal manipulations were done under the approval of the Maisonneuve-Rosemont Hospital Animal Ethics Committee.

Aggregate formation

Islets were dispersed into single cells by trypsin digestion. Briefly, islets were washed with phosphate buffered solution and incubated in 0.25% trypsin-EDTA for 15 minutes. Cells were vortexed 5 seconds every 5 minutes. Digestion was stopped using ice-cold Krebs-Ringer Buffer and the preparation was filtered over a 70µm nylon cell strain (Becton Dickinson, Mississauga, On, Canada). Cells were allowed to aggregate by incubating them for 6 days in RPMI in non-adherent polystyrene petri dishes at a concentration of 2.5×10^5 to 3×10^5 cells/mL at 37°C and 5% CO₂.

Hypoxia incubation

To incubate islets/aggregates in hypoxia, an O₂ controlled incubator (Thermo Scientific, Nepean, ON, Canada) was used, where nitrogen is added to decrease the oxygen percentage. Oxygen concentration for hypoxia was 1% oxygen (1% O₂, 5% CO₂ and 94% N₂) and normoxic controls were incubated in 20% oxygen (20% O₂, 5% CO₂ and 75% N₂). Incubation periods lasted zero, three and seven days. After each incubation period, the diameter of 100 islet/aggregates was measured using a scale mounted in the microscope eye-piece and the average was obtained.

Viability evaluation

Viability experiments were done on non-encapsulated islets in order to eliminate the effect of the microcapsule on islet/aggregate viability and focus on the effect of oxygen. Aggregate cell and islet cell survival was evaluated using a

dual staining technique. One hundred (100) islets/aggregates were hand-picked and stained with propidium iodide (PI; 1 mg/ml) and orange acridine (AO; 0.01 mg/ml) for 10 minutes at room temperature. The samples were observed using fluorescence microscopy. Green (AO) and red (PI) staining indicated viable and dead cells, respectively.

Immunohistochemical studies

To compare the cellular response to hypoxia, caspase-3 and iNOS expression was evaluated by immunohistological experiments. Islets and aggregates were submitted to 1% oxygen or 20% oxygen for three days. They were then incubated in formol, fixed in agarose, embedded in paraffin and cut into 5µm slices. The paraffin was removed and the slices were treated with trypsin (Sigma-Aldrich Ltd.), a peroxydase blocking reagent and a Universal Protein Blocker. They were incubated for 30 minutes with either the caspase-3 (1:50) or the iNOS (1:100) antibody at room temperature. The secondary antibody was LSAB-2 kit from Dako, composed of a biotinylated secondary antibody and a streptavidin conjugated to horseradish peroxidase. Nuclei were then counterstained with Dako Mayer's Haematoxylin and slides were mounted at 70°C for 30 minutes using an aqueous permanent mounting medium Ultramount. All other products were purchased from DAKO Diagnostics Inc (Mississauga, ON Canada). The percentage of caspase-3-positive or iNOS-positive cells was assessed for 40 to 75 islets/aggregates per condition, and at

least 3 different slides were examined per condition. As a negative control, sections were incubated with PBS instead of primary antibody.

In vivo studies

Alginate purification

Alginate was purified as previously described [64]. Briefly, alginate was purified by chloroform extractions and activated charcoal incubation. Then, alginate beads were produced, washed with sterile water and incubated in acetic acid, sodium citrate solution and 50 % ethanol and 70 % ethanol. Beads were dissolved into an EDTA solution, filtered and dialyzed against NaCl and distilled water. Alginate was precipitated with 100 % ethanol and freeze-dried.

Islet microencapsulation

Islets/aggregates were suspended in a solution of purified alginate (1.63% w/v in saline). Using an electrostatic pulse generator[147], alginate droplets were extruded into a solution of 10 mM barium chloride for 30 minutes to induce gelation of the alginate solution and then rinsed twice in Ringer (154 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 1.7 mM CaCl₂, 1% v/v HEPES 1M). Immobilized islets were then cultured overnight in Ultraculture medium (Lonza Walkersville Inc., Walkersville, MD, USA) supplemented with 1% v/v penicillin- streptomycin- glutamine before being implanted.

Islet implantation

Male B6.CB17-*Prkdc*^{scid}/SzJ mice (15–20 g body weight; 2-6 months old; Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) were used as transplant recipients. Diabetes was induced by Streptozotocin (Sigma-aldrich Ltd.) (150mg/kg body weight in sodium citrate buffer pH 4.5) via intraperitoneal injection. Microencapsulated islets/aggregates (100IEq) were transplanted intraperitoneally into mice having two subsequent blood glucose readings that were higher than 15 mM. Blood glucose was monitored from mouse-tail veins and mice were considered normoglycemic when blood glucose was lower than 11 mM.

Statistical analysis

All *in vitro* experiments were performed at least 3 times and the results are expressed as mean \pm SEM. The differences between experimental groups were analyzed by unpaired Student's *t* test with $p < 0.05$ considered as significant.

C.4 Results

C.4.1 Aggregate characterization

The first aim of this study was to obtain a cellular structure that is smaller than islets yet have a similar architecture to islets. After 6 days of aggregate formation, the mean diameter of aggregates was significantly smaller than that of whole islets ($81.6 \pm 3.4 \mu\text{m}$ for aggregates, $130,7 \pm 7,9 \mu\text{m}$ for islets, $p < 0.01$). Thus, the mean diameter of the aggregates represented 62% of the diameter of the islets. Their difference in size was statistically significant ($p < 0.01$).

Furthermore, rodent islet cellular organisation was maintained, as a majority of the β -cells were located in the center of the aggregates while the other cells, such as α and δ cells, were at the periphery of the structure, as confirmed by immunohistological staining against insulin, glucagon and somatostatin (Data not shown).

C.4.2 Comparison of islet and re-aggregate resistance to hypoxia

The resistance of islets and aggregates to hypoxia was compared *in vitro*. Hypoxia was induced by incubating the samples for three or seven days at 1% O₂ concentration. This incubation time and oxygen concentration were chosen to induce severe hypoxia. Cell viability was evaluated by AO/PI staining, where islets/aggregates were considered to be viable when at least 75% of cells were alive. Aggregates survived better than islets to hypoxia; their viability was better maintained when they were deprived of oxygen (Fig. 1). Compared to the control (normoxia), the decrease in viability induced by three days of hypoxia was more drastic for islets (53.7 ± 2.5 % loss of viability) than for aggregates (19.7 ± 3.3 % loss). The difference in viability between two sample types at three days hypoxia was significantly different ($p < 0.01$). After seven days of hypoxia, no significant change in viability was observed compared to the results at three days, indicating a plateau in damage induced by oxygen deprivation.

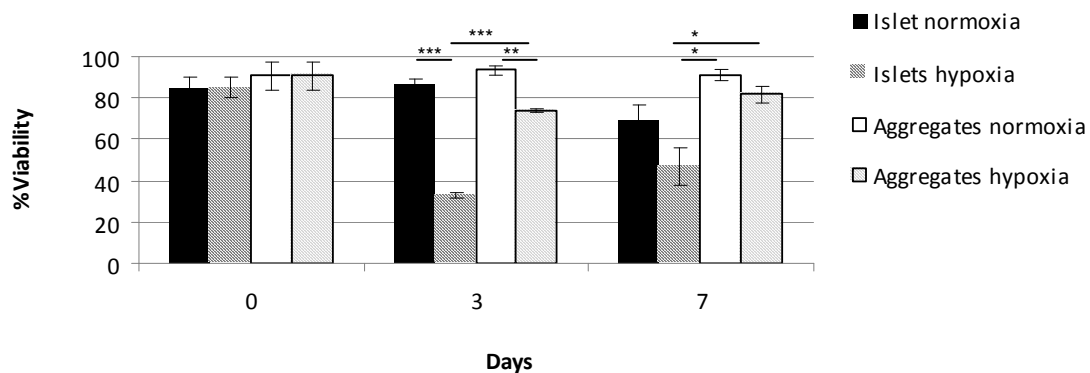


Fig. 4. Viability of islets and aggregates after zero, three and seven days of incubation at 1% O₂, evaluated using AO/PI dual staining where an islet and aggregate were considered to be viable when more than 75% of its cells were alive. n=3to n=4, *p≤0.05, **p≤0.005, ***p≤0.0001

It was observed that after seven days in hypoxia, there was a significant decrease in the mean diameter of the samples compared to normoxic controls ($p < 0.01$ for islets and $p < 0.05$ for aggregates). Islets were reduced to 62% of their original diameter, while aggregates were reduced to only 81% of their original diameter. It was observed that individual cells tended to disassociate from the islets when they died, which explains the measured decreases in diameter.

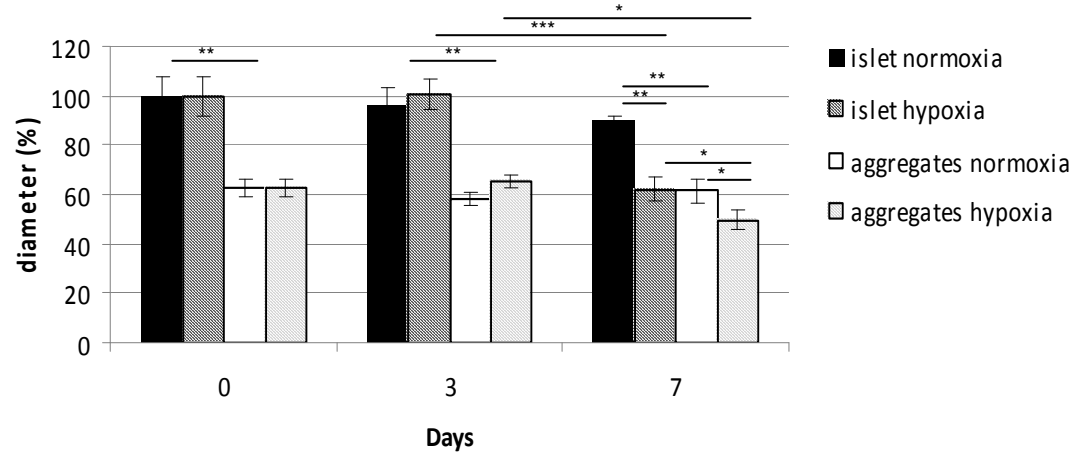


Fig. 5. Mean diameter of islets and aggregates at zero, three and seven days of hypoxic incubation. Results expressed in percentage, in comparison with islets in normoxia diameter at day zero, considered as 100%. n=3 to 4, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$, *** $p \leq 0.0005$

C.4.3 Comparison of cellular response to hypoxia

To further compare the response of islets and aggregates to hypoxia, the expression of two proteins involved in hypoxic response were evaluated: activated caspase-3 (a key factor involved in apoptosis[148]) and iNOS (expressed in hypoxia and responsible for NO production and cell damages[86]). The percentage of protein positive cells was assessed for 40 to 75 islets/aggregates per condition. Under normoxic conditions, islets and aggregates showed the same degree of activated caspase-3 and iNOS expression (Fig. 3). When subjected to three days of hypoxia, islets expressed both proteins in significantly higher amounts than normoxia controls ($41.3 \pm 10.8\%$ vs $13.7 \pm 2.3\%$, $p < 0.05$ for caspase-3 and $72.9 \pm 5.3\%$ vs $28.4 \pm 3.6\%$, $p < 0.001$ for

iNOS). In contrast, aggregates showed no significant overexpression of these proteins.

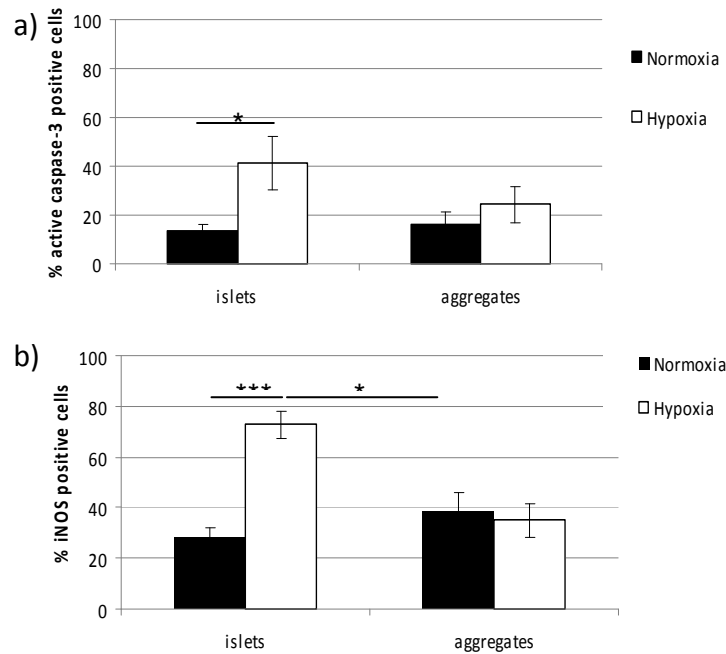


Fig 6. a) Percentage of activated caspase-3 positive cells and b) iNOS positive cells, as determined by immunohistological staining after 3 days in 1% O₂ (hypoxia) or 20% O₂ (normoxia). Between 40 and 75 islets/aggregates were evaluated per condition. * p < 0.05, *** p < 0.0001

C.4.4 Ability of aggregates to reverse diabetes in mice

The ability of aggregates and islets to restore normoglycemia in mice was evaluated. 100 IEq of encapsulated islets and aggregates were transplanted in STZ-induced diabetic SCID mice. Aggregates normalized blood glucose of all 4 mice transplanted for more than 40 days while islets normalized blood glucose

for 2 out of 3 mice, one for 4 and the other for 26 days. Non encapsulated islets and empty microcapsules did not decrease blood glucose at all.

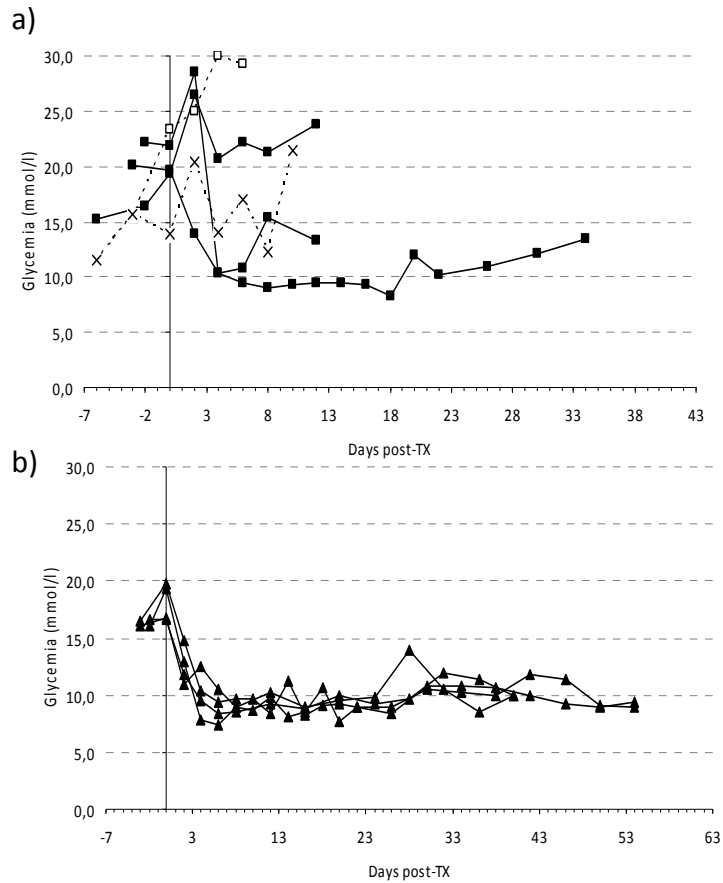


Fig 7. blood glucose (mmol/L) of STZ-induced diabetic SCID mice transplanted with a) 100 Ieq of islets (■) b) 100 Ieq of aggregates (▲). Controls are non encapsulated islets (x) and empty beads (□).

C.5 Discussion

Microencapsulated islets have limited survival because, among other factors, they are exposed to hypoxia *in vivo*. This is a consequence of the fact that

they are not revascularized and so they rely on oxygen diffusion for survival. It was shown that smaller islets are superior than larger islets in terms of their resistance to hypoxia because of improved oxygen diffusion [104, 105]. We studied aggregates of dispersed islets cells because of their smaller size. The aggregates were, on average, slightly more than half the size of the islets.

As expected, *in vitro* studies showed that aggregates have a better resistance to hypoxia than islets *in vitro*. When incubated for three days in hypoxia, their viability decreased only slightly while more than half of the islet cells died. These results are in agreement with other studies showing that smaller islets are more resistant to hypoxia. Indeed, central necrosis is often observed in large islets, indicating that the cells located in the center of these islets are deprived of oxygen [64, 77, 83-85]. When cultured *in vitro*, larger islets have been mathematically predicted to have a higher percentage of necrotic cells: 25% for islets of 200 μm vs. zero necrosis for 100 μm islets [144].

The viability evaluated by the iodide propidium staining reflects the viability of the cells within the islet, but they do not take into account the dead cell detachment, which was observed after long oxygen deprivation. It was associated with a decrease in islet diameter and the presence of more dispersed cells in the dishes. Cell detachment occurred after severe hypoxia and may therefore be an indicator of severe damage. To our knowledge, no other studies have mentioned this phenomenon. Most *in vitro* studies, however, induced

hypoxia no longer than five days, while this study tested the effects of one week of hypoxia. For example, Moritz *et al* reported an important increase in central necrosis after 48 hours of hypoxia incubation, but no cell dissociation was reported [83]. The incubation periods tested in this study were chosen in order to mimic the conditions found *in vivo*, where islets are exposed to chronic and long-term hypoxia. Oxygen tension in the peritoneum was reported to be between 3.5-10% [149], but could be close to 0% depending the exact location of the microcapsules within the peritoneal cavity.

Furthermore, aggregates were less affected by hypoxia than islets, as shown by the expression of activated caspase-3 and iNOS. These proteins were chosen because they were shown to be upregulated in hypoxia in islets [83, 86, 98]. The cell response to hypoxia may have been less severe for aggregates because they probably received more oxygen. De Groot *et al* showed that islets exposed to hypoxia also secrete the monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) [98]. This protein attracts cytokine-secreting macrophages and might contribute to graft failure. Therefore, minimizing the cell response to hypoxia is likely to have many beneficial effects for the long-term viability and function of encapsulated islets *in vivo*.

Microencapsulated aggregates were able to restore normoglycemia when transplanted in SCID diabetic mice. This demonstrates a good functionality of the aggregates within the microcapsules in an *in vivo* environment. While it was

expected that aggregates would be at least as efficient as islets for reversing diabetes, normoglycemia was actually induced for a longer periods. The greater success rate of the aggregates over the islets can be explained by their enhanced oxygenation and increased resistance to hypoxia, as suggested by the *in vitro* data. It is known that an important amount of islets dies in the early post-transplant period [150]. Our results show that aggregates are less susceptible to cell death, which suggests that a larger amount of aggregates survived during the post-transplantation period and were therefore better able to function adequately *in vivo*.

Apart from an improved resistance to hypoxia, the smaller size of the aggregates offers other potential advantages for microencapsulated transplantation. In particular, smaller aggregates allow the use of smaller microcapsules. Decreasing microcapsule size should further enhance oxygenation due to a greater surface/volume ratio. Smaller microcapsules of 100-150 were reported to be produced with a micro-airflow-nozzle device [151]. Decreasing the microcapsule size would also make other more efficient implantation sites accessible, such as the portal vein and kidney capsule. For the moment, the peritoneum is the most convenient site for transplantation studies because of its capacity to accommodate a large size transplant and its easy accessibility. However, it is not the ideal site for graft survival because it is not well vascularised and oxygenated [152]. The microcapsules are not in direct contact with blood vessels and the volume of islets necessary to reverse hyperglycemia is

two to four times higher than non-encapsulated islets transplanted under the kidney capsule [153].

Further research is needed to improve the aggregation technique in order to minimize cell loss. If this could be achieved, aggregate transplantation would present a great advantage over islet transplantation, which currently demands a huge quantity of islets. Furthermore, an improved understanding of aggregate formation will be useful for the eventual integration of stem cells or bio-engineered insulin secreting cells into an islet-like cluster. Such a strategy for encapsulated cellular therapy is promising because it may limit the need for cadaveric sources. In conclusion, the present study showed that islet cell aggregates are more resistant to hypoxia than whole islets because of an enhanced oxygenation. This study suggests that aggregates are a promising strategy to improve microencapsulated islet transplantation.

Acknowledgements

This work was supported by the Canadian Diabetes Association, Diabète Québec and l'Association des Diabétiques de Lanaudière. SB has received a student scholarship from Université de Montréal and Diabète Québec, GL from Diabète Québec and SKT from Montreal Diabetes Research Center.

D. Diffusion d'oxygène et réponse des agrégats à l'hypoxie

Cette section regroupe des expériences visant à évaluer la diffusion d'oxygène et à mieux comprendre la réponse à l'hypoxie des îlots et des agrégats. Tout d'abord, des expériences ont été faites pour valider la prémisse du projet, qui est que les plus petits îlots sont les plus résistants à l'hypoxie. La fonction des îlots et des agrégats après une incubation en hypoxie a aussi été évaluée. Ensuite, l'effet de l'hypoxie sur la viabilité des îlots et des agrégats microencapsulés a été vérifié. Finalement, des essais pour diminuer la taille des microcapsules ont été faits afin de mieux accommoder les agrégats et améliorer encore plus la diffusion d'oxygène.

D.1 Matériel et méthodes

Résistance à l'hypoxie des agrégats de différentes tailles

Les cellules MIN6 (cellules β immortalisées) ont été utilisées pour cette expérience afin de réduire l'utilisation d'îlots de rats. Pour former des agrégats de cellules MIN6, les cellules ont été mises en suspension dans des pétris en polystyrène à une concentration de 300 000 cellules/mL. Elles ont ensuite été incubées dix jours, à 37°C, 5% CO₂ et 20% O₂, pour obtenir des agrégats de cellules MIN6. Les agrégats ont été séparés manuellement en quatre groupes de différentes tailles avec une règle fixée dans l'oculaire du microscope : 40 à 80

μm , 80 à 140 μm et 140 μm et plus et un groupe d'agrégats de toutes tailles. Pour chaque groupe de taille, trois échantillons d'environ 100 agrégats sont sélectionnés, un est incubé à 20% d' O_2 (normoxie) et un à 1% O_2 (hypoxie) pendant sept jours à 37°C, 5% CO_2 . Pour le troisième, les tests sont effectués sans incubation supplémentaire pour connaître les propriétés des agrégats avant l'incubation (J0). Le diamètre des agrégats est alors mesuré, puis un test de viabilité est effectué, soit une coloration acridine orange/iodure de propidium (AO/IP), comme décrit dans la section C.3.

Fonction des îlots et des agrégats (Sécrétion d'insuline en réponse au glucose)

La sécrétion d'insuline en réponse au glucose des îlots et des agrégats a été comparée suite à des incubations de sept jours à 1% d' O_2 . Les cellules dispersées d'îlots ont été incubées pendant six jours afin de former les agrégats. Ensuite, les îlots et les agrégats ont été séparés en deux : 20% d' O_2 (normoxie) et 1% d' O_2 (hypoxie) puis incubés pendant sept jours à 37°C, 5% CO_2 et 1% d' O_2 . Par la suite, le test de fonction a été effectué comme décrit dans la section B.1.

Viabilité des îlots et des agrégats microencapsulés

La viabilité des îlots et des agrégats microencapsulés suite à une incubation en hypoxie a été évaluée. Pour se faire, les îlots et les agrégats ont été microencapsulés selon la méthode décrite à la section C.3. Ils ont été ensuite divisés en deux : 20% d' O_2 (normoxie) et 1% d' O_2 (hypoxie) puis incubés pendant trois jours à 37°C et 5% CO_2 . Un test de viabilité AO/IP a ensuite été effectué, comme décrit dans la section C.3.

Formation de microcapsules

Pour fabriquer des microcapsules, l'alginate a été dilué dans une solution saline à une concentration de 1,63% et a été aspiré dans une seringue 5 mL. Une aiguille sur laquelle est appliqué un champ électromagnétique pulsatif a été fixée sur la seringue. La seringue a été insérée dans un pousse-seringue pour que l'alginate s'écoule à une vitesse fixe. Lorsque l'alginate est poussé dans l'aiguille, il se détache sous forme de microgouttelettes à cause du champ électromagnétique et il tombe dans une solution gélifiante de chlorure de baryum (BaCl_2) (10mM) où les microcapsules ont ensuite été incubées 30 minutes. Les microcapsules sont rincées deux fois dans une solution de Ringer (154 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 1.7 mM CaCl_2 , 1% v/v HEPES 1M) et leur diamètre est mesuré. Les différentes conditions expérimentées afin d'obtenir des microcapsules de plus petites tailles seront décrites dans la section D.2.4.

D.2 Résultats

D.2.1 Évaluation de la résistance à l'hypoxie selon la taille des agrégats

Des expériences supplémentaires ont été faites afin de confirmer que les plus petits agrégats sont plus résistants à l'hypoxie que les plus gros. Une lignée cellulaire immortalisée a été utilisée pour réduire l'utilisation d'îlots isolés de rats. Il s'agit de cellules β de souris, les MIN6 [154, 155]. Comme les cellules d'îlots, les MIN6 forment des agrégats semblables aux îlots. Ils ont été séparés en

quatre groupes de tailles différentes, soit de diamètre de 40 à 80 μm , 80 à 140 μm , 140 μm et plus et ainsi qu'un échantillon de toutes tailles. Ils ont ensuite été incubés sept jours dans un milieu contenant 1% d'oxygène. Par la suite, leur diamètre a été mesuré et leur viabilité a été évaluée (Fig. 8).

Après l'incubation en hypoxie, la viabilité a peu varié. Étonnamment, les seuls agrégats dont la viabilité varie significativement après l'hypoxie sont ceux de taille intermédiaire (80 à 140 μm), qui ont une perte de viabilité de $22,3 \pm 5,3\%$ ($p < 0,05$) par rapport au J0. On observe aussi une variation du diamètre, qui semble être une conséquence de l'hypoxie. En effet, le diamètre des plus gros agrégats (140 μm et plus) diminue de $40,8 \pm 3,3\%$ ($p < 0,005$) par rapport au diamètre de ceux incubés en normoxie et les agrégats intermédiaires ont une diminution plus faible, soit de $22,8 \pm 4,2\%$ ($p < 0,005$). Inversement, le diamètre des plus petits agrégats (40 à 80 μm) augmente de $13,2 \pm 5,1\%$ ($p < 0,05$). L'échantillon de toutes les tailles a une diminution de diamètre de $19,0 \pm 3,7\%$ ($p < 0,05$).

Avant l'incubation de sept jours (J0), tous les groupes ont une viabilité moyenne de $87,4 \pm 2,5\%$, excepté le groupe le plus gros, qui a une viabilité plus faible, soit de $60,9 \pm 8,5\%$ (non significatif ($p = 0,078$), n trop petit). Par ailleurs, les agrégats de plus petites tailles (40 à 80 μm , 80 à 140 μm) ont une augmentation significative du diamètre, ($21,3 \pm 3,9\%$ ($p < 0,05$) et $23,8 \pm 5,5\%$ ($p < 0,01$), respectivement), probablement due à la prolifération cellulaire. Ce n'est

pas le cas pour les agrégats les plus gros et pour ceux de toutes tailles, qui ont un diamètre stable.

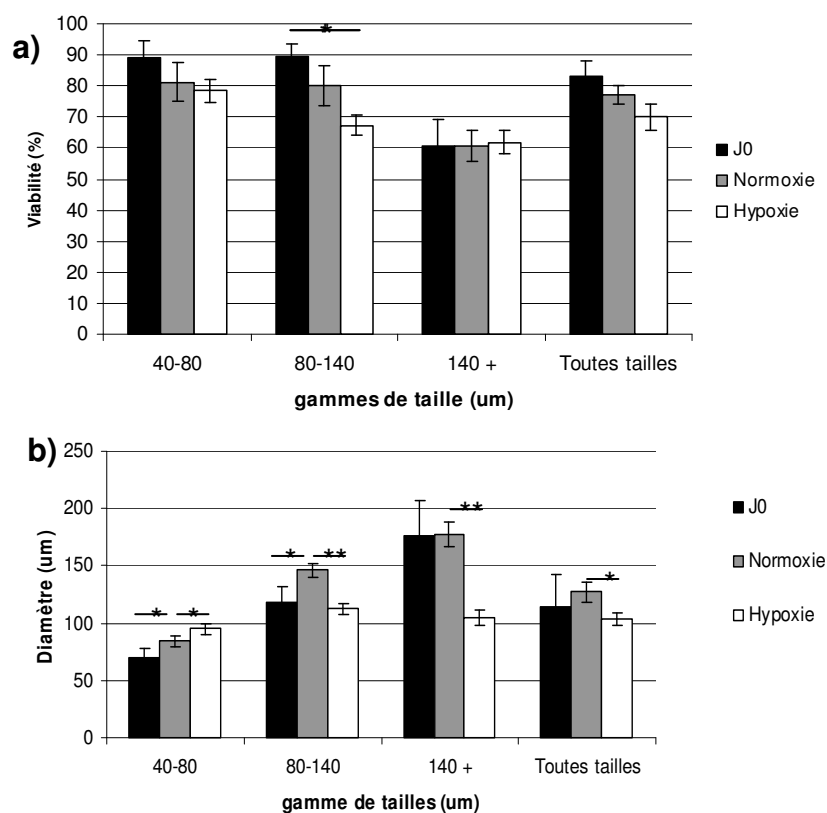


Fig. 8. Effet de la taille sur la résistance à l'hypoxie. Comparaison de la réponse à l'hypoxie des agrégats de cellules MIN6 de différentes tailles. A) Viabilité évaluée par coloration AO/IP d'agrégats de différentes tailles (40-80µm, 80-140 µm, plus de 140µm et toutes les tailles) avant l'incubation en hypoxie (Jour 0), après 7 jours à 20% d'O₂ (normoxie) ou 7 jours à 1% O₂ (hypoxie). Un agrégat est considéré viable lorsque plus de 75% de ces cellules son viables. B)

Diamètre moyen (μm) des agrégats mesuré à l'aide d'une règle insérée dans la lentille du microscope des agrégats de différents groupes de taille, mesuré à 6,3x,

$n=3, *p \leq 0,05, **p \leq 0,005$.

D.2.2 Fonction des îlots et des agrégats suite à un choc hypoxique

La fonction des îlots et des agrégats de cellules d'îlots suite à un manque d'oxygène a été évaluée. Comme pour les expériences de sécrétion d'insuline présentées dans la section B.2.3, certaines valeurs ont été exclues, puisqu'elles n'étaient pas valables. Dans cette expérience, les îlots et les agrégats ont été incubés à 1% d'oxygène pendant 7 jours puis leur sécrétion d'insuline en réponse au glucose a été évaluée (Fig. 9). Les résultats en conditions normoxiques sont les mêmes que ceux présentés dans la section B.2.3 et ils sont présentés ici à nouveau à titre comparatif.

Lorsqu'il y a hypoxie, la réponse basale (3,3mM de glucose) des îlots et des agrégats est plus faible qu'en normoxie (respectivement $47,2 \pm 13,0\%$ et $49,7 \pm 7,9\%$). De plus, il n'y a aucune augmentation de la sécrétion d'insuline lorsque la concentration de glucose est augmentée (16,5mM). Les îlots et les agrégats exposés à l'hypoxie sécrètent peu d'insuline et ils ne répondent pas au glucose.

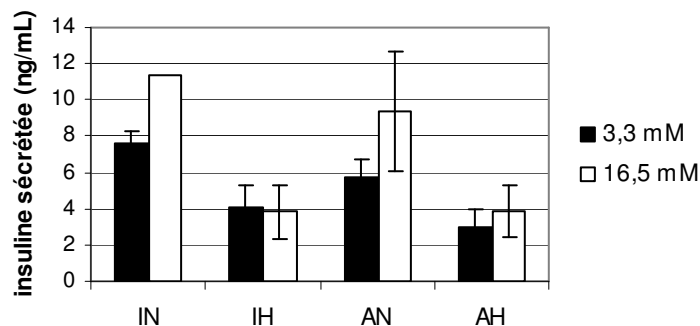


Fig.9. Sécrétion d'insuline en réponse au glucose d'îlots et d'agrégats de cellules d'îlots suite à un manque d'oxygène. Concentration d'insuline (ng/mL) dans le surnageant après 2 heures d'incubation dans un milieu de culture avec une concentration de glucose de 3,3mM (basale) et 16,5mM (stimulée) de 100 îlots ou 100 agrégats, incubés 7 jours à 21% et 1% O₂. IN = îlots normoxie, IH = îlots hypoxie, AN= agrégats normoxie, AH= agrégats hypoxie. Insuline mesurée par un essai radioimmunologique, n = 1 à 3

D.2.3 Évaluation de la résistance à l'hypoxie des îlots et des agrégats microencapsulés

Les expériences présentées dans l'article ont été faites avec des îlots et des agrégats non encapsulés pour évaluer la structure cellulaire seulement et non la diffusion d'oxygène dans la microcapsule. Afin de vérifier si la microcapsule modifie la résistance à l'hypoxie des cellules, la viabilité des îlots et des agrégats microencapsulés a été évaluée après trois jours d'incubation à 1% d'oxygène (Fig. 10). Les résultats ci-dessous sont comparés aux résultats présentés dans la section C.4.2, où les îlots et agrégats ne sont pas encapsulés.

Comme dans les résultats de la section C.4.2, les îlots sont plus affectés par l'hypoxie que les agrégats, ils ont une perte de viabilité plus importante ($51,4 \pm 11,1\%$ et $13,8 \pm 4,6\%$ de perte de viabilité, respectivement). Il y a une légère diminution de la viabilité pour les îlots et les agrégats encapsulés en normoxie par rapport aux non encapsulés, mais cette différence n'est pas significative.

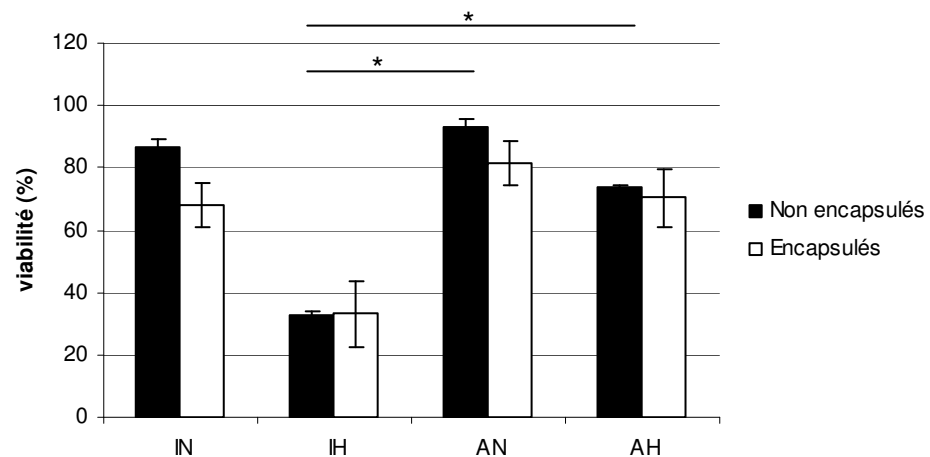


Fig.10. Viabilité des îlots et des agrégats microencapsulés Viabilité des îlots et des agrégats évaluée par coloration AO/IP après 3 jours d'incubation à 1% d'O₂ ou à 20% d' O₂. IN = îlots normoxie, IH = îlots hypoxie, AN= agrégats normoxie, AH= agrégats hypoxie. Un îlot est considéré viable lorsque plus de 75% de ces cellules son viables. n= 3 à 4, p≤0,05

D.2.4 Diminution du diamètre des microcapsules

Une autre stratégie pour améliorer l'oxygénation des îlots est de diminuer la taille des microcapsules pour réduire la distance de diffusion de l'oxygène. La

microcapsule augmente la distance que l'oxygène a à parcourir, soit du vaisseau sanguin, jusqu'au centre de l'îlot. Les microcapsules conventionnelles fabriquées dans d'autres laboratoire ont un diamètre d'environ 800 μm . Notre laboratoire a auparavant mis au point l'appareil électrostatique qui peut former des billes plus petites, d'environ 350 μm [147]. Des expériences ont été faites afin de diminuer encore plus la taille des microcapsules pour améliorer la diffusion de l'oxygène.

Tout d'abord, comme les agrégats ont une taille moyenne de 80 μm , il serait envisageable d'obtenir des microcapsules de 100 μm . Certains paramètres de fabrication peuvent être modifiés pour varier leurs propriétés. La variation de ces paramètres a permis d'obtenir des microcapsules de diamètre moyen de 150,5 \pm 5,1 μm , comparativement à 369,5 \pm 12,6 μm pour les billes normales ($p < 0,0001$).

Pour obtenir des plus petites microcapsules, le calibre de l'aiguille a été diminué de 25G à 30G. Cependant, les aiguilles doivent avoir l'extrémité plate. Celles disponibles commercialement sont pointues, il a donc fallu les couper et les sabler pour les rendre plates. Ensuite, la vitesse avec laquelle l'alginate est poussé dans l'aiguille a été diminuée grandement pour que les gouttelettes soient plus petites (de 3,5 mL/heure à 0,5 mL/heure). Les microcapsules formées avec ces paramètres étaient de plus petite taille, mais elles n'étaient pas parfaitement sphériques et uniformes. La distance entre l'aiguille et le béccher de BaCl_2 a donc

été augmentée de 1 cm à 6 cm et la concentration d'alginate a été augmentée (de 1,63% à 1,75%) pour améliorer la forme des billes.

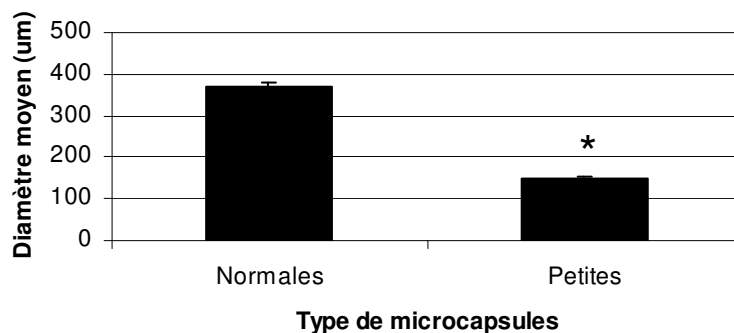


Fig 11. Diamètre des petites billes. Diamètre moyen de préparation de billes mesuré à l'aide d'une règle insérée dans la lentille du microscope à 32x n=5, *p < 0,0001. *Élaboration de la technique en collaboration avec Susan K. Tam, étudiante au Ph.D.

D.3 Discussion

D.3.1 Évaluation de la résistance à l'hypoxie selon la taille des agrégats

Les résultats de cette section confirment que les agrégats de plus grande taille sont plus affectés par l'hypoxie, comme ce qui a été montré dans la littérature [104, 105]. Plus le diamètre est élevé, plus la perte de viabilité et de diamètre est importante. Les agrégats de diamètre plus élevé sont les moins viables, et ce même en normoxie. Même dans ces conditions, l'oxygène ne

diffuse pas suffisamment jusqu'au centre de l'agrégat pour qu'il garde une bonne viabilité.

Ainsi, les plus petits agrégats (40 à 80 μm) sont les plus résistants à l'hypoxie. Leur viabilité ne diminue pas significativement après un choc hypoxique. Il est surprenant de noter qu'ils ont même une augmentation de diamètre suite à l'hypoxie. L'oxygène semble mieux diffuser que dans les plus gros agrégats. L'augmentation de diamètre peut être due à une plus grande répllication cellulaire et pourrait être un effet d'adaptation à l'hypoxie [156], puisqu'ils sont de plus grande taille que ceux incubés en normoxie. Comme mentionné dans la section A.4.2, la réponse à l'hypoxie dépend de la sévérité du manque d'oxygène.

La coloration AO/IP rend compte des cellules mortes situées dans les agrégats. Ces cellules sont souvent présentes sous forme de centre nécrotique. Il aurait été intéressant de mesurer la taille du centre nécrotique et de vérifier qu'elle soit proportionnelle à la taille des agrégats. Comme la coloration à l'iodure de propidium ne montre que la viabilité des cellules contenues dans les îlots, le diamètre des agrégats a été mesuré pour tenir compte des cellules mortes qui sont détachées des îlots. Le diamètre des îlots diminue beaucoup après une incubation en hypoxie. Ceci expliquerait que, dans le cas des plus gros agrégats, la viabilité soit la même après l'incubation en hypoxie qu'en normoxie. Le diamètre réduit suite à l'hypoxie indiquerait un détachement des cellules mortes.

Il signifierait que le choc hypoxique a été très dommageable, puisque les cellules sont dans un état de mort cellulaire plus avancé que la nécrose habituellement observée. À long terme, la réduction de la viabilité et la réduction du volume du transplant mènent à l'échec de la greffe. C'est aussi à cause de cette importante mort cellulaire que la quantité d'îlots à transplanter pour atteindre l'indépendance à l'insuline est si élevée.

Les colorations AO/IP auraient pu être plus concluantes avec un contrôle positif et un contrôle négatif supplémentaires. Le premier pouvant être des îlots traités avec une substance mortelle pour les cellules, comme la puromycine. Le second aurait pu être une coloration sans iodure de propidium. Aussi, les tests auraient pu être faits après deux jours d'incubation hypoxique pour être moins extrêmes. Les agrégats auraient probablement montré plus de nécrose que de dissociation cellulaire. Finalement, la sécrétion d'insuline en réponse au glucose devrait aussi être vérifiée pour les différents groupes de taille.

Il est important de noter que les cellules MIN6, des cellules immortalisées, sont plus résistantes à l'hypoxie que les cellules d'îlots puisque celles-ci sont des cellules primaires. Les expériences faites avec les MIN6 donnent des résultats préliminaires sur la réponse à l'hypoxie. Le but de l'expérience, soit de montrer que la taille a un effet sur la résistance à l'hypoxie, a été atteint.

D.3.2 Fonction des îlots et des agrégats suite à un choc hypoxique

Pour ce qui est de la fonction des îlots et des agrégats après l'hypoxie, la diminution de la sécrétion basale peut être due au manque d'oxygène, mais aussi au fait que les îlots et les agrégats sont moins viables après une incubation en hypoxie (section C.4.2). Comme il y a moins de cellules vivantes, la sécrétion d'insuline serait plus faible. La sécrétion basale est supposée être moins affectée par le manque d'oxygène puisqu'elle n'est pas ATP-dépendante [98]. Par ailleurs, il est connu qu'un niveau de sécrétion basale faible est un signe de santé des îlots. Dans ces résultats (figure 9), les îlots ont une sécrétion basale assez élevée, ce qui laisse croire qu'ils sont en mauvaise santé, probablement à cause de l'isolation et de la culture *in vitro*. En hypoxie, les îlots et les agrégats ont une sécrétion basale basse, probablement due à une mort cellulaire importante plutôt qu'être un signe de santé.

Les résultats montrant que la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose est diminuée lorsque les cellules sont en hypoxie appuient ceux trouvés dans la littérature [82]. Par exemple, Dionne *et al* mentionnent que lorsque les îlots sont incubés à une pO_2 de 5 mmHg, la sécrétion d'insuline en réponse au glucose diminue à 2%. En effet, la sécrétion d'insuline en réponse au glucose est ATP-dépendante parce qu'elle dépend de l'activation de canaux potassiques ATP-dépendants. Lorsque les cellules manquent d'oxygène, la concentration d'ATP diminue, ce qui entraîne une diminution du ratio ATP/ADP. Les canaux potassiques des cellules β ne sont donc pas fermés, les cellules ne sont pas

dépolarisées, il n'y a pas d'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire, donc l'insuline ne peut plus être sécrétée en réponse à une augmentation de la sécrétion de glucose. Dans le péritoine, comme la concentration d'oxygène peut parfois être presque nulle, il est clair que la fonction des îlots microencapsulés y est affectée. C'est un autre facteur qui augmente la quantité d'îlots nécessaire pour le succès de la transplantation. Il faut plus d'îlot pour normaliser la glycémie, car ils ne sont pas 100% fonctionnels. Toutefois, comme les agrégats sont plus viables après un manque d'oxygène, moins d'agrégats seraient nécessaires pour contrer la perte de fonction.

Toutefois, selon l'hypothèse que les agrégats sont plus résistants à l'hypoxie que les îlots, il était attendu que leur sécrétion d'insuline soit moins affectée. Il est décevant de constater que les agrégats ne répondent pas bien au glucose lorsqu'il y a un manque d'oxygène. L'étude d'O'Sullivan *et al* [114] portant sur le même sujet a aussi vérifié la fonction des îlots et des agrégats. Dans cette étude, en normoxie, il y a une augmentation de la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose des îlots et des agrégats environ 10 fois par rapport à la sécrétion basale. Lorsqu'ils incubent les cellules à 2% d'oxygène, les îlots ne répondent plus au glucose alors que les agrégats sont moins affectés, leur sécrétion d'insuline en réponse au glucose est presque le double du basal.

Il est clair que la technique doit être améliorée pour être plus précise (voir section B.3.3). Il n'y a aucune différence significative dans ces résultats puisque

la variabilité est trop grande et l'expérience n'a pas été faite un nombre de fois assez élevé. De plus, les incubations dans les différents milieux ont été faites à concentration d'oxygène atmosphérique. Les résultats sont donc faussés puisque les cellules avaient accès à l'oxygène nécessaire à la production d'ATP. Les cellules auraient dues être remises en hypoxie pendant les incubations dans les différents milieux. Les résultats présentés ci-dessus illustrent plus l'effet de l'hypoxie sur la survie des îlots que l'effet de l'hypoxie sur la sécrétion d'insuline. Aussi, l'incubation en hypoxie aurait pu être plus courte (trois jours) pour qu'elle soit moins sévère. Il est important de noter que 1% d'oxygène n'est pas la concentration retrouvée dans l'organisme. Cette concentration a été choisie pour induire un fort choc hypoxique pour savoir lequel est le plus résistant entre les îlots et les agrégats. Bref, l'expérience a confirmé que les îlots en hypoxie ne sécrètent pas d'insuline en réponse au glucose, mais elle devrait être refaite pour des résultats plus précis.

D.3.3 Évaluation de la résistance à l'hypoxie des îlots et des agrégats microencapsulés

Comme toutes les expériences de la section C ont été faites avec des îlots et des agrégats non encapsulés, il était important de reproduire les résultats avec des îlots et des agrégats encapsulés. Les résultats montrent que la microcapsule ne modifie pas la réponse des îlots et des agrégats à l'hypoxie. Ces résultats ne sont pas surprenants, car la microcapsule ne modifie pas ou peu les propriétés des îlots. Un groupe a récemment montré que la consommation d'oxygène des îlots

microencapsulés est semblable à celle des îlots libres [157]. Les nombreux exemples de réussite de la transplantation d'îlots microencapsulés suggèrent aussi que les îlots sont viables et fonctionnent bien lorsqu'ils sont encapsulés. La microencapsulation peut cependant avoir un léger effet négatif sur la fonction des îlots et il dépend de l'origine des îlots. La microencapsulation n'affecte pas la fonction des îlots humains. Les îlots de rats ont une baisse de fonction le jour après l'encapsulation, mais elle est restaurée après six jours et les îlots de souris ont une réponse au glucose réduite par rapport aux îlots non encapsulés [158]. Un autre groupe a aussi remarqué une légère diminution de la réponse au glucose due à l'encapsulation [159]. Il faudra donc aussi vérifier la fonction des agrégats encapsulés.

D.3.4 Diminution du diamètre des microcapsules

Afin de diminuer la taille des microcapsules encore plus, d'autres paramètres ont été modifiés, soit le voltage, l'amplitude et la durée de l'impulsion électrostatique, sans donner de résultats. Une publication de Hallé *et al* [147] a pourtant montré le contraire, mais les résultats n'ont pas pu être reproduits. La qualité des préparations de microcapsules est très variable entre les différents essais. Il est possible que ce soit à cause des aiguilles, puisqu'elles sont modifiées manuellement. Des aiguilles commerciales seraient plus appropriées.

Le groupe de Sugiura *et al* a mis au point une nouvelle méthode de fabrication de microcapsules, le « *micro airflow nozzle* ». Cette technique peut

produire des microcapsules de diamètre variant entre 100 et 300 μm [151]. Ils ont aussi montré que les microcapsules de 150 μm améliorent l'oxygénation des cellules [160].

En diminuant la taille des billes, un problème important survient ; les îlots sont plus susceptibles d'être exposés à la surface de la bille au lieu d'être au centre. Ils sont ainsi plus exposés au système immunitaire. Le groupe de De Vos *et al* a évalué qu'une diminution de 300 μm du diamètre des microcapsules amène une augmentation d'environ 20% de la proportion d'agrégats encapsulés incorrectement. Ils ont aussi montré que ce phénomène diminue l'efficacité des îlots lorsqu'ils sont transplantés [67]. Lors des microencapsulations d'îlots avec nos billes de 150 μm , ce phénomène aussi été observé, mais la quantité d'îlots protubérants n'a pas été mesurée. Le groupe de De Vos *et al* a aussi mis au point un test de détection des îlots encapsulés incorrectement [67]. Il s'agit d'une lectine fluorescente qui se lie aux îlots et non à l'alginate. La quantité d'îlots non encapsulés complètement peut alors être évaluée. Quelques expériences préliminaires ont été faites avec cette technique, mais elle n'a pas fonctionné. Une étude serait nécessaire afin de trouver des solutions à ce problème pour permettre l'utilisation des ces petites microcapsules. Le groupe de De Vos *et al* a aussi suggéré que deux propriétés puissent être modifiées pour diminuer le phénomène : un alginate à haute teneur en acide guluronique et une viscosité plus élevée [161].

D.4 Conclusions

Les expériences présentées dans cette section ont permis de valider les données trouvées dans la littérature : que les plus petits agrégats sont les plus résistants à l'hypoxie, que le manque d'oxygène semble diminuer grandement la réponse au glucose des îlots et que la microcapsule n'influence pas la diffusion d'oxygène. Finalement, des essais ont été faits pour diminuer la taille des microcapsules afin d'avoir une meilleure diffusion d'oxygène, mais il reste du travail à faire pour les perfectionner.

E. Conclusions

E.1 Résumé de l'étude

La transplantation d'îlots microencapsulés est un traitement prometteur du diabète de type 1, mais la survie des îlots est encore limitée. Une des raisons de leur survie limitée est que, puisque les îlots ne sont pas revascularisés, ils sont souvent exposés à des conditions hypoxiques et l'hypoxie est néfaste pour leur fonction et leur survie. La présente étude avait pour but de diminuer la taille des îlots pour améliorer la diffusion d'oxygène. Cette étude a permis de mettre au point un modèle visant à améliorer la résistance à l'hypoxie des îlots microencapsulés ; les agrégats. Les travaux ont permis de maîtriser la formation des agrégats et de les caractériser. Leur architecture correspond à celle des îlots de rongeurs, soit une majorité de cellules β au centre et les cellules α et δ en périphérie (Section B). Aussi, suite à un choc hypoxique, les agrégats sont plus viables que les îlots et ils ont une meilleure capacité à restaurer la glycémie à long terme (Section C). Des résultats ont confirmé que la taille des agrégats est un facteur important dans la résistance à l'hypoxie et que les microcapsules n'interfèrent pas avec la diffusion d'oxygène. Des essais ont été faits pour diminuer la taille des microcapsules, mais des améliorations doivent encore être apportées à la technique (Section D). La réponse au glucose des agrégats n'a pas pu être précisément mesurée et il sera important de l'établir. La sécrétion d'insuline en réponse au glucose des agrégats semble fortement diminuée en hypoxie, mais d'autres expériences doivent être faites pour le confirmer. Le

tableau 1 ci-dessous résume les résultats obtenus dans cette étude et les objectifs qui doivent être atteints dans le futur. Bref, les résultats de cette étude montrent que les agrégats sont une stratégie envisageable pour améliorer l'oxygénation des îlots et le succès des transplantations d'îlots microencapsulés.

Tableau 1 : Récapitulation des objectifs et des résultats de cette étude ainsi que les expériences à effectuer dans le futur.

Objectif	Atteint	À atteindre
1) Formation et caractérisation des agrégats	<ul style="list-style-type: none"> • Formation maîtrisée • Organisation cellulaire comme celle des îlots 	<ul style="list-style-type: none"> • Optimiser la formation • Évaluer la fonction des agrégats
2) Comparaison de la résistance à l'hypoxie des îlots et des agrégats	<ul style="list-style-type: none"> • Les agrégats sont plus résistants : <ul style="list-style-type: none"> ✓ % viabilité ✓ expression caspase-3 ✓ expression iNOS ✓ Normalisation de la glycémie 	Évaluer la fonction en hypoxie
3) Étude de la diffusion de l'oxygène	<ul style="list-style-type: none"> • La taille des agrégats influence la diffusion d'oxygène • La microcapsule ne diminue pas la diffusion d'oxygène <i>in vitro</i> • Diminution du diamètre des microcapsules 	Améliorer les petites microcapsules

E.2 Discussion des résultats

E.2.1 Viabilité des îlots et des agrégats après un choc hypoxique

Les résultats présentés dans la section C montrent que les agrégats sont plus résistants à l'hypoxie que les îlots. L'expérience présentée dans la Fig. 8 de la section D.2.1 confirme ces résultats à l'aide des cellules MIN6. Ces deux expériences montrent que lors d'un choc hypoxique sévère et de longue durée, l'état d'apoptose et de nécrose est tellement avancé que les cellules mortes sont dans un état de désintégration et elles sont dissociées des agrégats. Les îlots et les agrégats contiennent peu de cellules mortes, mais une grande quantité de cellules dissociées est présente dans les pétris. Il aurait été intéressant de les quantifier et de vérifier leur mécanisme de mort cellulaire. *In vivo*, cette importante mort cellulaire implique une diminution du volume du transplant et ultimement l'échec de la greffe.

Ces expériences renforcent notre hypothèse, qui est que les agrégats seront plus résistants à l'hypoxie à cause de leur plus petite taille et elles confirment les observations des autres groupes [104, 105].

E.2.2 Marqueurs d'hypoxie

L'expression de caspase-3 et de iNOS après l'hypoxie a été évaluée (Fig.6, section C.4.3). L'immunohistochimie a été la méthode choisie puisque les

autres méthodes telles l'immunobuvardage et la PCR en temps réel nécessitent une très grande quantité d'îlots.

La caspase-3 a été choisie comme marqueur d'apoptose puisqu'il a été démontré qu'elle est exprimée dans les îlots en hypoxie [83]. L'évaluation de la caspase-3 confirme que les agrégats sont plus viables que les îlots après une incubation en hypoxie. Pour ce qui est de iNOS, il a aussi été montré qu'il est exprimé dans les îlots après l'hypoxie [86]. iNOS est responsable de la production de NO et celui-ci, à haute concentration, est néfaste pour les îlots [162]. Aussi, une forte expression de iNOS réduirait la réponse au glucose [163]. Comme iNOS est exprimé plus fortement dans les îlots après un choc hypoxique, il est possible que la fonction soit plus affectée dans les îlots que dans les agrégats, mais cela reste à être confirmé. Bref, ces expériences ont montré que les îlots sont plus affectés par l'hypoxique que les agrégats.

Pour avoir des résultats plus concluants, il aurait fallu avoir des contrôles positifs. Pour la caspase-3, des lysats de cellules Jurkat [164] ou des embryons de souris [165] auraient pu être utilisés et pour iNOS, des lysats de macrophages de souris [166]. Il serait intéressant d'évaluer l'expression de HIF-1 puisque c'est un marqueur direct de l'hypoxie.

E.2.3 Sécrétion d'insuline en réponse au glucose des agrégats

Comme montré à la section B.3.3, la fonction des agrégats n'a pas été établie pendant cette étude. Il sera très important de le faire dans le futur pour confirmer que les cellules d'îlots conservent leur fonction après l'agrégation, puisque les études antérieures sont contradictoires à ce sujet. Il semble que la technique de formation des agrégats peut influencer leur comportement et mener à des fonctions différentes.

Après l'hypoxie, il semble que la sécrétion d'insuline en réponse au glucose des îlots et des agrégats est inhibée. Plus d'expériences devront être faites pour le confirmer, car la technique utilisée n'était pas parfaitement mise au point. Aussi, les expériences devraient être faites à des concentrations d'oxygène physiologiques. Dépendamment du site de transplantation, les concentrations d'oxygène *in vivo* sont plus élevées que 1% et la sécrétion d'insuline est affectée proportionnellement à la concentration d'oxygène [82]. Des concentrations d'oxygène plus élevées donneront des résultats différents. Cependant, le fait que les agrégats soient plus viables que les îlots après un choc hypoxique les rend plus efficaces *in vivo*.

E.2.4 Transplantation d'îlots et d'agrégats microencapsulés

Il est évident que pour que les résultats de transplantation d'îlots et d'agrégats microencapsulés soient plus convaincants, le nombre de souris transplantées devrait être plus élevé. De plus, pour vérifier la fonctionnalité des

agrégats, des tests de tolérance au glucose devraient être faits. Ces tests consistent à administrer du glucose aux souris, puis mesurer leur glycémie afin de vérifier si le glucose sanguin diminue. Les expériences *in vitro* n'ont pas permis de confirmer que les agrégats répondent adéquatement au glucose (Fig.7 Section C.4.4). Il est possible que les agrégats sécrètent de l'insuline de façon basale seulement ou qu'ils ne répondent pas correctement et que ce soit suffisant pour normaliser la glycémie des souris. Il serait important de tester le greffon pour valider sa fonctionnalité.

Les souris immunodéficientes (SCID) ont été choisies afin d'évaluer la capacité des agrégats normaliser la glycémie de souris diabétiques sans être influencé par les facteurs immunitaires. Il faut toutefois noter que, même si ces souris n'ont pas de lymphocytes, elles conservent d'autres types de cellules immunitaires. C'est pourquoi les îlots non encapsulés n'y survivent pas. Quelques expériences préliminaires ont été faites pour évaluer l'efficacité des îlots et des agrégats microencapsulés dans des souris diabétiques immunocompétentes (résultats non présentés). Il a été remarqué qu'il faut une plus grande quantité de cellules pour normaliser la glycémie dans ces souris. Les microcapsules non biocompatibles ou présentant des anomalies sont affectées par le système immunitaire, les îlots sont alors endommagés et une grande quantité est nécessaire.

Il est important de noter que, dans les expériences de transplantation présentées dans la section C.4.4, la même quantité d'îlots équivalents (IEq) d'îlots et d'agrégats a été transplantée. Comme les îlots ne sont pas tous de la même taille, les IEqs sont une mesure visant à normaliser une quantité d'îlots selon leur taille. Un IEq est un îlot de 150 μm . Comme les agrégats sont plus petits que les îlots, environ trois fois plus d'agrégats sont nécessaires pour avoir la même quantité d'IEq. Cependant, approximativement la même quantité de cellules β a été transplantée. De cette façon, les transplantations d'agrégats ont été plus efficaces que celles d'îlots. Il est probable que puisqu'ils sont plus résistants à l'hypoxie, comme montré dans la section C.4.2, qu'ils se soient mieux adaptés que les îlots *in vivo* et qu'ils aient gardé une meilleure viabilité. Il faudra faire plus d'études pour déterminer la quantité minimale d'agrégats requise pour normaliser la glycémie afin de mieux comparer le rendement des îlots et des agrégats.

Comme mentionné dans l'introduction, l'étude des agrégats a été abandonnée dans les années 1990 puisque la perte cellulaire était trop importante et le rendement d'agrégation était trop faible pour être envisageable. Il a été estimé pendant la présente étude qu'environ 400 IEqs sont isolés d'un pancréas de rat alors qu'environ 300 IEqs d'agrégats sont formés avec un pancréas. Il y a certainement une perte cellulaire lors de leur formation, mais elle est compensée par leur meilleure résistance à l'hypoxie. Environ 85% des agrégats sont de taille de 100 μm ou moins alors que cette valeur est d'environ 50% pour les îlots.

Comme mentionné dans la section C.5, il a été estimé que les îlots de moins de 100 µm ne montrent pas de nécrose *in vitro* [144]. L'étude de O'Sullivan *et al* a montré qu'après deux jours de formation, le taux de récupération cellulaire est 55% pour les agrégats, alors qu'il est de 63% pour les îlots [114]. La perte cellulaire n'est pas beaucoup plus importante pour les agrégats que les îlots, car ceux-ci ont une mort cellulaire importante après l'isolation. Il est possible d'améliorer le rendement d'agrégation, en incubant les cellules avec de l'extendine-4, un analogue de GLP-1 [109] ou l'acide rétinoïque [143]. En modifiant les conditions de formation des agrégats, des meilleurs rendements d'agrégation peuvent être obtenus.

E.2.5 Comparaison avec une étude similaire

Récemment, un groupe de Boston travaillant sur la transplantation d'îlots microencapsulés a montré que les agrégats sont supérieurs aux îlots intacts. Ils ont mesuré la consommation d'oxygène, le rendement d'agrégation, le ratio insuline/ADN, la sécrétion d'insuline en réponse au glucose, l'expression de gènes pro-inflammatoires et comparé la transplantation d'îlots et d'agrégats microencapsulés [114]. Après deux jours d'incubation à 2% d'oxygène, ils ont montré que les îlots ont une perte de viabilité d'environ 40%. Les résultats présentés à la section C.4.1 sont similaires; la perte de viabilité des îlots est d'un peu plus de 40% après 3 jours à 1% d'oxygène. Il est intéressant d'arriver aux mêmes conclusions, avec différentes techniques, ce qui confirme le potentiel des agrégats.

E.3 Recommandations

Plusieurs données confirment que les agrégats sont des groupements de cellules semblables aux îlots, mais plus résistants à l'hypoxie à cause de leur plus petite taille. Comme l'hypoxie est une des causes principales de l'échec de la greffe d'îlots microencapsulés, les agrégats semblent une stratégie prometteuse. Il reste des expériences à faire afin de d'optimiser le rendement d'agrégation et de s'assurer qu'ils sont aussi fonctionnels que les îlots. À cause de leur propriété, il y a plusieurs stratégies qui sont envisageables pour améliorer leur performance et les rendre encore plus efficaces que les îlots. La section suivante présente des possibilités pour perfectionner les agrégats.

E.3.1 Amélioration l'oxygénation

Même si les agrégats sont plus petits que les îlots, il reste encore à diminuer la taille des microcapsules pour améliorer la diffusion d'oxygène. Comme mentionné dans les sections A.5.4 et D.3.4, des plus petites microcapsule permettront l'accès à des sites de transplantation mieux oxygénés, comme la capsule rénale et la veine portale. Une autre façon d'améliorer l'oxygénation est l'utilisation des transporteurs d'oxygène, comme les perfluorocarbones. Ils peuvent être intégrés dans la microcapsule pour faciliter la diffusion d'oxygène [167].

E.3.2 Amélioration de la composition

La matrice extracellulaire

Un avantage des agrégats par rapport aux îlots intacts est que, puisque les îlots sont dissociés en cellules simples, cela amène l'opportunité d'intercaler des molécules entre les cellules ou d'insérer d'autres types de cellules pendant leur formation.

Par exemple, des molécules de la matrice extracellulaire (MEC) pourraient être ajoutées aux agrégats. La MEC est formée de plusieurs protéines, comme la laminine, la fibronectine et le collagène. Elles sont reliées aux cellules via des récepteurs cellulaires, les intégrines. Dans différents types cellulaires, ces contacts cellules-matrice ont plusieurs rôles importants, comme la morphogénèse [168], la différenciation [169, 170], la prolifération [171, 172] et la survie cellulaire [172]. Comme la matrice est dégradée lors de l'isolation des îlots [76], ces fonctions peuvent être affectées. Plusieurs groupes ont montré que d'incuber les îlots en contact avec la MEC améliore leur fonction et leur survie [173-175]. Les protéines de la MEC pourraient être incorporées dans les agrégats pour les rendre plus performants. Dans les îlots, la MEC est en contact avec les cellules en périphérie seulement. L'avantage des agrégats est que plus de cellules seront en contact avec la MEC.

Intégration de cellules

Des cellules pourraient aussi être intégrées dans les agrégats lors de leur formation afin de les rendre plus efficaces. Deux groupes ont déjà expérimenté cette approche en formant des agrégats composés de cellules d'îlots et de cellules de sertoli [176, 177]. Les cellules de sertoli sont des cellules testiculaires qui possèdent les facteurs trophiques, régulateurs et nutritifs nécessaires aux cellules germinales, en plus d'avoir des propriétés immunosuppressives [178]. Ces agrégats ont une meilleure survie et une meilleure sécrétion d'insuline en réponse au glucose que les îlots [176, 177].

D'autres types cellulaires pourraient être intégrés aux agrégats. Deux études récentes ont montré que la co-culture des îlots avec des cellules endothéliales améliorent leur fonction et leur survie à cause des différentes protéines qu'elles sécrètent, comme l'endothéline-1 et la laminine [179, 180]. Des cellules souches pourraient aussi être intégrées dans les agrégats. En effet, la co-culture des îlots avec les cellules souches mésenchymateuses rendrait aussi les îlots plus performants [181].

E.3.3 Autres utilisation prometteuses

Beaucoup d'études sont en cours pour trouver des alternatives aux îlots cadavériques, comme les cellules souches/progénitrices, les cellules modifiées génétiquement et les îlots d'animaux (xénogreffe). Ces cellules ont l'avantage de pouvoir être produites en grande quantité et elles pourraient contrer le manque de donneurs. Comme les cellules β isolées ne sont pas fonctionnelles, ces cellules

devront être agrégées pour être fonctionnelles. Il est donc important de maîtriser la formation des agrégats avant de les utiliser à cette fin.

De nombreuses études sont faites pour différencier des cellules souches ou précurseurs en cellules sécrétrices d'insuline. Les cellules différenciées peuvent être, par exemple, des cellules adipeuses dérivées de cellules souches [182], des cellules précurseurs pancréatiques [183, 184] ou des cellules mésenchymateuses [169, 170]. Ces études utilisent des agrégats pour pouvoir obtenir des groupements de cellules sécrétrices d'insuline fonctionnels.

Pour ce qui est des cellules modifiées génétiquement, les agrégats pourront aussi être utilisés avantageusement. En plus de leur rôle dans la fonction à cause des contacts intercellulaires, les agrégats peuvent être transfectés plus efficacement que des îlots intacts. Le taux de transfection des îlots est faible. Les cellules peuvent donc être dispersées, transfectées [185], puis ré-agrégées avec une efficacité de transfection environ 7 fois plus grande que pour les îlots [186]. Plusieurs études sont faites pour améliorer la résistance à l'hypoxie des îlots en les modifiant génétiquement. Par exemple, la neuroglobine, la myoglobine et la cytoglobine, trois protéines impliquées dans le transport de l'oxygène protègent les îlots et améliorent leur performance lorsqu'elles sont transduites [187-189]. La surexpression d'enzymes antioxydantes a aussi été montrée favorable à la survie des îlots parce qu'elles diminuent les niveaux de radicaux libres [190]. Aussi, deux protéines anti-apoptotiques améliorent la survie des îlots lorsqu'elles

sont transfectées, *X-linked inhibitor of apoptosis protein* (XIAP) [191, 192] et *Hypoglycemia/hypoxia Inducible Mitochondrial Protein* (HIMP1) [193].

E.4 Conclusion

En conclusion, la transplantation d'îlots microencapsulés est un traitement du diabète de type 1 très prometteur. Les deux limitations les plus importantes dans la transplantation d'îlot sont la survie limitée des îlots et le manque de donneurs. La présente étude a montré que les agrégats ont une meilleure résistance à l'hypoxie et que leur survie est améliorée par rapport à celle des îlots à cause de leur plus petite taille. Les agrégats permettent d'obtenir une population d'îlots plus petits, en évitant d'éliminer les plus gros îlots. Ils sont donc efficaces pour diminuer l'impact de la première limitation de la transplantation, la survie limitée. Aussi, pour ce qui est de la deuxième limitation, le manque de donneurs, les agrégats seront utiles pour l'utilisation d'autres sources de cellules, comme les cellules souches ou les cellules génétiquement modifiées. Peu importe le type de cellules utilisées, il faudra les ré-agréger pour obtenir des structures fonctionnelles. La maîtrise des agrégats est donc essentielle pour leur utilisation ultérieure. En conclusion, les agrégats sont une alternative intéressante pour la transplantation puisqu'ils ont une meilleure survie et qu'ils pourront être utilisés pour une autre source de cellules pour contrer le manque de donneurs.

F. Annexe

F.1 Bibliographie

1. IDF. *IDF diabetes atlas*. 2009; 4th edition:[]
2. Dean, L., ed. *The Genetic Landscape of Diabetes*. 2004, National Center for Biotechnology Information: Bethesda, MD, USA.
3. Shin, C.S., et al., *Serum 8-hydroxy-guanine levels are increased in diabetic patients*. *Diabetes Care*, 2001. **24**(4): p. 733-7.
4. Lu, B., et al., *Enhanced sensitivity of insulin-resistant adipocytes to vanadate is associated with oxidative stress and decreased reduction of vanadate (+5) to vanadyl (+4)*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(38): p. 35589-98.
5. Araki, E., S. Oyadomari, and M. Mori, *Impact of endoplasmic reticulum stress pathway on pancreatic beta-cells and diabetes mellitus*. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2003. **228**(10): p. 1213-7.
6. Lapolla, A., et al., *On the search for glycosylated lipoprotein ApoA-I in the plasma of diabetic and nephropathic patients*. *J Mass Spectrom*, 2008. **43**(1): p. 74-81.
7. Thompson, C.S., *Animal models of diabetes mellitus: relevance to vascular complications*. *Curr Pharm Des*, 2008. **14**(4): p. 309-24.
8. Molitch, M.E., et al., *Baseline analysis of renal function in the Diabetes Control and Complications Trial. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group [corrected]*. *Kidney Int*, 1993. **43**(3): p. 668-74.
9. Dahl-Jorgensen, K., et al., *Long-term glycemic control and kidney function in insulin-dependent diabetes mellitus*. *Kidney Int*, 1992. **41**(4): p. 920-3.
10. *The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group*. *N Engl J Med*, 1993. **329**(14): p. 977-86.
11. Nathan, D.M., et al., *Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes*. *N Engl J Med*, 2005. **353**(25): p. 2643-53.
12. Morini, S., et al., *Morphological changes of isolated rat pancreatic islets: a structural, ultrastructural and morphometric study*. *J Anat*, 2006. **209**(3): p. 381-92.
13. Ricordi, C., et al., *Islet isolation assessment in man and large animals*. *Acta Diabetol Lat*, 1990. **27**(3): p. 185-95.
14. Prado, C.L., et al., *Ghrelin cells replace insulin-producing beta cells in two mouse models of pancreas development*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(9): p. 2924-9.

15. Luft, R., et al., *Immunohistochemical evidence for the localization of somatostatin--like immunoreactivity in a cell population of the pancreatic islets*. *Med Biol*, 1974. **52**(6): p. 428-30.
16. Brissova, M., et al., *Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy*. *J Histochem Cytochem*, 2005. **53**(9): p. 1087-97.
17. Jiang, G. and B.B. Zhang, *Glucagon and regulation of glucose metabolism*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003. **284**(4): p. E671-8.
18. Yamada, Y., et al., *Cloning and functional characterization of a family of human and mouse somatostatin receptors expressed in brain, gastrointestinal tract, and kidney*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(1): p. 251-5.
19. Hauge-Evans, A.C., et al., *Somatostatin secreted by islet delta-cells fulfills multiple roles as a paracrine regulator of islet function*. *Diabetes*, 2009. **58**(2): p. 403-11.
20. Kojima, M., H. Hosoda, and K. Kangawa, *Purification and distribution of ghrelin: the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor*. *Horm Res*, 2001. **56 Suppl 1**: p. 93-7.
21. Gehlert, D.R., *Multiple receptors for the pancreatic polypeptide (PP-fold) family: physiological implications*. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1998. **218**(1): p. 7-22.
22. Orci, L. and R.H. Unger, *Functional subdivision of islets of Langerhans and possible role of D cells*. *Lancet*, 1975. **2**(7947): p. 1243-4.
23. Cabrera, O., et al., *The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(7): p. 2334-9.
24. Lifson, N., C.V. Lassa, and P.K. Dixit, *Relation between blood flow and morphology in islet organ of rat pancreas*. *Am J Physiol*, 1985. **249**(1 Pt 1): p. E43-8.
25. Lifson, N., et al., *Blood flow to the rabbit pancreas with special reference to the islets of Langerhans*. *Gastroenterology*, 1980. **79**(3): p. 466-73.
26. Bonner-Weir, S. and L. Orci, *New perspectives on the microvasculature of the islets of Langerhans in the rat*. *Diabetes*, 1982. **31**(10): p. 883-9.
27. Jansson, L. and C. Hellerstrom, *Stimulation by glucose of the blood flow to the pancreatic islets of the rat*. *Diabetologia*, 1983. **25**(1): p. 45-50.
28. Bearer, E.L. and L. Orci, *Endothelial fenestral diaphragms: a quick-freeze, deep-etch study*. *J Cell Biol*, 1985. **100**(2): p. 418-28.
29. Jensen, M.V., et al., *Metabolic cycling in control of glucose-stimulated insulin secretion*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008. **295**(6): p. E1287-97.
30. Bavamian, S., et al., *Islet-cell-to-cell communication as basis for normal insulin secretion*. *Diabetes Obes Metab*, 2007. **9 Suppl 2**: p. 118-32.
31. Poci, A., et al., *Hypothalamic K(ATP) channels control hepatic glucose production*. *Nature*, 2005. **434**(7036): p. 1026-31.
32. White, M.F. and C.R. Kahn, *The insulin signaling system*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(1): p. 1-4.

33. Gruessner, A.C. and D.E. Sutherland, *Pancreas transplant outcomes for United States (US) and non-US cases as reported to the United Network for Organ Sharing (UNOS) and the International Pancreas Transplant Registry (IPTR) as of June 2004*. Clin Transplant, 2005. **19**(4): p. 433-55.
34. Brendel M, H.B., Schulz A, Bretzel R., *International Islet Transplant Registry Report*. 2001.
35. Shapiro, A.M., et al., *Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen*. N Engl J Med, 2000. **343**(4): p. 230-8.
36. *2007 update on allogeneic islet transplantation from the Collaborative Islet Transplant Registry (CITR)*. Cell Transplant, 2009. **18**(7): p. 753-67.
37. Ryan, E.A., et al., *Five-year follow-up after clinical islet transplantation*. Diabetes, 2005. **54**(7): p. 2060-9.
38. Penn, I., *Post-transplant malignancy: the role of immunosuppression*. Drug Saf, 2000. **23**(2): p. 101-13.
39. Vial, T. and J. Descotes, *Immunosuppressive drugs and cancer*. Toxicology, 2003. **185**(3): p. 229-40.
40. Senior, P.A., et al., *Changes in renal function after clinical islet transplantation: four-year observational study*. Am J Transplant, 2007. **7**(1): p. 91-8.
41. Rauch, M.C., et al., *Tacrolimus causes a blockage of protein secretion which reinforces its immunosuppressive activity and also explains some of its toxic side-effects*. Transpl Immunol, 2009. **22**(1-2): p. 72-81.
42. Hamazaki, K., Y. Doi, and N. Koide, *Microencapsulated multicellular spheroid of rat hepatocytes transplanted intraperitoneally after 90% hepatectomy*. Hepatogastroenterology, 2002. **49**(48): p. 1514-6.
43. Hasse, C., et al., *Parathyroid allotransplantation without immunosuppression*. Lancet, 1997. **350**(9087): p. 1296-7.
44. Lindner, M.D. and D.F. Emerich, *Therapeutic potential of a polymer-encapsulated L-DOPA and dopamine-producing cell line in rodent and primate models of Parkinson's disease*. Cell Transplant, 1998. **7**(2): p. 165-74.
45. Emerich, D.F. and H.C. Salzberg, *Update on immunoisolation cell therapy for CNS diseases*. Cell Transplant, 2001. **10**(1): p. 3-24.
46. Abalovich, A.G., et al., *Pig pancreatic islet transplantation into spontaneously diabetic dogs*. Transplant Proc, 2009. **41**(1): p. 328-30.
47. Meyer, T., B. Hocht, and K. Ulrichs, *Xenogeneic islet transplantation of microencapsulated porcine islets for therapy of type I diabetes: long-term normoglycemia in STZ-diabetic rats without immunosuppression*. Pediatr Surg Int, 2008. **24**(12): p. 1375-8.
48. Kobayashi, T., et al., *Prolonged survival of microencapsulated neonatal porcine islet xenografts in immune-competent mice without antirejection therapy*. Cell Transplant, 2008. **17**(10-11): p. 1243-56.
49. Chang, T.M., *Semipermeable Microcapsules*. Science, 1964. **146**: p. 524-5.

50. Chick, W.L., et al., *Artificial pancreas using living beta cells: effects on glucose homeostasis in diabetic rats*. Science, 1977. **197**(4305): p. 780-2.
51. Sun, A.M., et al., *The use, in diabetic rats and monkeys, of artificial capillary units containing cultured islets of Langerhans (artificial endocrine pancreas)*. Diabetes, 1977. **26**(12): p. 1136-9.
52. Sun, A.M., *Advantages of microencapsulation as an immunoprotection method in the transplantation of pancreatic islets*. Ann Transplant, 1997. **2**(3): p. 55-62.
53. Lim, F. and A.M. Sun, *Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas*. Science, 1980. **210**(4472): p. 908-10.
54. O'Shea, G.M., M.F. Goosen, and A.M. Sun, *Prolonged survival of transplanted islets of Langerhans encapsulated in a biocompatible membrane*. Biochim Biophys Acta, 1984. **804**(1): p. 133-6.
55. De Vos, P., et al., *Why do microencapsulated islet grafts fail in the absence of fibrotic overgrowth?* Diabetes, 1999. **48**(7): p. 1381-8.
56. Leu, F.J., et al., *Microencapsulated pancreatic islets: a pathologic study*. J Formos Med Assoc, 1992. **91**(9): p. 849-58.
57. Duvivier-Kali, V.F., et al., *Complete protection of islets against allo rejection and autoimmunity by a simple barium-alginate membrane*. Diabetes, 2001. **50**(8): p. 1698-705.
58. Soon-Shiong, P., et al., *Insulin independence in a type 1 diabetic patient after encapsulated islet transplantation*. Lancet, 1994. **343**(8903): p. 950-1.
59. Calafiore, R., et al., *Microencapsulated pancreatic islet allografts into nonimmunosuppressed patients with type 1 diabetes: first two cases*. Diabetes Care, 2006. **29**(1): p. 137-8.
60. Tuch, B.E., et al., *Safety and viability of microencapsulated human islets transplanted into diabetic humans*. Diabetes Care, 2009. **32**(10): p. 1887-9.
61. De Vos, P., et al., *Improved biocompatibility but limited graft survival after purification of alginate for microencapsulation of pancreatic islets*. Diabetologia, 1997. **40**(3): p. 262-70.
62. Skjak-Braek, G., E. Murano, and S. Paoletti, *Alginate as immobilization material. II: Determination of polyphenol contaminants by fluorescence spectroscopy, and evaluation of methods for their removal*. Biotechnol Bioeng, 1989. **33**(1): p. 90-4.
63. Tam, S.K., et al., *Impact of residual contamination on the biofunctional properties of purified alginates used for cell encapsulation*. Biomaterials, 2006. **27**(8): p. 1296-305.
64. Langlois, G., et al., *Direct effect of alginate purification on the survival of islets immobilized in alginate-based microcapsules*. Acta Biomater, 2009. **5**(9): p. 3433-40.
65. Mallett, A.G. and G.S. Korbitt, *Alginate modification improves long-term survival and function of transplanted encapsulated islets*. Tissue Eng Part A, 2009. **15**(6): p. 1301-9.

66. De Vos, P., B. De Haan, and R. Van Schilfgaarde, *Effect of the alginate composition on the biocompatibility of alginate-polylysine microcapsules*. *Biomaterials*, 1997. **18**(3): p. 273-8.
67. De Vos, P., et al., *Association between capsule diameter, adequacy of encapsulation, and survival of microencapsulated rat islet allografts*. *Transplantation*, 1996. **62**(7): p. 893-9.
68. Bottino, R., et al., *Transplantation of allogeneic islets of Langerhans in the rat liver: effects of macrophage depletion on graft survival and microenvironment activation*. *Diabetes*, 1998. **47**(3): p. 316-23.
69. Rossi, L., et al., *Prolonged islet allograft survival in diabetic mice upon macrophage depletion by clodronate-loaded erythrocytes*. *Transplantation*, 2008. **85**(4): p. 648-50.
70. de Vos, P., et al., *Factors influencing functional survival of microencapsulated islet grafts*. *Cell Transplant*, 2004. **13**(5): p. 515-24.
71. Eizirik, D.L., et al., *Cytokines suppress human islet function irrespective of their effects on nitric oxide generation*. *J Clin Invest*, 1994. **93**(5): p. 1968-74.
72. Cardozo, A.K., et al., *IL-1beta and IFN-gamma induce the expression of diverse chemokines and IL-15 in human and rat pancreatic islet cells, and in islets from pre-diabetic NOD mice*. *Diabetologia*, 2003. **46**(2): p. 255-66.
73. de Vos, P., et al., *Association between macrophage activation and function of micro-encapsulated rat islets*. *Diabetologia*, 2003. **46**(5): p. 666-73.
74. Robitaille, R., et al., *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*, 2000. **50**(3): p. 420-7.
75. Rosenberg, L., et al., *Structural and functional changes resulting from islet isolation lead to islet cell death*. *Surgery*, 1999. **126**(2): p. 393-8.
76. Wang, R.N. and L. Rosenberg, *Maintenance of beta-cell function and survival following islet isolation requires re-establishment of the islet-matrix relationship*. *J Endocrinol*, 1999. **163**(2): p. 181-90.
77. Ilieva, A., et al., *Pancreatic islet cell survival following islet isolation: the role of cellular interactions in the pancreas*. *J Endocrinol*, 1999. **161**(3): p. 357-64.
78. Bottino, R., et al., *Response of human islets to isolation stress and the effect of antioxidant treatment*. *Diabetes*, 2004. **53**(10): p. 2559-68.
79. Johansson, U., et al., *Inflammatory mediators expressed in human islets of Langerhans: implications for islet transplantation*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. **308**(3): p. 474-9.
80. Mueller-Klieser, W.F. and R.M. Sutherland, *Influence of convection in the growth medium on oxygen tensions in multicellular tumor spheroids*. *Cancer Res*, 1982. **42**(1): p. 237-42.
81. Schrezenmeir, J., et al., *Effect of microencapsulation on oxygen distribution in islets organs*. *Transplantation*, 1994. **57**(9): p. 1308-14.

82. Dionne, K.E., C.K. Colton, and M.L. Yarmush, *Effect of hypoxia on insulin secretion by isolated rat and canine islets of Langerhans*. *Diabetes*, 1993. **42**(1): p. 12-21.
83. Moritz, W., et al., *Apoptosis in hypoxic human pancreatic islets correlates with HIF-1alpha expression*. *FASEB J*, 2002. **16**(7): p. 745-7.
84. Linn, T., et al., *Ischaemia is linked to inflammation and induction of angiogenesis in pancreatic islets*. *Clin Exp Immunol*, 2006. **144**(2): p. 179-87.
85. Giuliani, M., et al., *Central necrosis in isolated hypoxic human pancreatic islets: evidence for postisolation ischemia*. *Cell Transplant*, 2005. **14**(1): p. 67-76.
86. Ko, S.H., et al., *Inducible nitric oxide synthase-nitric oxide plays an important role in acute and severe hypoxic injury to pancreatic beta cells*. *Transplantation*, 2008. **85**(3): p. 323-30.
87. McClintock, D.S., et al., *Bcl-2 family members and functional electron transport chain regulate oxygen deprivation-induced cell death*. *Mol Cell Biol*, 2002. **22**(1): p. 94-104.
88. Wang, G.L., et al., *Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(12): p. 5510-4.
89. Ivan, M., et al., *Biochemical purification and pharmacological inhibition of a mammalian prolyl hydroxylase acting on hypoxia-inducible factor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(21): p. 13459-64.
90. Kallio, P.J., et al., *Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1alpha by the ubiquitin-proteasome pathway*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(10): p. 6519-25.
91. Vasir, B., et al., *Hypoxia induces vascular endothelial growth factor gene and protein expression in cultured rat islet cells*. *Diabetes*, 1998. **47**(12): p. 1894-903.
92. Akakura, N., et al., *Constitutive expression of hypoxia-inducible factor-1alpha renders pancreatic cancer cells resistant to apoptosis induced by hypoxia and nutrient deprivation*. *Cancer Res*, 2001. **61**(17): p. 6548-54.
93. Kolev, Y., et al., *Lactate dehydrogenase-5 (LDH-5) expression in human gastric cancer: association with hypoxia-inducible factor (HIF-1alpha) pathway, angiogenic factors production and poor prognosis*. *Ann Surg Oncol*, 2008. **15**(8): p. 2336-44.
94. Carmeliet, P., et al., *Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis*. *Nature*, 1998. **394**(6692): p. 485-90.
95. Bruick, R.K., *Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(16): p. 9082-7.
96. Malaisse, W.J., et al., *Hexose metabolism in pancreatic islets: the Pasteur effect*. *Diabetes Res*, 1988. **7**(2): p. 53-8.
97. Miao, G., et al., *Dynamic production of hypoxia-inducible factor-1alpha in early transplanted islets*. *Am J Transplant*, 2006. **6**(11): p. 2636-43.

98. de Groot, M., et al., *Response of encapsulated rat pancreatic islets to hypoxia*. Cell Transplant, 2003. **12**(8): p. 867-75.
99. Komatsu, D.E. and M. Hadjiargyrou, *Activation of the transcription factor HIF-1 and its target genes, VEGF, HO-1, iNOS, during fracture repair*. Bone, 2004. **34**(4): p. 680-8.
100. Hu, R., A. Dai, and S. Tan, *Hypoxia-inducible factor 1 alpha upregulates the expression of inducible nitric oxide synthase gene in pulmonary arteries of hypoxic rat*. Chin Med J (Engl), 2002. **115**(12): p. 1833-7.
101. Ryu, G.R., et al., *Activation of AMP-activated protein kinase mediates acute and severe hypoxic injury to pancreatic beta cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **386**(2): p. 356-62.
102. Gu, L., et al., *In vivo properties of monocyte chemoattractant protein-1*. J Leukoc Biol, 1997. **62**(5): p. 577-80.
103. Carlsson, P.O., et al., *Markedly decreased oxygen tension in transplanted rat pancreatic islets irrespective of the implantation site*. Diabetes, 2001. **50**(3): p. 489-95.
104. Lehmann, R., et al., *Superiority of small islets in human islet transplantation*. Diabetes, 2007. **56**(3): p. 594-603.
105. MacGregor, R.R., et al., *Small rat islets are superior to large islets in in vitro function and in transplantation outcomes*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006. **290**(5): p. E771-9.
106. Hopcroft, D.W., D.R. Mason, and R.S. Scott, *Insulin secretion from perfused rat pancreatic pseudoislets*. In Vitro Cell Dev Biol, 1985. **21**(8): p. 421-7.
107. Hopcroft, D.W., D.R. Mason, and R.S. Scott, *Structure-function relationships in pancreatic islets: support for intraislet modulation of insulin secretion*. Endocrinology, 1985. **117**(5): p. 2073-80.
108. Halban, P.A., et al., *Spontaneous reassociation of dispersed adult rat pancreatic islet cells into aggregates with three-dimensional architecture typical of native islets*. Diabetes, 1987. **36**(7): p. 783-90.
109. Cavallari, G., et al., *Rat pancreatic islet size standardization by the "hanging drop" technique*. Transplant Proc, 2007. **39**(6): p. 2018-20.
110. Lione, L., et al., *Rat serum improves rat pseudoislet formation and insulin gene expression*. Boll Soc Ital Biol Sper, 2001. **77**(1-3): p. 13-9.
111. Matta, S.G., et al., *Pancreatic islet cell reaggregation systems: efficiency of cell reassociation and endocrine cell topography of rat islet-like aggregates*. Pancreas, 1994. **9**(4): p. 439-49.
112. Ono, J., et al., *Long-term culture of pancreatic islet cells with special reference to the beta-cell function*. In Vitro, 1979. **15**(2): p. 95-102.
113. Ohgawara, H., et al., *Monolayer-forming islet cell culture from neonatal pig pancreas: using sequential treatment with EDTA-dispase and monoiodoacetic acid for preparation and purification*. Tohoku J Exp Med, 1987. **153**(4): p. 375-82.
114. O'Sullivan, E.S., et al., *Rat islet cell aggregates are superior to islets for transplantation in microcapsules*. Diabetologia, 2010. **53**(5): p. 937-45.

115. Kakizaki, K., G. Basadonna, and R.C. Merrell, *Allotransplantation of islet endocrine aggregates*. Diabetes, 1987. **36**(3): p. 315-9.
116. Dahl, U., A. Sjodin, and H. Semb, *Cadherins regulate aggregation of pancreatic beta-cells in vivo*. Development, 1996. **122**(9): p. 2895-902.
117. Rouiller, D.G., V. Cirulli, and P.A. Halban, *Uvomorulin mediates calcium-dependent aggregation of islet cells, whereas calcium-independent cell adhesion molecules distinguish between islet cell types*. Dev Biol, 1991. **148**(1): p. 233-42.
118. Brereton, H.C., et al., *Homotypic cell contact enhances insulin but not glucagon secretion*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **344**(3): p. 995-1000.
119. Rouiller, D.G., V. Cirulli, and P.A. Halban, *Differences in aggregation properties and levels of the neural cell adhesion molecule (NCAM) between islet cell types*. Exp Cell Res, 1990. **191**(2): p. 305-12.
120. Cirulli, V., et al., *Expression of neural cell adhesion molecule (N-CAM) in rat islets and its role in islet cell type segregation*. J Cell Sci, 1994. **107** (Pt 6): p. 1429-36.
121. Steinberg, M.S., *Does differential adhesion govern self-assembly processes in histogenesis? Equilibrium configurations and the emergence of a hierarchy among populations of embryonic cells*. J Exp Zool, 1970. **173**(4): p. 395-433.
122. Foty, R.A. and M.S. Steinberg, *The differential adhesion hypothesis: a direct evaluation*. Dev Biol, 2005. **278**(1): p. 255-63.
123. Jia, D., D. Dajusta, and R.A. Foty, *Tissue surface tensions guide in vitro self-assembly of rodent pancreatic islet cells*. Dev Dyn, 2007. **236**(8): p. 2039-49.
124. Serre-Beinier, V., et al., *Cx36 preferentially connects beta-cells within pancreatic islets*. Diabetes, 2000. **49**(5): p. 727-34.
125. Angst, B.D., C. Marcozzi, and A.I. Magee, *The cadherin superfamily: diversity in form and function*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 4): p. 629-41.
126. Wheelock, M.J. and K.R. Johnson, *Cadherin-mediated cellular signaling*. Curr Opin Cell Biol, 2003. **15**(5): p. 509-14.
127. Woodfield, R.J., et al., *The p85 subunit of phosphoinositide 3-kinase is associated with beta-catenin in the cadherin-based adhesion complex*. Biochem J, 2001. **360**(Pt 2): p. 335-44.
128. Rogers, G.J., M.N. Hodgkin, and P.E. Squires, *E-cadherin and cell adhesion: a role in architecture and function in the pancreatic islet*. Cell Physiol Biochem, 2007. **20**(6): p. 987-94.
129. Luther, M.J., et al., *MIN6 beta-cell-beta-cell interactions influence insulin secretory responses to nutrients and non-nutrients*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **343**(1): p. 99-104.
130. Hauge-Evans, A.C., et al., *Pancreatic beta-cell-to-beta-cell interactions are required for integrated responses to nutrient stimuli: enhanced Ca²⁺ and insulin secretory responses of MIN6 pseudoislets*. Diabetes, 1999. **48**(7): p. 1402-8.

131. Linzel, M., A. Ciccarelli, and R.C. Merrell, *Beta cell contact and insulin release*. Biochem Biophys Res Commun, 1988. **153**(3): p. 999-1005.
132. Bosco, D., D.G. Rouiller, and P.A. Halban, *Differential expression of E-cadherin at the surface of rat beta-cells as a marker of functional heterogeneity*. J Endocrinol, 2007. **194**(1): p. 21-9.
133. Carvell, M.J., et al., *E-cadherin interactions regulate beta-cell proliferation in islet-like structures*. Cell Physiol Biochem, 2007. **20**(5): p. 617-26.
134. Yamagata, K., et al., *Overexpression of dominant-negative mutant hepatocyte nuclear factor-1 alpha in pancreatic beta-cells causes abnormal islet architecture with decreased expression of E-cadherin, reduced beta-cell proliferation, and diabetes*. Diabetes, 2002. **51**(1): p. 114-23.
135. Cirulli, V., P.A. Halban, and D.G. Rouiller, *Tumor necrosis factor-alpha modifies adhesion properties of rat islet B cells*. J Clin Invest, 1993. **91**(5): p. 1868-76.
136. Thurmond, D.C., et al., *Glucose-stimulated insulin secretion is coupled to the interaction of actin with the t-SNARE (target membrane soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor protein) complex*. Mol Endocrinol, 2003. **17**(4): p. 732-42.
137. Calabrese, A., et al., *Connexin 36 controls synchronization of Ca²⁺ oscillations and insulin secretion in MIN6 cells*. Diabetes, 2003. **52**(2): p. 417-24.
138. Schwarznau, A., et al., *IL-1beta receptor blockade protects islets against pro-inflammatory cytokine induced necrosis and apoptosis*. J Cell Physiol, 2009. **220**(2): p. 341-7.
139. Montanya, E., et al., *Linear correlation between beta-cell mass and body weight throughout the lifespan in Lewis rats: role of beta-cell hyperplasia and hypertrophy*. Diabetes, 2000. **49**(8): p. 1341-6.
140. King, A.J., et al., *Normal relationship of beta- and non-beta-cells not needed for successful islet transplantation*. Diabetes, 2007. **56**(9): p. 2312-8.
141. Stenn, K.S., et al., *Dispase, a neutral protease from Bacillus polymyxa, is a powerful fibronectinase and type IV collagenase*. J Invest Dermatol, 1989. **93**(2): p. 287-90.
142. Huang, H.L., et al., *Trypsin-induced proteome alteration during cell subculture in mammalian cells*. J Biomed Sci, 2010. **17**: p. 36.
143. Chertow, B.S., et al., *Cellular mechanisms of insulin release. Effects of retinoids on rat islet cell-to-cell adhesion, reaggregation, and insulin release*. Diabetes, 1983. **32**(6): p. 568-74.
144. Buchwald, P., *FEM-based oxygen consumption and cell viability models for avascular pancreatic islets*. Theor Biol Med Model, 2009. **6**: p. 5.
145. Boockfor, F.R. and M. Fidan, *Reverse hemolytic plaque assays: versatility in the study of secretion*. Methods, 2004. **33**(4): p. 273-80.
146. Lacy, P.E. and M. Kostianovsky, *Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas*. Diabetes, 1967. **16**(1): p. 35-9.

147. Halle, J.P., et al., *Studies on small (< 300 microns) microcapsules: II--Parameters governing the production of alginate beads by high voltage electrostatic pulses*. Cell Transplant, 1994. **3**(5): p. 365-72.
148. Lakhani, S.A., et al., *Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis*. Science, 2006. **311**(5762): p. 847-51.
149. Renvall, S. and J. Niinikoski, *Intraperitoneal oxygen and carbon dioxide tensions in experimental adhesion disease and peritonitis*. Am J Surg, 1975. **130**(3): p. 286-92.
150. Davalli, A.M., et al., *A selective decrease in the beta cell mass of human islets transplanted into diabetic nude mice*. Transplantation, 1995. **59**(6): p. 817-20.
151. Sugiura, S., et al., *Size control of calcium alginate beads containing living cells using micro-nozzle array*. Biomaterials, 2005. **26**(16): p. 3327-31.
152. Kaur, S., J. Cortiella, and C.A. Vacanti, *Identifying a site for maximum delivery of oxygen to transplanted cells*. Tissue Eng, 2000. **6**(3): p. 229-32.
153. Siebers, U., et al., *Transplantation of free and microencapsulated islets in rats: evidence for the requirement of an increased islet mass for transplantation into the peritoneal site*. Int J Artif Organs, 1993. **16**(2): p. 96-9.
154. Miyazaki, J., et al., *Establishment of a pancreatic beta cell line that retains glucose-inducible insulin secretion: special reference to expression of glucose transporter isoforms*. Endocrinology, 1990. **127**(1): p. 126-32.
155. Ishihara, H., et al., *Pancreatic beta cell line MIN6 exhibits characteristics of glucose metabolism and glucose-stimulated insulin secretion similar to those of normal islets*. Diabetologia, 1993. **36**(11): p. 1139-45.
156. Yokoe, T., et al., *Intermittent hypoxia reverses the diurnal glucose rhythm and causes pancreatic beta-cell replication in mice*. J Physiol, 2008. **586**(3): p. 899-911.
157. Cornolti, R., M. Figliuzzi, and A. Remuzzi, *Effect of micro- and macroencapsulation on oxygen consumption by pancreatic islets*. Cell Transplant, 2009. **18**(2): p. 195-201.
158. Sandler, S., et al., *Assessment of insulin secretion in vitro from microencapsulated fetal porcine islet-like cell clusters and rat, mouse, and human pancreatic islets*. Transplantation, 1997. **63**(12): p. 1712-8.
159. Koo, S.K., et al., *Experimental microencapsulation of porcine and rat pancreatic islet cells with air-driven droplet generator and alginate*. Transplant Proc, 2008. **40**(8): p. 2578-80.
160. Sugiura, S., et al., *Microfabricated airflow nozzle for microencapsulation of living cells into 150 micrometer microcapsules*. Biomed Microdevices, 2007. **9**(1): p. 91-9.
161. De Vos, P., et al., *Factors influencing the adequacy of microencapsulation of rat pancreatic islets*. Transplantation, 1996. **62**(7): p. 888-93.

162. Hughes, K.J., et al., *Nitric oxides mediates a shift from early necrosis to late apoptosis in cytokine-treated {beta}-cells that is associated with irreversible DNA damage*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009.
163. Mosen, H., et al., *Impaired glucose-stimulated insulin secretion in the GK rat is associated with abnormalities in islet nitric oxide production*. Regul Pept, 2008. **151**(1-3): p. 139-46.
164. Hartmann, A., et al., *Caspase-3: A vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(6): p. 2875-80.
165. Hinck, L., et al., *Identification of caspase-3 and caspase-activated deoxyribonuclease in rat blastocysts and their implication in the induction of chromatin degradation (but not nuclear fragmentation) by high glucose*. Biol Reprod, 2001. **64**(2): p. 555-62.
166. Di Girolamo, G., et al., *Effects of cyclooxygenase inhibitor pretreatment on nitric oxide production, nNOS and iNOS expression in rat cerebellum*. Br J Pharmacol, 2003. **139**(6): p. 1164-70.
167. Zimmermann, U., et al., *Non-invasive evaluation of the location, the functional integrity and the oxygen supply of implants: 19F nuclear magnetic resonance imaging of perfluorocarbon-loaded Ba²⁺-alginate beads*. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol, 2000. **28**(2): p. 129-46.
168. Fassler, R. and M. Meyer, *Consequences of lack of beta 1 integrin gene expression in mice*. Genes Dev, 1995. **9**(15): p. 1896-908.
169. Lin, H.Y., et al., *Fibronectin and laminin promote differentiation of human mesenchymal stem cells into insulin producing cells through activating Akt and ERK*. J Biomed Sci, 2010. **17**: p. 56.
170. Chang, C.F., et al., *Fibronectin and pellet suspension culture promote differentiation of human mesenchymal stem cells into insulin producing cells*. J Biomed Mater Res A, 2008. **86**(4): p. 1097-105.
171. Parnaud, G., et al., *Signaling pathways implicated in the stimulation of beta-cell proliferation by extracellular matrix*. Mol Endocrinol, 2009. **23**(8): p. 1264-71.
172. Meredith, J.E., Jr., B. Fazeli, and M.A. Schwartz, *The extracellular matrix as a cell survival factor*. Mol Biol Cell, 1993. **4**(9): p. 953-61.
173. Weber, L.M. and K.S. Anseth, *Hydrogel encapsulation environments functionalized with extracellular matrix interactions increase islet insulin secretion*. Matrix Biol, 2008. **27**(8): p. 667-73.
174. Weber, L.M., K.N. Hayda, and K.S. Anseth, *Cell-matrix interactions improve beta-cell survival and insulin secretion in three-dimensional culture*. Tissue Eng Part A, 2008. **14**(12): p. 1959-68.
175. Beattie, G.M., et al., *Functional impact of attachment and purification in the short term culture of human pancreatic islets*. J Clin Endocrinol Metab, 1991. **73**(1): p. 93-8.
176. Cameron, D.F., et al., *Formation of Sertoli cell-enriched tissue constructs utilizing simulated microgravity technology*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **944**: p. 420-8.

177. Han, X., et al., *Transplantation of sertoli-islet cell aggregates formed by microgravity: prolonged survival in diabetic rats*. *Exp Biol Med* (Maywood), 2009. **234**(5): p. 595-603.
178. Mital, P., G. Kaur, and J.M. Dufour, *Immunoprotective sertoli cells: making allogeneic and xenogeneic transplantation feasible*. *Reproduction*, 2010. **139**(3): p. 495-504.
179. Song, H.J., et al., *Improved islet survival and function with rat endothelial cells in vitro co-culture*. *Transplant Proc*, 2009. **41**(10): p. 4302-6.
180. Johansson, A., et al., *Endothelial cell signalling supports pancreatic beta cell function in the rat*. *Diabetologia*, 2009. **52**(11): p. 2385-94.
181. Park, K.S., et al., *Trophic molecules derived from human mesenchymal stem cells enhance survival, function, and angiogenesis of isolated islets after transplantation*. *Transplantation*, 2010. **89**(5): p. 509-17.
182. Chandra, V., et al., *Generation of pancreatic hormone-expressing islet-like cell aggregates from murine adipose tissue-derived stem cells*. *Stem Cells*, 2009. **27**(8): p. 1941-53.
183. Kikugawa, R., et al., *Differentiation of COPAS-sorted non-endocrine pancreatic cells into insulin-positive cells in the mouse*. *Diabetologia*, 2009. **52**(4): p. 645-52.
184. Hardikar, A.A., et al., *Human pancreatic precursor cells secrete FGF2 to stimulate clustering into hormone-expressing islet-like cell aggregates*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(12): p. 7117-22.
185. Lee, D.Y., et al., *Optimal aggregation of dissociated islet cells for functional islet-like cluster*. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2008. **19**(4): p. 441-52.
186. Callewaert, H., et al., *Cell loss during pseudoislet formation hampers profound improvements in islet lentiviral transduction efficacy for transplantation purposes*. *Cell Transplant*, 2007. **16**(5): p. 527-37.
187. Tilakaratne, H.K., et al., *Can myoglobin expression in pancreatic beta cells improve insulin secretion under hypoxia? An exploratory study with transgenic porcine islets*. *Artif Organs*, 2007. **31**(7): p. 521-31.
188. Stagner, J.I., et al., *Protection from ischemic cell death by the induction of cytoglobin*. *Transplant Proc*, 2005. **37**(8): p. 3452-3.
189. Mendoza, V., et al., *Protection of islets in culture by delivery of oxygen binding neuroglobin via protein transduction*. *Transplant Proc*, 2005. **37**(1): p. 237-40.
190. Mysore, T.B., et al., *Overexpression of glutathione peroxidase with two isoforms of superoxide dismutase protects mouse islets from oxidative injury and improves islet graft function*. *Diabetes*, 2005. **54**(7): p. 2109-16.
191. Emamaullee, J.A., et al., *XIAP overexpression in human islets prevents early posttransplant apoptosis and reduces the islet mass needed to treat diabetes*. *Diabetes*, 2005. **54**(9): p. 2541-8.
192. Plesner, A., et al., *The X-linked inhibitor of apoptosis protein enhances survival of murine islet allografts*. *Diabetes*, 2005. **54**(9): p. 2533-40.

193. Wang, J., et al., *Pancreatic beta cells lack a low glucose and O₂-inducible mitochondrial protein that augments cell survival*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(28): p. 10636-41.

F.2 Preuve de soumission article

La page suivante est la preuve de la soumission de l'article, suivi de l'accord des co-auteurs.



[Edit Account](#) | [Instructions & Forms](#) | [Log Out](#) | [Get Help Now](#)

SCHOLARONE[®]
Manuscripts

[Main Menu](#) → [Author Dashboard](#) → Submission Confirmation

You are logged in as Stéphanie Bilodeau

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Artificial Organs*.

Manuscript ID: AO-00199-2010

Title: Improved ability of islet cell aggregates to resist hypoxia and normalize glucose in vivo

Authors: Bilodeau, Stéphanie
Tam, Susan
Langlois, Geneviève
Hallé, Jean-Pierre

Date Submitted: 21-Aug-2010



Print



Return to Dashboard

ScholarOne Manuscripts™ v4.4.0(patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2010. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.

Follow ScholarOne on Twitter


[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#) - [Get Help Now](#)

**ACCORD DES COAUTEURS D'UN ARTICLE
INCLUS DANS UN MÉMOIRE DE MAÎTRISE OU UNE THÈSE DE DOCTORAT**

Lorsqu'un étudiant n'est pas le seul auteur d'un article qu'il veut inclure dans son mémoire ou dans sa thèse, il doit obtenir l'accord de tous les coauteurs. De plus, le nom de tous les coauteurs doit apparaître dans le manuscrit pour chacun des articles. Enfin, une déclaration distincte doit être complétée et ce, également pour chacun des articles inclus dans le mémoire ou la thèse.

Pour toute information complémentaire, consultez le *Guide de présentation et d'évaluation des mémoires de maîtrise et des thèses de doctorat* dans la section Publications du site www.fesp.umontreal.ca.

1. Identification

Nom Bilodeau	Prénom Stéphanie	Code permanent 
Grade M.Sc.	Programme Sciences Biomédicales	

2. Description de l'article

Auteurs
Stéphanie Bilodeau, Susan K. Tam, Geneviève Langlois, Jean-Pierre Hallé

Titre Improving resistance to hypoxia of microencapsulated islet with islet cells re-aggregates


État actuel de l'article publié soumis pour publication en préparation

Revue / journal *
Transplantation proceedings

* Si l'article est en phase finale de préparation ou a été soumis pour publication, veuillez fournir tous les détails disponibles.

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise : **Stéphanie Bilodeau**
à inclure cet article dans son mémoire de maîtrise sa thèse de doctorat
qui a pour titre *Improving resistance to hypoxia of microencapsulated islet with islet cells re-aggregates*

Susan K. Tam		14 Jul 2010
Coeauteur		Date
Geneviève Langlois		14-07-2010
Coeauteur	Date	
Jean-Pierre Hallé	Signature	2010/7/13
Coeauteur		Date
Coeauteur	Signature	Date

F.3 Autres contributions

- Pendant mes études de maîtrise, j'ai écrit un chapitre de livre avec Dr Hallé intitulé : **Particular Challenges in Microencapsulation of Insulin-Producing Cells for the Treatment of Diabetes Mellitus**. Il est en annexe du mémoire, à la section G.3. Le titre du livre est « Bioencapsulation of Living Cells for Diverse Medical Applications » édité par Bentham E-book, mon chapitre est soumis, mais le livre n'est pas terminé.
- Je suis co-auteure de trois articles de mes collègues du laboratoire :
 - Tam SK, **Bilodeau S**, Dusseault J, Langlois G, Hallé JP, Yahia LH, Biocompatibility and Physicochemical Characteristics of Alginate-Polycation Microcapsules, soumis à Acta biomaterialia, août 2010
 - Tam SK, Dusseault J, **Bilodeau S**, Langlois G, Hallé JP, Yahia LH, Factors influencing alginate gel biocompatibility, soumis à JBMR A, juillet 2010
 - Langlois G, Dusseault J, **Bilodeau S**, Tam SK, Magassouba D, Hallé JP., Direct effect of alginate purification on the survival of islets immobilized in alginate-based microcapsules. Acta Biomater. 2009 Nov;5(9):3433-40.

Pour ces contributions, j'ai révisé et critiqué les manuscrits, participé aux discussions concernant les résultats et les problématiques. Pour les deux premiers, j'ai aidé à faire quelques expériences *in vivo*.

F.4 Chapitre

**Particular Challenges in Microencapsulation of Insulin-Producing Cells for
the Treatment of Diabetes Mellitus**

Stéphanie Bilodeau

Université de Montréal / Centre de recherche de l'Hôpital Maisonneuve-
Rosemont,
Research Laboratory on Bio-artificial Therapies
5415 boul. L'Assomption, Montréal (Québec), Canada, H1T 2M4

Jean-Pierre Hallé

Université de Montréal / Centre de recherche de l'Hôpital Maisonneuve-
Rosemont/
Research Laboratory on Bio-artificial Therapies
5415 boul. L'Assomption, Montréal (Québec), Canada, H1T 2M4

Abstract. The ideal treatment for type 1 diabetes mellitus implies minute-to-minute modulations of insulin release according to the continuous variations of blood glucose. This can be accomplished by the transplantation of insulin-producing cells that are located in the pancreatic islets of Langerhans (islets). To avoid the use of potentially toxic immunosuppressive drugs, the cells may be entrapped within semi-permeable microcapsules. While several issues related to this task are similar to those found in other applications of cell microencapsulation, the present chapter emphasizes the challenges that are particular to the development of a bioartificial endocrine pancreas. In contrast to monocellular preparations used in other applications, islets are well organized cell cluster comprising 1500-2000 cells. However, the microcapsule membrane prevents transplanted islets to be re-vascularised. Therefore, oxygen supply depends upon diffusion only. Oxygen has to travel a relatively long distance to reach the cells located in the center of encapsulated islets. Central necrosis occurs, particularly in the largest islets. In contrast, dispersed single islet cells are very resistant to hypoxia but cannot function properly since they require cell-to-cell interactions. Thus, oxygen supply to encapsulated islet cells is crucial. Other issues that are particular to the bioartificial endocrine pancreas involve the number of islets to be transplanted, the rapid response of insulin release to variations of blood glucose levels, the limited supply of allogeneic islets from deceased donors and the implantation site. This chapter addresses all of these issues, as well as promising strategies that are being explored to overcome these hurdles.

1.0 **Diabetes mellitus.**

1.1 Definition, pathogenesis and principal types of diabetes mellitus

In the non diabetic individual, the blood glucose level is tightly regulated and maintained within a narrow normal range. A diagnosis of diabetes is made when the fasting blood glucose is ≥ 7.0 mM and/or the blood glucose two-hours after the ingestion of 75 g of glucose is ≥ 11.1 mM. The two principal types of diabetes

are type 1 (T1DM), known as insulin dependent or juvenile diabetes, and type 2 (T2DM) diabetes, formerly called non-insulin dependent or adult onset diabetes. T1DM is caused by the auto-immune destruction of the insulin producing β -cells, located in the islets of Langerhans of the pancreas. T2DM is caused by a combination of resistance to the action of insulin and a relative decrease of insulin secretion.

Currently, research on β -cell replacement aims at developing a treatment for T1DM. However, it cannot be excluded that similar approaches will eventually be used for T2DM, in combination with treatments that target other defects found in this complex disease. The use of allogeneic islets from deceased donors would provide enough islets for $\leq 1\%$ of potential T1DM recipients. As long as this is the only source of islets for human application, it is unlikely that the treatment will be extended to T2DM. Nevertheless, if other methods are developed, such as the production of efficient insulin-producing cells from stem/progenitor cells and an unlimited supply of cells thus becomes available, other indications, including T2DM, would probably be considered.

1.2 Long term complications are severe and related to poor blood glucose control

When the diabetes is poorly controlled, chronic hyperglycaemia leads to devastating complications, such as nephropathy, retinopathy, neuropathy, coronary artery disease, stroke, peripheral artery insufficiency and amputations. There is a correlation between poor metabolic control and the development of neurological, micro vascular and macro vascular complications of diabetes^{1,2}. Moreover, it has been shown that improving blood glucose control, using intensive insulin therapy, delays these complications^{3,4}.

1.3 Current treatment for type 1 diabetes: insulin therapy

The current treatment for T1DM is intensive insulin therapy. Patients measure their blood glucose levels by pricking their fingers, ideally at least four times a day. They use this information to adjust the doses of their insulin injections that are taken four times a day, i.e. fast acting insulin before each meal and long-

acting insulin that can be given at bedtime or in the morning. For the decisions regarding the insulin doses, they also take into account the amount of physical activity (recent and anticipated), the anticipated food intake (carbohydrate counting for adjusting the fast acting insulin doses), stress, menstrual cycle, seasons, intercurrent diseases, etc.

In the non diabetic individual, the amount of insulin that is produced by the β -cells and released into the bloodstream is continuously and precisely modulated depending upon the current blood glucose and the variations during the preceding minutes. This is the only way to achieve the complete normalization of the 24 hour blood glucose profile. Insulin therapy does not provide as precise and accurate blood glucose levels as the physiological regulation. The patient himself makes decisions regarding insulin doses depending upon the results of self monitoring of blood glucose (finger pricking), and blood glucose is not precisely regulated every minute.

1.4 Non encapsulated biological transplantation (whole pancreas transplantation and islet transplantation)

Currently, only two emerging treatments provide a physiological control of blood glucose levels: the transplantation of the whole pancreas and the transplantation of only the endocrine (hormone secreting) part of the pancreas, i.e. the islets of Langerhans (islets). To date, whole pancreas transplantation has been more successful than islet transplantation in maintaining long-term insulin independence. However, this treatment requires major surgery and strong immunosuppression protocols, thus is limited to severe cases or kidney and pancreas transplantation recipients⁵. Since insulin-producing cells represent only 1-2 % of the pancreas mass, $\approx 98\%$ of the pancreatic tissue that is transplanted is not required for β -cell replacement and is potentially immunogenic. In contrast, islet transplantation can be performed on an out-patient basis using non invasive techniques. Moreover, it raises the hope of reduced immunosuppression and potentially allows the development of methods to completely eliminate the use of immunosuppressive drugs. Whether whole pancreas or islet, these

transplantations allow the modulation of insulin release according to the blood glucose levels 1440 minutes a day, 365 days a year. This is a requirement for optimal diabetes control but for no other disease.

1.5 Encapsulated islet transplantation

In order to avoid the requirement for immunosuppression, cells to be transplanted may be physically protected from the recipient immune system using semipermeable membranes. Three geometric configurations have been experimented: intra-vascular devices, extra vascular macrocapsules and extra vascular microcapsules. The transplantation of microencapsulated islets has normalized the blood glucose, without immunosuppression, in different animal models of diabetes. In the 1980s and 1990s, a majority of the research on encapsulated cell transplantation has been conducted for application to the treatment of diabetes. This review is focused on the microencapsulation of islets for the treatment of insulin dependent diabetes.

2.0 Non encapsulated islet transplantation

2.1 Development of islet transplantation towards to clinical application

Islet transplantation is a promising treatment that allows minute-to-minute adjustment of insulin release and considerable improvement of blood glucose control. Continuous progress has been achieved over the last few decades by several research groups on different aspects of this therapeutic approach. In the 1970s, Ballinger and Lacy⁶ first succeeded to transplant isolated islets into diabetic rodents. To translate this method into large animal models and humans has been a difficult task. One of the first successful transplantations in humans was performed in 1990 in Pittsburg. This group reported the induction of insulin independence in 50% of recipients with non auto-immune diabetes, but the islet response to glucose was not optimal⁷. The success rate in patients with type 1 diabetes has remained low until 2000. According to the 2001 International Islet Transplant Registry⁸, from 1990 to 1999, only 11 % of recipients maintained insulin independence at one year post transplant. In 2000, the Edmonton group

reported that 7 successive patients with type 1 diabetes had achieved insulin independence following islet transplantation ⁹. The “Edmonton protocol” included several modifications of the standard procedure, such as a non-diabetogenic immunosuppression regimen, the use fresh islets, careful pancreas and recipient selection and an adequate number of islets (> 11,000 islet equivalents/kg recipient body weight). The Edmonton group has now succeeded to induce insulin independence in over 100 patients. A multicenter study, “the International Islet Transplantation Trial”¹⁰, has been conducted as an attempt to generalize the Edmonton method. Nevertheless, a limited number of centers were able to achieve similar results. Moreover, whereas initial studies showed better results when pancreas sampling, islet isolation and transplantation were performed at the same center, recent data support collaboration between centers that are located as much as 800 kilometers apart. These improved results could be achieved because of technical ameliorations of the preservation and transport of the total pancreas and isolated islets as well as standardization of pancreas procurement procedures. An international group, *the Swiss-French GRAGIL (Groupe de Recherche sur la Greffe d’Îlots de Langerhans) network*, is a collaboration of many European hospitals for the distribution of compatible isolated islets to be transplanted across Switzerland and France.

2.2 Benefits of clinical islet transplantation

The Edmonton group first reported the induction of insulin independence in 100% of seven consecutive recipients with type 1 diabetes. Nevertheless, insulin treatment has to be re-introduced in several patients, after a median time of 15 months ¹¹. Insulin independence is only one of several benefits for the recipients of islet transplantation. Other objectives are important as well. Even patients that have to resume certain form of insulin therapy (usually at lower doses than before transplantation), or could not initially withdraw insulin completely, have benefited from the procedure. The avoidance of needles is only a small part of patient’s relief. Increased flexibility and liberty regarding several aspects of daily life is considerably improved after transplantation. Most of transplanted patients

have been selected because of poorly controlled diabetes, frequent or severe hypoglycemia and/or hypoglycemia unawareness. Following transplantation, hemoglobin A1C and premeal blood glucose are normal or close to normal. Those who had hypoglycemia unawareness have recovered normal perception of hypoglycemia. Hopefully, with longer follow-up, larger patient cohorts and improved technology, these treatments may prove to prevent long-term diabetes complications. It must be emphasized that the benefits that are described above occur only in patients with a persisting graft function as demonstrated by C-peptide levels.

2.3 Limitations of non-encapsulated islet transplantation

Immunosuppression

The most important limitation of islet transplantation is the requirement for life-long immunosuppression. Such treatments decrease the immune defence against infections and cancers. Severe and opportunistic infections or cancers are relatively rare in patients undergoing the immunosuppression protocols that are used for islet transplant¹². Nonetheless, when they occur, they may be life threatening. Moreover, some immunosuppressors have direct toxicity on the kidney and liver, may deteriorate the lipid profile and induce hypertension^{12,13}. Thus, immunosuppressors may negatively counterbalance the positive effects of improved blood glucose control on renal and cardiovascular complications. For such risks to be acceptable, clear advantages of the approach over current treatments must be demonstrated. Furthermore, when islets are transplanted into the liver (the currently preferred implantation site), oral administration of these drugs may have a direct toxic effect on islets¹⁴ and contribute to the limited islet survival. This results from the fact that the intestinal veins drain into the portal circulation. Finally, the follow-up of immunosuppressed patients is labour intensive for the patient as well as the medical team.

Loss of β -cells mass

It has been shown that there is a massive β -cell loss in the early post-transplant period. Factors that are potentially involved include low oxygen supply, nutrient deprivation and unspecific inflammatory reactions^{15,16}. It has been estimated that 50% of the β -cell mass is lost within the 15 first days¹⁷. The possible immunological reasons for the graft failure are chronic allogeneic rejection, recurrence of autoimmunity and β -cell toxicity due to the immunosuppressive treatment¹⁸. Also, the inflammatory reaction affects the graft function and leads to early islet cell loss. Macrophages release cytokines that are involved in the dysfunction and death of islet cells, such as interleukin-1 β (IL-1 β), tumour necrosis factor- α (TNF- α) and interferon- γ (IFN- γ). Nitric oxide (NO), prostaglandins (PGs) and reactive oxygen species (ROS) are also secreted and are harmful for islets¹⁵. Indeed, macrophage depletion immediately before transplantation was shown to improve islet cell survival¹⁹. This loss of β -cells may lead to early graft failure.

Non-immunological factors also explain early graft failure. The islet isolation procedure is stressful. Islets are exposed to ischemia during isolation, which decreases the yield, quality and survival of islet cells²⁰. Also, the collagenase used for pancreas digestion destroys the extracellular matrix (ECM). The ECM is composed of proteins surrounding islets and is implicated in many cellular processes, such as proliferation, differentiation, migration, apoptosis, etc. The ECM destruction leads to central necrosis and apoptosis^{21 22-24}. Furthermore, the loss of tropic stimuli that are provided by exocrine pancreas elements increases the problematic²⁵. Another important problem is that blood vessels are disrupted from the rest of the vasculature.

The massive β -cells loss leads to two important consequences: the requirement for more than one donor and the high rate of recurrence of insulin dependence. Indeed, two to four donors or pancreases per recipient are required for achieving insulin independence⁹. A striking observation is the large mass of islets that is

required to induce insulin independence. The normal pancreas contains approximately one million islets. It has been shown that $\approx 90\%$ of the pancreas must be destroyed to induce diabetes in the absence of insulin resistance. Therefore, theoretically, slightly more than 100,000 islets should be enough to reverse diabetes. Approximately 800,000 islets per recipient have actually been required to achieve this objective (15,000 islet equivalents/kg of recipient body weight). Furthermore, following such transplantations, the blood glucose response to a meal challenge is considerably improved but the insulin response is only about 20% of that seen in normal individual, revealing very low reserves¹². Considering that the normal pancreas contains enough islets for treating several recipients, these observations reflect the loss of a large number of islets during the different steps of the procedure.

Another concern is the high rate of recurrence of insulin independence. Considering the limited β -cell reserve that was observed immediately after transplantation, this was not unexpected. However, it is somehow disappointing to see recurrence rates of 40% and 90% at one year and 5 years post-transplantation, respectively¹¹. This indicates a loss of islets after transplantation as well.

3.0 Microencapsulated islet transplantation; overview and progress

Microencapsulation is a promising solution to avoid the requirement for immunosuppression. Islets are entrapped within a semi-permeable membrane, which allows the diffusion of small molecules, such as insulin, glucose and oxygen but prevents the contact between the transplanted cells and the larger cells and antibodies of the immune system. The islet cells ensure a fine regulation of blood glucose while the microcapsules protect them from immune damage. Thus, the main advantage of microencapsulation is to eliminate the need for toxic immunosuppressive treatment. Furthermore, the membrane protection may permit the transplantation of non human donor islets (xenograft, stem/progenitor or

bioengineered cells), as a potential solution for the limited supply of cadaveric human islets.

The microencapsulation of islets in alginate-poly-L-lysine microcapsules was first described by Lim and Sun ²⁶ and it is still the most common microencapsulation method. In their first publication in 1980, they showed that implantation of microencapsulated islets could restore normoglycemia for 2-3 weeks in streptozotocin-induced diabetic rats, as compared to only 6 to 8 days with non encapsulated islets. The first implantations in a large animal model were achieved in 1992 and were successful for 7 to 24 weeks ²⁷. The first allotransplantations of encapsulated tissue in human was experimented with pancreatic islets and parathyroid cells in the 1990's ^{28,29}. The encapsulated islet experiment was performed using islets from 8 donors and what was described as a sub-immunosuppressive corticosteroid dose. Insulin-independence was not achieved, but a functional graft was demonstrated and glucose control was improved, using a reduced insulin dose. Parathyroid cell transplantation succeeded for at least 12 weeks, without immunosuppression. Recently, allotransplantation of encapsulated islets in humans was performed in Italy. Insulin-independence was not achieved, but blood glucose control was improved using approximately 1/3 of the previous insulin dose after transplantation of encapsulated islets from a single donor ³⁰.

3.1 Microencapsulation techniques

The most popular materials for encapsulating cells are alginate²⁸, agarose³¹, chitosan³², polyhydroxyethylmetacrylate-methyl methacrylate (HEMA-MMA)³³, copolymers of acrylonitrile (AN69) ³⁴ and polyethylene glycol (PEG)³⁵. Hydrogels are the most popular because they are relatively biocompatible. Their hydrophilic nature minimizes protein and cell adhesion. They are also soft and pliable, which reduces the mechanical and frictional irritation of surrounding tissues. The most studied hydrogel is alginate, because it jellifies under physiological conditions that do not interfere with cell function ³⁶. This natural polymer is extracted in industrial amounts from algae. It is also produced by

certain bacteria, such as *pseudomonas aeruginosa* and *azotobacter vinelandii*³⁷. Alginate is composed of linear blocks of oligomers of 1-4 linked β -D-mannuronic (M) and α -L-guluronic (G) acid. It is composed of GG, MG or MM blocks of various length and proportions, depending upon the species of algae and what part of the plant it is extracted from.

Several techniques are used to encapsulate cells, depending upon the polymer that is selected and the application it is developed for. In the case of alginate, the cells are suspended in soluble sodium alginate and then entrapped in microdroplets. The droplets are transformed in gel beads when the alginate carboxyl groups cross-link with divalent cations, most commonly calcium or barium. Different techniques are used to pull the tiny droplets out of a needle, including air jet or vibration. There is also the emulsion technique for droplet fabrication. The use of an electrostatic pulse generator allows the production of smaller microcapsules. The microcapsule size was decreased from 800 μm to 185 μm diameters using this technique³⁸⁻⁴⁰. Reducing the microcapsule size improves the ability of oxygen to diffuse up to the islet cells. A potential pitfall is that smaller microcapsules are associated with more bulging of islets out of the capsule surface, which may increase the immunogenicity of the transplant⁴¹.

It is also common to coat alginate beads with a polycation, which binds to negatively charged alginate molecules. The most commonly used polycations are poly-L-Lysine (PLL), poly-L-Ornithine (PLO), poly-D-Lysine and polymethylene-co-guanidine. This procedure has several advantages, such as increasing the mechanical stability of the microcapsule, allowing the control of the membrane porosity and preventing the beads from being dissolved by physiological chelator agents. However, soluble and non-complexed PLL has been shown to be an inflammatory molecule, which leads to fibrotic overgrowth when it is not properly bound to alginate^{42,43} and it may decrease encapsulated cell viability if use in too high concentrations. Therefore, some research groups have selected to use non PLL coated alginate beads. In this case, calcium is usually replaced by barium, as gelling divalent cations. Barium has a higher

affinity for alginate than calcium⁴⁴ and allows to make stronger beads without using PLL. Another approach is to develop techniques to improve the neutralisation of PLL reactive residues. More research is needed to optimize this aspect of the method. This includes the development of new polymers for the outer coating of alginate-polycation microcapsules.

4.0 Specific challenges of microencapsulated islet transplantation: oxygen supply to microencapsulated islets

Other chapters of this book address different issues related to the microencapsulation of all types of cells. The present chapter emphasizes the challenges that are specific to the bioartificial endocrine pancreas. Islets have a particular physiology leading to different challenges. In contrast to monocellular preparations used in other applications, islets are cell clusters. They have a high oxygen demand and they are physiologically well vascularized. Necrosis of cells that are located in the center of islets has been observed, affecting particularly the largest islets. This phenomenon has been explained by the longer distance that oxygen has to travel to reach these cells. This fact is thought to play an important role in early and late graft failure. Therefore, the most important particular challenge in islet encapsulation is the oxygenation of islet cells. A brief description of relevant anatomic and physiological features of the islets as well as the biological effects of hypoxia on cells will precede the discussion of the challenges of islet transplantation, non encapsulated and encapsulated.

4.1 *Islet physiology*

Multicellular structures

Pancreatic islets are spheroid structures that contain approximately 1500-2000 cells. They have a mean diameter of 150 μm , with a range varying between 50 and 500 μm ^{45,46}. The average human pancreas contains between 300 000 and 1 500 000 islets. The islet mass represents only 1-2% of the total pancreatic mass. The pancreas is composed of islets (hormone secreting cells), acinar cells (digestive enzyme secreting cells) and ducts (duct cells secrete mainly NaHCO_3

and some peptides, such as IGF-II and NGF²⁵). Islets are composed of endocrine (hormone releasing) cells and endothelial cells.

Islet endocrine cells: their respective roles and interactions

The islets of Langerhans contain at least 5 different types of endocrine cells, α , β , δ , PP and ϵ , which secrete respectively glucagon, insulin, somatostatin, polypeptide P and ghrelin. Human islets are composed of 60% β -cells, 30% α -cells, less than 10% δ -cells and less than 5% PP and ϵ cells⁴⁷. Whereas insulin is the major player for blood glucose regulation, each of these hormones has a specific role in the carbohydrate metabolism. When β -cells detect higher blood glucose, they secrete insulin into the bloodstream. Islets contain β -cells with different thresholds for triggering insulin secretion; thus as blood glucose increases, a larger number of β -cells release insulin, resulting in higher blood insulin levels. Insulin travels through the whole body, binds to insulin receptors in insulin responsive tissues and activates different intracellular signalling pathways. Insulin mechanisms of action include the production and translocation to the cell membrane of glucose transporters which facilitates glucose entry into the target cell. Glucagon is secreted when the blood glucose is low. It activates neoglucogenesis and glycogenolysis, increasing hepatic glucose production. Somatostatin is an inhibitory hormone; it suppresses the secretion of pancreatic and digestive hormones. The exact role of polypeptide P is unknown and ghrelin has a role in hunger. In rodents, islets have a specific architecture: β -cells are located in the center while the other types of cells are at the periphery (Fig. 1)⁴⁸. However, this organization is not the same in human islets, which have a random cell distribution^{47,49}.

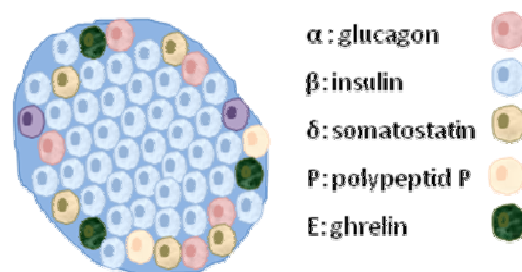


Fig 1. Islets of Langerhans are composed of 5 different cell types, α , β , δ , P, ϵ , secreting each a specific hormone, respectively glucagon, insulin, somatostatin, polypeptid P and ghrelin. In rodents, β -cells are located in the center while the other types of cells are at the periphery

Islet cell-to-cell contacts are essential for β -cell differentiation and function⁵⁰⁻⁵². Indeed, dispersed single islet cells have a poor insulin secretion and they do not respond to glucose^{52,53}. Islet cells interact via gap junctions composed of protein connexin-36⁵⁴ allowing cells to communicate and coordinate their response. Calcium-dependent adhesion molecules (CAM), such as E-cadherins (epithelial-cadherin) and NCAM (neural-CAM), are also responsible for cell-to-cell contacts and interactions^{55,56}. They regulate the aggregation of islet cells and maintain the primary islet architecture⁵⁵⁻⁵⁷. E-cadherins influence islet function and proliferation as well⁵⁸⁻⁶⁰.

Islet vascularisation in the native pancreas

Islets are highly vascularised structures^{49,61}. They receive 10-20% of the total blood flow through the pancreas, although they represent 1-2% of its mass⁶²⁻⁶⁴. This assures islets to meet their high metabolic demand. Islet vasculature is a highly specialised glomerular-like structure. Small arterioles enter into the core of the islets and a network of capillaries drains into venules to carry the blood to the periphery. Capillary endothelia are highly fenestrated⁶⁵, which accelerates the hormone entry into the bloodstream. It is estimated that approximately 20% of insulin is delivered through this pathway, ensuring rapid insulin response to glucose increase. There are about 1500 capillaries/cm² in islets. This rich vascular density ensures that each β -cell is in close proximity to endothelial cells.

4.2 Biological effects of hypoxia

Role of oxygen in cell metabolism and effect of hypoxia

Oxygen is essential for several cell processes, especially for the production of adenosine triphosphate (ATP) by cellular respiration. In aerobic metabolism, glucose is transformed into acetyl groups by a series of oxidation-reduction

reactions into the acid citric cycle. Those reactions produce 8 high-energy electrons that travel to the mitochondria electron transport chain for the oxidative phosphorylation. Electrons are used to reduce O_2 into H_2O which generates the proton gradient that is required for ATP synthesis. Moderate hypoxia switches the cell metabolism from aerobic respiration to anaerobic glycolysis. In this case, glycolysis is the process that is used by cells to generate energy. In those reactions, one molecule of glucose is metabolized into two molecules of pyruvate with the production of 2 ATP molecules. Pyruvate is then fermented into lactate to produce energy. However, only a small fraction of energy available from complete glucose combustion is produced by this pathway ⁶⁶. Since ATP is required for many essential cellular functions, moderate oxygen deprivation may have deleterious consequences. In islets, ATP is required, amongst other things, for glucose responsive insulin secretion.

Severe or prolonged hypoxia induces apoptosis

The cell response to hypoxia depends upon the oxygen level. An acute or mild hypoxia leads to cell adaptation and survival response. If hypoxia persists or if it is more severe, the cells enter in apoptosis. Apoptosis or “programmed cell death” prevents propagation of deleterious effects of overgrowth, mutations, infections or cell damages. The caspase protein family has a major role in apoptosis. They are cysteine proteases activated by pro-apoptotic stimuli. Some caspases (such as -8 and -10) are initiator caspases; they cleave the effector caspases (such as -3, -10), which in turn degrade intracellular protein substrates. This induces the classical apoptosis morphological changes, such as chromatin condensation, nuclear degeneration and cellular dehydration ⁶⁷.

There are two major apoptotic pathways, one activated by extracellular events (extrinsic pathway) and one activated by intracellular events (intrinsic pathway). The first one may be mediated by inflammatory cytokines or triggered by direct cytotoxic lymphocytes-T engagement. It activates caspase pathways ^{67,68}. The intrinsic pathway is induced by DNA damage, hypoxia, nutrient deprivation, ROS, etc. They activate the Bcl-2 mitochondrial pathway. There are two classes

of Bcl-2 protein: pro-apoptotic (as Bim, Bid, Bax...) and anti-apoptotic Bcl-2 proteins (as Bcl-2 and Bcl-xl). There is an important balance between the two types of signals. Apoptosis is triggered when pro-apoptotic protein concentrations are higher than the anti-apoptotic ones. When cells receive a pro-apoptotic signal, pro-apoptotic Bcl-2 proteins are activated and translocated into the mitochondria. They bind and inactivate anti-apoptotic proteins. They form a pore in the mitochondrial membrane inducing the release of cytochrome c into the cytosol, which complexes with pro-caspase-9 and Apaf-1 to form the apoptosome activating caspase-3⁶⁹.

General cell response to hypoxia

When cells are deprived of oxygen, they induce the transcription of genes that regulate their adaptation to low oxygen concentrations. This induction is mainly due to the activation of the hypoxia inducible factor-1 (HIF-1), a transcription factor. HIF-1 regulates cell survival under hypoxic conditions. It is a heterodimeric basic helix-loop-helix transcription factor composed of HIF-1 α and HIF-1 β , an aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT)⁷⁰. The latter is constitutively expressed, whereas HIF-1 α is activated in hypoxic conditions. In normoxic conditions, two HIF-1 α proline residues are hydroxylated by a family of iron(II)-dependent prolyl-hydroxylase. It binds to von Hippel Lindau protein (vHL), it is polyubiquitinated and degraded by the proteasome^{71,72}. When cells detect a low oxygen concentration, it inhibits the prolyl-hydroxylase, HIF-1 α is stabilized, translocated to the nucleus, it dimerizes with HIF-1 β and HIF-1 is activated. It binds to genes that contain hypoxia response elements (HREs) in their transcriptional promoters and it leads to the induction of genes implicated in the adaptation to hypoxia, modulation of angiogenesis, oxygen transport, iron metabolism, glycolysis, glucose uptake, growth factor signalling, apoptosis and metastasis (Fig 2.)⁷³. For example, some of those genes can promote cell survival by increasing oxygen delivery to hypoxic tissues (erythropoietin), inducing revascularization (VEGF) or increasing glucose transport (Glut-1) and glycolytic enzymes (lactate deshydrogenase A).

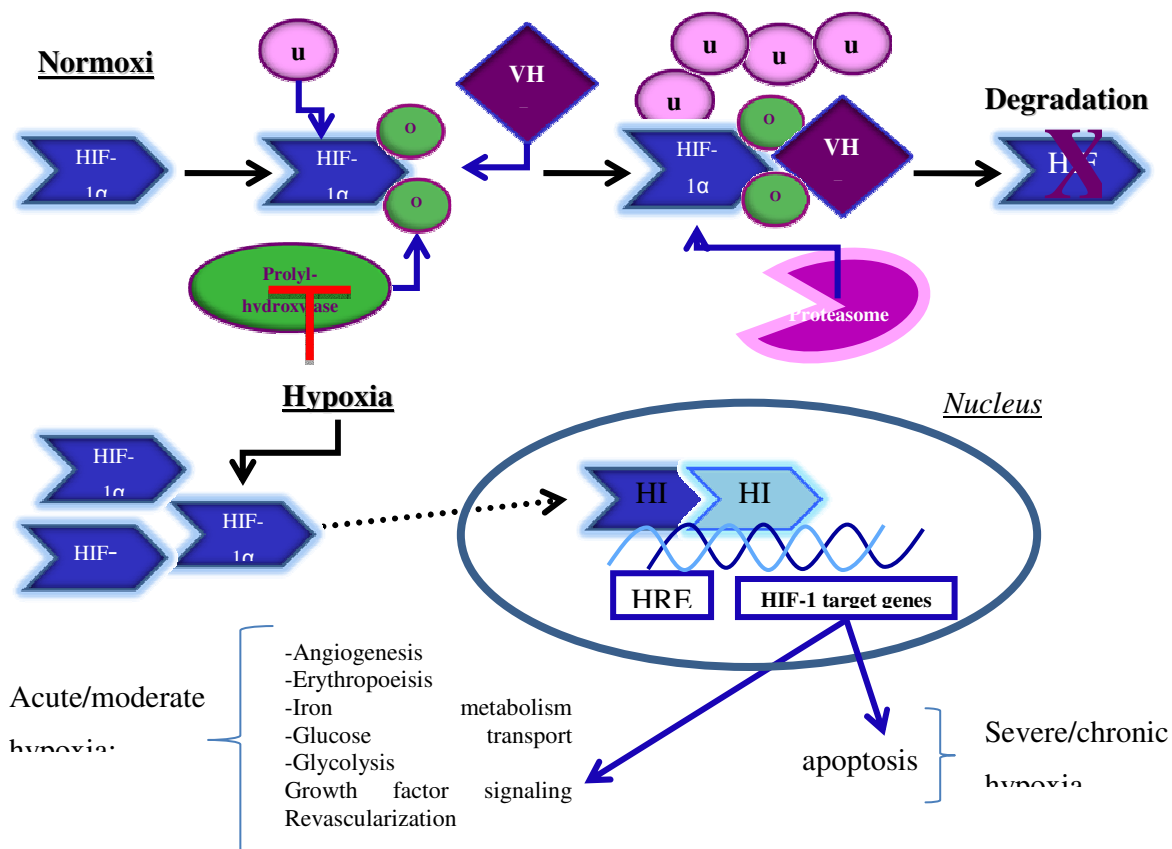


Fig 2. Hypoxia activation of HIF-1. In normal oxygen concentration, HIF-1 α is hydroxylated by a prolyl-hydroxylase, Von Hippel Lindau protein binds it; then it is ubiquitinated and degraded by the proteasome. In hypoxia, the prolyl-hydroxylase is inhibited, HIF-1 α goes into the nucleus and binds to HIF-1 β to form the active transcription factor. It binds the Hypoxia Response Element and activates transcription of target genes that are implicated in angiogenesis, erythropoiesis or apoptosis...

There are three isoforms of HIF: HIF-1 α , HIF-2 α /endothelial PAS domain protein (EPAS) and HIF-3 α . Despite similar structures, they have different activation mechanisms, tissue distribution and target genes⁷⁴. HIF-1 α is more sensitive to O₂ concentration variations, while HIF-2 α mediates a survival response to O₂-independent variations, such as growth factors, cytokines and hypoglycaemia⁷⁵. HIF-3 α may be a modulator of hypoxic gene induction⁷⁶.

HIF-1 α is expressed as a protective hypoxia factor. Under moderate hypoxia, HIF-1 α induces anti-apoptotic pathways, such as IAP-2,⁷⁷. However, if hypoxia

persists or if it is severe, the protective response fails and the cells enter into hypoxia-mediated apoptosis. HIF-1 induces apoptosis via BNIP3, a Bcl-2 family protein. The BNIP3 gene promoter has a functional HRE ⁷⁸. Indeed, HIF-1 α knocked-out cells do not undergo hypoxia-mediated apoptosis ⁷⁹. HIF-1 has an important role in hypoxia response and in the balance between cell survival and cell death during hypoxia.

Islet cell response to hypoxia

As mentioned earlier, hypoxia has a negative effect on cellular functions that require high cellular ATP concentrations. In islets, insulin secretion is ATP-dependent. Indeed, moderate hypoxia leads to a 50% decrease in glucose stimulated insulin secretion⁸⁰. However, basal secretion is less affected, because this process requires lower amounts of ATP ⁸¹. HIF-1 α was shown to be strongly expressed in non encapsulated transplanted islets during the 14 days following their transplantation. It was correlated with a decrease in insulin secretion and an increase of β -cell death. HIF-1 α expression decreases as revascularization progresses ⁸². Severe hypoxia has also been shown to lead to β -cell death, due to necrosis and apoptosis ^{82,83}. After only six hours in hypoxia, islets may show nuclear pyknosis and caspase-3 expression due to activation of HIF- α 1 and BNIP3 ⁸⁴.

Another mediator of hypoxic injuries is AMP-activated protein kinase (AMPK). It was shown to be activated by hypoxia in non encapsulated islets. It activates caspase-3 and it generates reactive oxygen species (ROS), ⁸⁵ which damage cellular proteins, membrane lipids and nucleic acids. Hypoxia also induces biochemical reactions that lead to ROS production and cause cell death. Antioxidant treatments have been applied to isolated islets and were shown to increase islet cell viability and function ⁸⁶.

In encapsulated islets, hypoxia was also associated with a loss of islet function and viability. Furthermore, some harmful proteins have been shown to be expressed in islets in the presence of low O₂ concentration, such as inducible nitric oxide synthase (iNOS) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)

^{81,87}. iNOS expression might be induced by HIF-1 and is responsible for nitric oxide (NO) production. NO is a short-lived free radical that causes cell damages and death by inducing DNA strand breaks ⁸⁸. Furthermore, in pancreatic β -cells, NO can inhibit insulin secretion ⁸⁹. MCP-1 attracts cytokine-producing macrophages, monocytes, memory T lymphocytes and natural killer cells ⁹⁰. All of these cells are involved in the immune reaction against microcapsules and might be toxic for islets (Fig 3.).

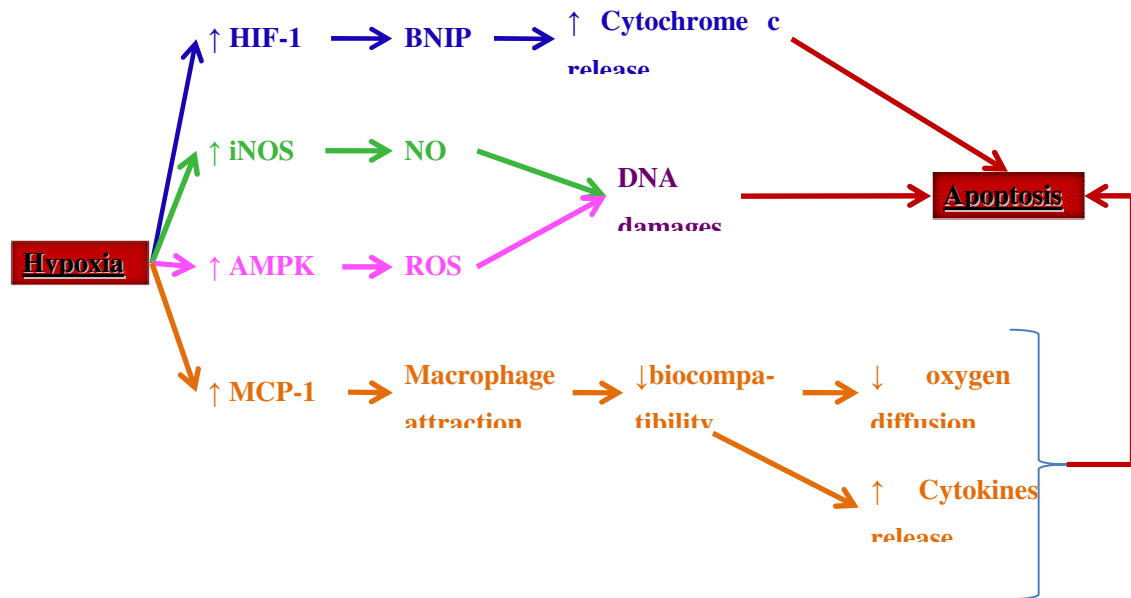


Fig 3. Hypoxia leads to apoptosis via different pathways

4.3 Oxygenation challenges in non encapsulated islet transplantation

Transplantation site

One important factor in non encapsulated islet oxygenation is the transplantation site and its oxygen partial pressure (pO_2). Firstly, oxygen is transported into the blood by red blood cell haemoglobin in concentrations varying between 100 mmHg and 40 mmHg. Haemoglobin binds oxygen and ejects carbon dioxide in the lungs by diffusion. The blood is distributed throughout different organs and haemoglobin exchanges oxygen for tissue carbon dioxide. The haemoglobin-

oxygen dissociation curve is such that the affinity of haemoglobin for oxygen is high at the pH found in the lung and low in periphery.

Oxygen tension varies within and between organs in function of their vascularisation and oxygen consumption rates. Within native pancreatic islets, because they are well vascularised, the mean pO_2 is around 40 mmHg. In the kidney cortex, the spleen and the liver, the most common transplantation sites for non encapsulated islets, oxygen tension is near 15 mmHg, 30 mmHg and 5mmHg, respectively ⁹¹. When transplanted into the kidney cortex, the liver and the spleen, islet oxygen concentration is similar, between 5-10mmHg O_2 (1% O_2), although the three organs have different pO_2 tensions ⁹¹. The oxygen tension that is measured in transplanted islets is only a fraction of the tension found in native islets ⁹¹⁻⁹⁴.

Revascularization of transplanted islets

During islet isolation, islet blood vessels are disrupted from the rest of the vasculature. When non encapsulated islets are transplanted, revascularization and connexion to the host vasculature occur within 7 to 14 days after transplantation ^{95 96,97}. An important proportion of transplanted islets die during this period and it correlates with the low oxygen supply ¹⁷. Moreover, the decreased oxygen tension is still present after the revascularization for up to 9 months post-transplantation and the vascular density of non encapsulated islets remains diminished on long term ^{93,94,98} showing inadequate revascularization and its prolonged effect.

4.4 Oxygen supply challenges to microencapsulated islets

The problem of revascularization is even more important for encapsulated islets, because the microcapsule membrane prevents the blood vessels from reconnecting to the host vasculature. In this case, the oxygenation depends upon diffusion only. The pO_2 values are 20% lower than in non encapsulated tissues ⁹⁹. Moreover, the oxygen depleted-zone is twice larger in microencapsulated than free islets ⁹⁹. This is explained by the assumption that within microcapsules there is no convection movement. This creates an oxygen and nutrient gradient from the capsule surface to the center of the islet. The pO_2 in the middle of

microencapsulated islets is 50% lower than in non encapsulated islets¹⁰⁰. This is one of the major barriers to the success of microencapsulated islet transplantation¹⁰¹

Transplanted microencapsulated islets often show central necrosis, which affects particularly the largest islets. This observation suggests that oxygen does not reach the cells located in the center of these islets. In order to oxygenate encapsulated islets, oxygen diffuses from blood vessel to target cells. It has first to travel from the blood vessel to the microcapsule surface, then through the microcapsule and within the islet, in order to reach every cell, including those located in the center of islets. In most mammalian tissues, the diffusion distance between blood capillaries and each cell is limited to 150-200 μm ^{102,103}.

The implantation site

The implantation site is the most important factor determining the local O_2 concentration and the distance between blood vessels and the capsule surface. The peritoneum is the most common implantation site for microencapsulated islets merely because it allows enough space for a large transplant. However, it is not well vascularised. In the peritoneal cavity, the pO_2 varies between 26 and 70 mm Hg¹⁰⁴. Moreover, microcapsules are in continuous motion, which induces a varying distance between the transplant and the blood vessels. In that situation, depending upon their exact location, the pO_2 may fall close to 0%¹⁰⁵.

Oxygen diffusion

Other limitations to oxygen transport include those related to oxygen diffusion within microcapsules and islets. The microcapsule size is an important parameter for this issue. Standard microcapsules have an average diameter of 800 μm . Using the electrostatic pulse system, we are routinely producing microcapsules of an average size of 300-350 μm diameter¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. Even with this system, to reach cells located in the islet center, oxygen has to travel 175 μm plus the distance between the blood vessel and the capsule. The oxygenation is still limited.

Smaller capsules would be useful from an oxygenation perspective but they risk increasing the protrusion of islets out of the capsule surface.

Size of islets

Another important parameter is the size of islets. The average islet diameter is 150 μm with a range of 50 to 400 μm (ref). Smaller islets have been shown to provide more insulin and experience better survival both in normoxic and hypoxic culture and have been more predictive of clinical islet transplantation efficiency^{109,110}. It has also been predicted that as much as 25% of the volume of a 200 μm diameter islet is below the critical oxygen threshold, i.e. the point at which cells die from necrosis if maintained for a sufficient time. This is compared to 5% and 0% for islets of 150 and 100 μm diameter, respectively¹¹¹. Furthermore, there are gradients of oxygen partial pressure within isolated islets, with a difference of 40 mmHg between the surface and the center of the islet. This gradient increases as islet diameter is larger⁹⁹. Other factors include the cell density of the implant and its geometrical characteristics¹⁰¹. A huge amount of cells in a small volume decreases the ability of oxygen to diffuse freely. The surface/volume ratio has to be high to allow access of oxygen to more cells.

Biocompatibility

Microcapsule immunogenicity is also an important factor because an immune response to the implant is almost always associated with graft failure^{100,112}. For example, when islets were encapsulated using non purified alginate, a non-specific foreign body reaction has occurred against microcapsules. This pericapsular cell overgrowth is initially composed principally of activated macrophages, followed by fibroblasts and extracellular matrix deposition. The inflammatory cells that adhere to the capsule surface secrete small cytokines, chemokines and free radicals, which may cross the capsule membrane and damage encapsulated cells. Moreover, pericapsular fibrosis impairs the diffusion of oxygen and nutrients. These phenomena may lead to graft failure. This pericapsular reaction has been attributed in part to alginate contaminants, such as polyphenols, endotoxins and proteins^{113,114}. Alginate purification has been shown

to considerably decrease the microcapsule immunogenicity^{106,115-120}. By optimizing alginate purity and composition, alginate beads have been produced that induce less than 10% overgrowth at 12 months post peritoneal implantation¹¹⁵. Nonetheless, the lack of standardization of biomaterials and purification methods and wide variations of duration of encapsulated cell survival remains a problem (Fig 4.).

There are three different immune responses against microencapsulated islets. A non-specific response due to the surgical procedure¹²¹, the foreign body reaction against the capsule and the response provoked by the encapsulated cells, which release cytokines. Even in the absence of pericapsular overgrowth, a graft failure may occur after an average of 6 to 20 weeks post-transplantation¹¹⁵. It has been shown that when islets are exposed to interleukin-1 β (IL-1 β) and tumour necrosis factor- α (TNF- α), which are released by macrophages, they secrete cytokines, such as monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein (MIP), nitric oxide (NO) and interleukine-6 (IL-6). These cytokines attract and activate more inflammatory cells and this process results in a vicious cycle^{122,123}. Although the microcapsule membrane blocks the access of antibodies and immune cells to the islets, smaller molecules can penetrate into the capsule and damage the islets^{124,125}.

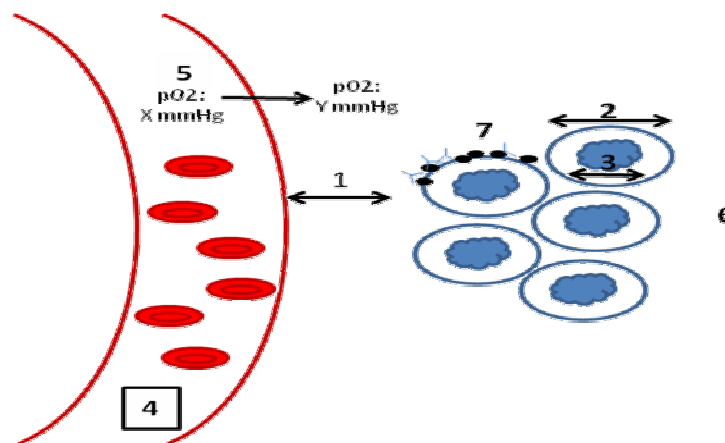


Fig 4. Several factors influencing microencapsulated islet oxygenation are illustrated in this figure: 1) Distance blood vessel-microcapsule 2) Microcapsule size 3) Islet size 4) Implantation site vascularization 5) Implantation site PO₂ 6) Implant characteristics (density, volume, geometry) 7) Microcapsule biocompatibility

4.5 Strategies for improving oxygen supply to encapsulated islet cells

Several research groups are currently investigating different approaches to improve the oxygenation of encapsulated islets. An important consequence of improved oxygen delivery to islet cells is to increase the efficiency of transplanted islets, thereby reducing the number of islets that has to be transplanted, thus the total implant volume. This section reviews the main solutions to the challenges that are presented above.

Transplantation site

Firstly, the transplantation site is the main determinant of the local pO_2 concentration and the distance between blood vessels and the microcapsule surface. The development of methods to produce smaller microcapsules may allow the experimentation of alternative sites to the peritoneum. Bioartificial sites offer an interesting alternative. For example, a prevascularised expanded polytetrafluoroethylene solid support can form a hypervascularized, removable bio-artificial implantation site that could allow microencapsulated islets to be in close proximity of blood vessels¹²⁶. Microcapsules can also be enveloped within a vascular prosthesis that is directly anastomosed to blood vessels¹²⁷. This method provides excellent proximity to blood vessels. However, it is limited by the fact that it is a relatively small compartment and the risk of thrombosis. This approach has thus been abandoned by most research groups. Another method is based on the use of a natural photosynthetic oxygen generator, as a thermophilic strain of the unicellular alga *Chlorella*. It increases islet function when islets are encapsulated in this material¹²⁸.

Decreasing limitations to oxygen diffusion within microcapsules and islets

Another strategy to improve the oxygenation of encapsulated islets is to decrease the limitations to oxygen diffusion within microcapsules. A few methods have been experimented to achieve such goals. We strongly believe that smaller microcapsules allow better oxygen delivery to the cells that are located in the center of islets. As well, some researchers have incorporated oxygen transporters

into the polymer that is used to make the microcapsule core (i.e. alginate). It is possible to incorporate perfluorocarbons (PFC), an oxygen transporter, into the microcapsule matrix to enhance transplanted islet oxygenation^{129,130}. Besides improving oxygen diffusion by altering the capsule design, it is important to enhance diffusion within the islets

Improving islet cell resistance to hypoxia

An alternative strategy is to improve islet cell resistance to hypoxia. Many groups are studying different techniques to improve islet oxygenation and some of the more recent are presented below. Genes or proteins can be transfected or transduced to improve the islet oxygenation. Neuroglobin, myoglobin and cytoglobin, three proteins involved in oxygen transport, were shown to have a protective effect on islets to assure a better quality of transplanted islets¹³¹⁻¹³³. Co-expression of anti-oxidant enzymes, such as copper/zinc superoxide dismutase (SOD), extracellular SOD, and cellular glutathione peroxidase (Gpx-1), were shown to improve the graft outcome because they reduce the free radical levels¹³⁴.

The type of islet is important for the outcome of the transplantation. For example, rat and porcine neonatal islets were shown to be more resistant to hypoxia^{135,136}. Teleost fish islets (e.g. tilapia) can survive and function properly in a low oxygen environment, since these fish live in waters that contain little oxygen. Transgenic tilapia, which secrete human insulin, have been developed¹³⁷. They could be used for transplantation, taking advantage of their high resistance to hypoxia. However, their large size (up to 5 mm diameter)¹³⁸ is a problem for microencapsulation. Nevertheless, lessons could be learned by studying the mechanisms that tilapia islets use to function with low oxygen supply. Based on these findings, gene therapy could be used to modify islets.

In combination with increasing oxygen diffusion, reduction of apoptosis would be helpful for successful islet transplantation. X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) is a potent endogenous inhibitor of apoptosis. When transduced into islet, it was shown to decrease apoptosis^{139,140}. Also, Hypoglycemia/hypoxia Inducible

Mitochondrial Protein (HIMP1) can have a protective effect by reducing apoptosis¹⁴¹. Another molecule that can be used for the same purpose is endothelin, which is a potent vasoconstrictor, but also a potent mitogenic/anti-apoptotic factor. It could decrease apoptosis and improve the success of islet transplantation. However, more studies are needed to improve the knowledge of this molecule¹⁴².

5.0 Other challenges in the treatment of type 1 diabetes by microencapsulation of insulin-producing cells

As seen in the previous sections, to get adequate oxygen and nutrient supply is more challenging in microencapsulated islet transplantation than for other applications of microencapsulation. This section presents the other issues that must be considered for the treatment of diabetes.

5.1 Rapid response of insulin release to variations of blood glucose levels.

Islet cells must precisely sense blood glucose variations. Diffusion is thus necessary in both directions across the membrane. Several characteristics of the pancreas contribute to tight blood glucose control. It is unlikely that a bio-artificial organ will ever perfectly match all of the physiological processes. A perfect functioning is not necessarily requested to obtain improvements over current treatment and to impact on the development of long-term complications of diabetes. Nevertheless, good understanding of physiological processes may be useful for the design of organ replacement strategies.

Following a meal, there is a rapid increment in the blood glucose level. In order to obtain an appropriate post prandial blood glucose excursion, a rapid stimulation of the insulin secreting cells takes place, which is followed by rapid insulin secretion and delivery into the bloodstream. As islets are highly vascularised, β -cells immediately sense this increase; and, at given blood glucose levels, they release insulin that has been stored in secretion vesicles (so-called first phase insulin secretion) and at the same time, they begin to synthesize and secrete new insulin. Then, the action of insulin induces the exit of glucose from the blood compartment, and the process goes the other way around: as blood

glucose level goes down, an increasing number of β -cells “switch off” and the blood insulin level decreases. This turnaround must occur rapidly to avoid hypoglycaemia. Other islet hormones may contribute for fine-tuning these adjustments. Special features of the islet vasculature facilitate such rapid response, including the high vascular density within islets, the fact that β -cells are always close to capillaries and the fenestration of the islet endothelium. Since encapsulated islets are not re-vascularized, the role of the endothelium has limited importance in this case. Another feature that is absent in the encapsulated islet is the sympathetic and parasympathic innervations that modulate islet hormone production, including the cephalic phase of insulin secretion. The clinical impact of these differences between the native and bio-artificial pancreases is unknown but has to be assessed.

5.2 Microencapsulation could allow the use of xenografts, bio-engineered or stem/progenitor cells

One major challenge of islet transplantation research is the limited supply of islets from deceased donors. This limitation is aggravated by the fact that 2 to 4 donors per recipient are currently required to induce insulin independence and by the rate of recurrence of insulin independence ¹¹. New sources of insulin-producing cells must be explored to allow the bioartificial pancreas to become generally used. However, those possibilities require various sources of cells, such as animal origin tissue, bio-engineered cells or stem cells.

Xenografts

Cell xenotransplantation has revealed to be much more difficult than allotransplantation. Microencapsulated xenografts have already been conducted using neonatal pig islets or pig to primate model. However, there still are concerns related to the transplantation of animal cells into humans. On theoretical grounds, some authors have questioned the protection provided by microcapsules against xenogeneic immune reactions. This view was based on the fact that xeno-antigens are presented to the T-cell receptor by the recipient antigen-presenting cells (APCs) because the donor foreign MHC complex is not recognised, whereas

allo-antigens are presented by the donor APCs. While it is obvious that the donor APCs cannot go out from the microcapsules, it was hypothesized that shedding antigens could break down to a size that allows diffusion through the microcapsule membrane, thereby triggering an immune reaction. In our perspective, this is unlikely to occur. Such shedding antigens would have to form apoptotic or necrotic vesicles (which would not cross the membrane), and travel to the draining lymph node, wherein antigen presentation takes place, without being degraded. Considering that such antigens have to be smaller than the membrane molecular weight cut-off and that only a minority of minor histocompatibility complex antigens has the capacity to elicit an immune reaction, the probability that this phenomenon creates any serious problem is low. Another concern with xenotransplantation is the possibility of zoonosis, i.e. transmission of a virus from animals to humans, which is rare but possible.

Bio-engineered cells

Another approach for β -cell replacement is the development of completely bio-engineered cells. The initial concept was relatively simple but the endeavour revealed to be complex. The first experiments included the transfer of the pro-insulin gene in a manner that its expression was under the control of blood glucose into cells that possessed the convertases to transform pro-insulin into insulin¹⁴³⁻¹⁴⁸. It was realized that the delay between pro-insulin synthesis and insulin release is too long for an adequate response to metabolic need. The amount of insulin that is produced has to be sufficient and the selected cells must have potential for expansion. There is now a much better understanding of the challenges that have to be met for such an endeavour and much progress has been done in resolving some issues.

Generation of neo-islets from stem/progenitor cells

Finally, other methods for β -cell replacement include the development of neo-islets from stem/progenitor cells. The strategy is to understand the mechanisms of islet cell formation from non endocrine cells during embryogenesis, or experimental, pathological or physiological regeneration of the pancreas, and to

use this information to induce islet cell formation from non endocrine cells. This approach comprises three requirements: 1) the possibility of considerably expanding the number of cells, 2) the trans-differentiation into insulin-producing cells and 3) the insulin secretion must be glucose responsive.

No matter which method is used for β -replacement, the transplanted cells have to be protected from the immune reaction. Even if a method is eventually developed for autologous cell transplantation, such cells will have to be protected from the auto-immune reaction of type 1 diabetes.

5.3 Implantation sites

The role of the implantation site in oxygen supply to islets has been addressed in section 4.4. As mentioned earlier, most experiments on microencapsulated islets have used the peritoneum as the implantation site. In addition to low oxygen concentration, there are several theoretical reasons that make this site inappropriate. These include the high concentration of macrophages ($\approx 85\%$ of peritoneal cells), the continuous motion, which imposes high mechanical stress on microcapsules, delayed insulin to glucose response and blunted post prandial stimulatory effect on insulin secretion since glucose is diluted in a larger compartment (intravascular + interstitial). Nevertheless, there has been little experimental data to support this view, because only the peritoneum could accommodate enough encapsulated islets to normalize the blood glucose of diabetic animals. Recently, Dufrane et al have used a simple strategy to compare the peritoneum, the kidney capsule and the subcutaneous space as implantation sites¹⁰⁵. They confirmed that the peritoneum was worse than the two other sites for islet cell survival and maintenance of the capsule integrity. Thus, other implantation sites must be experimented for encapsulated islets, including the development of a bioartificial, hyper vascularised, removable, implantation site.

6.0 Future of encapsulated islet transplantation; clinical trials and beyond.

The microencapsulation of islets to allow their transplantation without immunosuppression has been experimented for 30 years. The fact that clinical

application is lagging behind initial expectations is disappointing and has led to pessimistic views regarding the potential of this approach. In biomedical research, such a 30 years delay between the first experimentation of a new concept and clinical application is the rule rather than the exception. In the case of microencapsulation, the simplicity of the concept, great potential for application, overoptimistic views and unrealistic promises by some biotech have led scientists to underestimate the complexity of the endeavour. Pressure is exerted on researchers to accelerate the initiation of clinical trials. Others suggest that it is time for proof of concept trials in primate models. Nevertheless, we believe that experimenting in the primate model is not necessarily the best strategy at this moment (except for research in xenotransplantation). Several issues must be resolved before useful clinical trials begin. A small number of these issues require a large animal model. Nonetheless, for many research questions, using a large animal model would be thousand fold more expensive without any advantages over rodent experiments. For clinical application, the first step is to confirm the safety of microcapsules in humans, using allotransplantation. The use of primate is required only to explore xenotransplantation, which is away down the road.

What are the requirements before clinical transplantation is considered? First, biocompatibility issues have to be resolved. The immunogenicity of biomaterials, empty microcapsules and islet-containing microcapsules must be improved. Most importantly, there is a need for the standardization of biomaterials, purification procedures, in vitro and in vivo assays to assess biomaterials as well as the final product immunogenicity and bioperformance. More research should be conducted in order to improve our understanding of the microcapsule physicochemical structure at the micrometric and nanometric scale, as well as the mechanisms of the immune reaction against microcapsules. The mechanisms of the protection provided by microcapsules against the hostile environment of the recipient must also be investigated.

The proposed methods should be shown to work in animal models using a number of islet equivalents (per weight of recipient) that is applicable in humans. Efficient up-scaling methods should be developed. Several techniques that are

performed manually for rodents would be too cumbersome to be done the same way for large animals or humans. Long preparation periods would result in extremely high cost and in low bioperformance of the transplant, particularly because of decreased cell viability. In the past, the clinical application of (free) islet transplantation has been possible because Ricordi and colleagues have developed a method for the automated digestion and isolation of islets¹⁴⁹. Similarly, automated methods should be developed and validated for the fabrication and processing of microcapsules. This includes large-scale production of alginate beads and automated methods for coating alginate beads by polycation if required. For rodents, empty or inadequate microcapsules may be discarded by handpicking, a method that must be automated for large scale production. The capacity to produce islet/cell-containing microcapsules in a GMP (good manufacturing practice) environment is another requirement that is reinforced by regulatory agency rules. When the transplantation is performed in centers that are remote from the islet isolation and microencapsulation laboratories, proper methods for transplant storage and transport must be developed. Such development includes adequate demonstration of islet survival within microcapsules in a frozen state. Finally, the optimal transplantation site should be determined.

When clinical microencapsulated islet transplantation will be successful, several areas of research will continue to be relevant for the continuous progress of the technology. An important issue that will remain active is the development of methods to promote long-term islet survival and to allow replacement of the initial transplant when it becomes exhausted. For example, an eventual bioartificial, hypervascularized, removable implantation site could be replenishable or replaceable. Another permanent challenge is the continuous search for alternative source of insulin-producing cells (other than allo-islets from deceased donors). This includes islets from animal origin (xenotransplantation), completely bio-engineered insulin producing cells or insulin-producing cells derived from stem/progenitor cells. Finally, clinical trials will compare the impact on the development of late diabetes complications of different treatment

strategies. Such early interventions have been shown to have more impact on the prevention of complications³.

Acknowledgements.

We thank Susan K. Tam for revising the manuscript. SB has received student scholarships from Diabète Québec and Université de Montréal.

References

1. Molitch ME, Steffes MW, Cleary PA, Nathan DM. Baseline analysis of renal function in the Diabetes Control and Complications Trial. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group [corrected]. *Kidney Int* 1993; **43**: 668-674.
2. Dahl-Jorgensen K, Bjoro T, Kierulf P, Sandvik L, Bangstad HJ, Hanssen KF. Long-term glycemic control and kidney function in insulin-dependent diabetes mellitus. *Kidney Int* 1992; **41**: 920-923.
3. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N Engl J Med* 1993; **329**: 977-986.
4. Nathan DM, Cleary PA, Backlund JY, Genuth SM, Lachin JM, Orchard TJ *et al.* Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *N Engl J Med* 2005; **353**: 2643-2653.
5. Vardanyan M, Parkin E, Gruessner C, Rodriguez Rilo HL. Pancreas vs. islet transplantation: a call on the future. *Curr Opin Organ Transplant* 2009; **15**: 124-130.
6. Ballinger WF, Lacy PE. Transplantation of intact pancreatic islets in rats. *Surgery* 1972; **72**: 175-186.
7. Tzakis AG, Ricordi C, Alejandro R, Zeng Y, Fung JJ, Todo S *et al.* Pancreatic islet transplantation after upper abdominal exenteration and liver replacement. *Lancet* 1990; **336**: 402-405.
8. Brendel M HB, Schulz A, Bretzel R. International Islet Transplant Registry Report, 2001.
9. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL *et al.* Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a

- glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000; **343**: 230-238.
10. Koh A SP, James Shapiro AM. Clinical Trials of Islet Transplantation - Experience of the Edmonton Group and the International Multicenter Trial. In: Hallé J.P. dVP, Rosenberg L. (ed). *The Bioartificial Pancreas and other Biohybrid Therapies*. Research Signpost 2009, pp 403-424.
 11. Ryan EA, Paty BW, Senior PA, Bigam D, Alfadhli E, Kneteman NM *et al*. Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes* 2005; **54**: 2060-2069.
 12. Ryan EA, Lakey JR, Rajotte RV, Korbitt GS, Kin T, Imes S *et al*. Clinical outcomes and insulin secretion after islet transplantation with the Edmonton protocol. *Diabetes* 2001; **50**: 710-719.
 13. Senior PA, Zeman M, Paty BW, Ryan EA, Shapiro AM. Changes in renal function after clinical islet transplantation: four-year observational study. *Am J Transplant* 2007; **7**: 91-98.
 14. Ritz-Laser B, Oberholzer J, Toso C, Brulhart MC, Zakrzewska K, Ris F *et al*. Molecular detection of circulating beta-cells after islet transplantation. *Diabetes* 2002; **51**: 557-561.
 15. Barshes NR, Wyllie S, Goss JA. Inflammation-mediated dysfunction and apoptosis in pancreatic islet transplantation: implications for intrahepatic grafts. *J Leukoc Biol* 2005; **77**: 587-597.
 16. Alejandro R, Cutfield RG, Shienvold FL, Polonsky KS, Noel J, Olson L *et al*. Natural history of intrahepatic canine islet cell autografts. *J Clin Invest* 1986; **78**: 1339-1348.
 17. Davalli AM, Ogawa Y, Ricordi C, Scharp DW, Bonner-Weir S, Weir GC. A selective decrease in the beta cell mass of human islets transplanted into diabetic nude mice. *Transplantation* 1995; **59**: 817-820.
 18. Bertuzzi F, Ricordi C. Prediction of clinical outcome in islet allotransplantation. *Diabetes Care* 2007; **30**: 410-417.
 19. Bottino R, Fernandez LA, Ricordi C, Lehmann R, Tsan MF, Oliver R *et al*. Transplantation of allogeneic islets of Langerhans in the rat liver: effects of macrophage depletion on graft survival and microenvironment activation. *Diabetes* 1998; **47**: 316-323.

20. Pileggi A, Ribeiro MM, Hogan AR, Molano RD, Embury JE, Ichii H *et al.* Effects of pancreas cold ischemia on islet function and quality. *Transplant Proc* 2009; **41**: 1808-1809.
21. Thomas FT, Contreras JL, Bilbao G, Ricordi C, Curiel D, Thomas JM. Anoikis, extracellular matrix, and apoptosis factors in isolated cell transplantation. *Surgery* 1999; **126**: 299-304.
22. Wang RN, Rosenberg L. Maintenance of beta-cell function and survival following islet isolation requires re-establishment of the islet-matrix relationship. *J Endocrinol* 1999; **163**: 181-190.
23. Rosenberg L, Wang R, Paraskevas S, Maysinger D. Structural and functional changes resulting from islet isolation lead to islet cell death. *Surgery* 1999; **126**: 393-398.
24. Paraskevas S, Duguid WP, Maysinger D, Feldman L, Agapitos D, Rosenberg L. Apoptosis occurs in freshly isolated human islets under standard culture conditions. *Transplant Proc* 1997; **29**: 750-752.
25. Ilieva A, Yuan S, Wang RN, Agapitos D, Hill DJ, Rosenberg L. Pancreatic islet cell survival following islet isolation: the role of cellular interactions in the pancreas. *J Endocrinol* 1999; **161**: 357-364.
26. Lim F, Sun AM. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science* 1980; **210**: 908-910.
27. Soon-Shiong P, Feldman E, Nelson R, Komtebedde J, Smidsrod O, Skjak-Braek G *et al.* Successful reversal of spontaneous diabetes in dogs by intraperitoneal microencapsulated islets. *Transplantation* 1992; **54**: 769-774.
28. Hasse C, Klock G, Schlosser A, Zimmermann U, Rothmund M. Parathyroid allotransplantation without immunosuppression. *Lancet* 1997; **350**: 1296-1297.
29. Soon-Shiong P, Heintz RE, Merideth N, Yao QX, Yao Z, Zheng T *et al.* Insulin independence in a type 1 diabetic patient after encapsulated islet transplantation. *Lancet* 1994; **343**: 950-951.
30. Calafiore R, Basta G, Luca G, Lemmi A, Montanucci MP, Calabrese G *et al.* Microencapsulated pancreatic islet allografts into nonimmunosuppressed patients with type 1 diabetes: first two cases. *Diabetes Care* 2006; **29**: 137-138.

31. 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* 1989; **38 Suppl 1**: 224-225.
32. Zielinski BA, Aebischer P. Chitosan as a matrix for mammalian cell encapsulation. *Biomaterials* 1994; **15**: 1049-1056.
33. Dawson RM, Broughton RL, Stevenson WT, Sefton MV. Microencapsulation of CHO cells in a hydroxyethyl methacrylate-methyl methacrylate copolymer. *Biomaterials* 1987; **8**: 360-366.
34. Kessler L, Pinget M, Aprahamian M, Dejardin P, Damge C. In vitro and in vivo studies of the properties of an artificial membrane for pancreatic islet encapsulation. *Horm Metab Res* 1991; **23**: 312-317.
35. Cruise GM, Hegre OD, Lamberti FV, Hager SR, Hill R, Scharp DS *et al.* In vitro and in vivo performance of porcine islets encapsulated in interfacially photopolymerized poly(ethylene glycol) diacrylate membranes. *Cell Transplant* 1999; **8**: 293-306.
36. Fritschy WM, Wolters GH, van Schilfgaarde R. Effect of alginate-polylysine-alginate microencapsulation on in vitro insulin release from rat pancreatic islets. *Diabetes* 1991; **40**: 37-43.
37. Remminghorst U, Rehm BH. Bacterial alginates: from biosynthesis to applications. *Biotechnol Lett* 2006; **28**: 1701-1712.
38. Hommel M SA, Goosen MFA. Canada 1984.
39. Halle JP, Leblond FA, Pariseau JF, Jutras P, Brabant MJ, Lepage Y. Studies on small (< 300 microns) microcapsules: II--Parameters governing the production of alginate beads by high voltage electrostatic pulses. *Cell Transplant* 1994; **3**: 365-372.
40. Lum ZP, Krestow M, Tai IT, Vacek I, Sun AM. Xenografts of rat islets into diabetic mice. An evaluation of new smaller capsules. *Transplantation* 1992; **53**: 1180-1183.
41. De Vos P, De Haan B, Pater J, Van Schilfgaarde R. Association between capsule diameter, adequacy of encapsulation, and survival of microencapsulated rat islet allografts. *Transplantation* 1996; **62**: 893-899.
42. King A, Sandler S, Andersson A. The effect of host factors and capsule composition on the cellular overgrowth on implanted alginate capsules. *J Biomed Mater Res* 2001; **57**: 374-383.

43. Strand BL, Ryan TL, In't Veld P, Kulseng B, Rokstad AM, Skjak-Brek G *et al.* Poly-L-Lysine induces fibrosis on alginate microcapsules via the induction of cytokines. *Cell Transplant* 2001; **10**: 263-275.
44. Haug A, Smidsrød O. Selectivity of Some Anionic Polymers for Divalent Metal Ions. *Acta Chem Scand* 1970; **24**: 843-854.
45. Ricordi C, Gray DW, Hering BJ, Kaufman DB, Warnock GL, Kneteman NM *et al.* Islet isolation assessment in man and large animals. *Acta Diabetol Lat* 1990; **27**: 185-195.
46. Morini S, Braun M, Onori P, Cicalese L, Elias G, Gaudio E *et al.* Morphological changes of isolated rat pancreatic islets: a structural, ultrastructural and morphometric study. *J Anat* 2006; **209**: 381-392.
47. Brissova M, Fowler MJ, Nicholson WE, Chu A, Hirshberg B, Harlan DM *et al.* Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *J Histochem Cytochem* 2005; **53**: 1087-1097.
48. Orci L, Unger RH. Functional subdivision of islets of Langerhans and possible role of D cells. *Lancet* 1975; **2**: 1243-1244.
49. Cabrera O, Berman DM, Kenyon NS, Ricordi C, Berggren PO, Caicedo A. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103**: 2334-2339.
50. Eberhard D, Lammert E. The pancreatic beta-cell in the islet and organ community. *Curr Opin Genet Dev* 2009; **19**: 469-475.
51. Hopcroft DW, Mason DR, Scott RS. Structure-function relationships in pancreatic islets: support for intraislet modulation of insulin secretion. *Endocrinology* 1985; **117**: 2073-2080.
52. Bosco D, Orci L, Meda P. Homologous but not heterologous contact increases the insulin secretion of individual pancreatic B-cells. *Exp Cell Res* 1989; **184**: 72-80.
53. Hauge-Evans AC, Squires PE, Persaud SJ, Jones PM. Pancreatic beta-cell-to-beta-cell interactions are required for integrated responses to nutrient stimuli: enhanced Ca²⁺ and insulin secretory responses of MIN6 pseudoislets. *Diabetes* 1999; **48**: 1402-1408.

54. Serre-Beinier V, Bosco D, Zulianello L, Charollais A, Caille D, Charpentier E *et al.* Cx36 makes channels coupling human pancreatic beta-cells, and correlates with insulin expression. *Hum Mol Genet* 2009; **18**: 428-439.
55. Cirulli V, Baetens D, Rutishauser U, Halban PA, Orci L, Rouiller DG. Expression of neural cell adhesion molecule (N-CAM) in rat islets and its role in islet cell type segregation. *J Cell Sci* 1994; **107** (Pt 6): 1429-1436.
56. Rouiller DG, Cirulli V, Halban PA. Uvomorulin mediates calcium-dependent aggregation of islet cells, whereas calcium-independent cell adhesion molecules distinguish between islet cell types. *Dev Biol* 1991; **148**: 233-242.
57. Dahl U, Sjodin A, Semb H. Cadherins regulate aggregation of pancreatic beta-cells in vivo. *Development* 1996; **122**: 2895-2902.
58. Carvell MJ, Marsh PJ, Persaud SJ, Jones PM. E-cadherin interactions regulate beta-cell proliferation in islet-like structures. *Cell Physiol Biochem* 2007; **20**: 617-626.
59. Rogers GJ, Hodgkin MN, Squires PE. E-cadherin and cell adhesion: a role in architecture and function in the pancreatic islet. *Cell Physiol Biochem* 2007; **20**: 987-994.
60. Bosco D, Rouiller DG, Halban PA. Differential expression of E-cadherin at the surface of rat beta-cells as a marker of functional heterogeneity. *J Endocrinol* 2007; **194**: 21-29.
61. Konstantinova I, Lammert E. Microvascular development: learning from pancreatic islets. *Bioessays* 2004; **26**: 1069-1075.
62. Lifson N, Lassa CV, Dixit PK. Relation between blood flow and morphology in islet organ of rat pancreas. *Am J Physiol* 1985; **249**: E43-48.
63. Lifson N, Kramlinger KG, Mayrand RR, Lender EJ. Blood flow to the rabbit pancreas with special reference to the islets of Langerhans. *Gastroenterology* 1980; **79**: 466-473.
64. Jansson L, Hellerstrom C. Stimulation by glucose of the blood flow to the pancreatic islets of the rat. *Diabetologia* 1983; **25**: 45-50.
65. Brissova M, Shostak A, Shiota M, Wiebe PO, Poffenberger G, Kantz J *et al.* Pancreatic islet production of vascular endothelial growth factor--a is

- essential for islet vascularization, revascularization, and function. *Diabetes* 2006; **55**: 2974-2985.
66. Berg JM, WH Freeman and cie, 2002.
 67. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; **407**: 770-776.
 68. Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 2003; **15**: 725-731.
 69. Emamaullee JA, Shapiro AM. Interventional strategies to prevent beta-cell apoptosis in islet transplantation. *Diabetes* 2006; **55**: 1907-1914.
 70. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92**: 5510-5514.
 71. Ivan M, Haberberger T, Gervasi DC, Michelson KS, Gunzler V, Kondo K *et al.* Biochemical purification and pharmacological inhibition of a mammalian prolyl hydroxylase acting on hypoxia-inducible factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**: 13459-13464.
 72. Kallio PJ, Wilson WJ, O'Brien S, Makino Y, Poellinger L. Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1alpha by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* 1999; **274**: 6519-6525.
 73. Weidemann A, Johnson RS. Biology of HIF-1alpha. *Cell Death Differ* 2008; **15**: 621-627.
 74. Patel SA, Simon MC. Biology of hypoxia-inducible factor-2alpha in development and disease. *Cell Death Differ* 2008; **15**: 628-634.
 75. Brusselmans K, Bono F, Maxwell P, Dor Y, Dewerchin M, Collen D *et al.* Hypoxia-inducible factor-2alpha (HIF-2alpha) is involved in the apoptotic response to hypoglycemia but not to hypoxia. *J Biol Chem* 2001; **276**: 39192-39196.
 76. Maynard MA, Evans AJ, Shi W, Kim WY, Liu FF, Ohh M. Dominant-negative HIF-3 alpha 4 suppresses VHL-null renal cell carcinoma progression. *Cell Cycle* 2007; **6**: 2810-2816.
 77. Dong Z, Venkatachalam MA, Wang J, Patel Y, Saikumar P, Semenza GL *et al.* Up-regulation of apoptosis inhibitory protein IAP-2 by hypoxia. Hif-1-independent mechanisms. *J Biol Chem* 2001; **276**: 18702-18709.

78. Bruick RK. Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**: 9082-9087.
79. Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M *et al.* Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 1998; **394**: 485-490.
80. Dionne KE, Colton CK, Yarmush ML. Effect of hypoxia on insulin secretion by isolated rat and canine islets of Langerhans. *Diabetes* 1993; **42**: 12-21.
81. de Groot M, Schuurs TA, Keizer PP, Fekken S, Leuvenink HG, van Schilfgaarde R. Response of encapsulated rat pancreatic islets to hypoxia. *Cell Transplant* 2003; **12**: 867-875.
82. Miao G, Ostrowski RP, Mace J, Hough J, Hopper A, Peverini R *et al.* Dynamic production of hypoxia-inducible factor-1alpha in early transplanted islets. *Am J Transplant* 2006; **6**: 2636-2643.
83. Greijer AE, van der Wall E. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *J Clin Pathol* 2004; **57**: 1009-1014.
84. Moritz W, Meier F, Stroka DM, Giuliani M, Kugelmeier P, Nett PC *et al.* Apoptosis in hypoxic human pancreatic islets correlates with HIF-1alpha expression. *FASEB J* 2002; **16**: 745-747.
85. Ryu GR, Lee MK, Lee E, Ko SH, Ahn YB, Kim JW *et al.* Activation of AMP-activated protein kinase mediates acute and severe hypoxic injury to pancreatic beta cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; **386**: 356-362.
86. Mohseni Salehi Monfared SS, Larijani B, Abdollahi M. Islet transplantation and antioxidant management: a comprehensive review. *World J Gastroenterol* 2009; **15**: 1153-1161.
87. Ko SH, Ryu GR, Kim S, Ahn YB, Yoon KH, Kaneto H *et al.* Inducible nitric oxide synthase-nitric oxide plays an important role in acute and severe hypoxic injury to pancreatic beta cells. *Transplantation* 2008; **85**: 323-330.
88. Brune B, von Knethen A, Sandau KB. Nitric oxide and its role in apoptosis. *Eur J Pharmacol* 1998; **351**: 261-272.
89. Henningson R, Salehi A, Lundquist I. Role of nitric oxide synthase isoforms in glucose-stimulated insulin release. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; **283**: C296-304.

90. Gu L, Rutledge B, Fiorillo J, Ernst C, Grewal I, Flavell R *et al.* In vivo properties of monocyte chemoattractant protein-1. *J Leukoc Biol* 1997; **62**: 577-580.
91. Carlsson PO, Palm F, Andersson A, Liss P. Markedly decreased oxygen tension in transplanted rat pancreatic islets irrespective of the implantation site. *Diabetes* 2001; **50**: 489-495.
92. Carlsson PO, Liss P, Andersson A, Jansson L. Measurements of oxygen tension in native and transplanted rat pancreatic islets. *Diabetes* 1998; **47**: 1027-1032.
93. Carlsson PO, Palm F, Andersson A, Liss P. Chronically decreased oxygen tension in rat pancreatic islets transplanted under the kidney capsule. *Transplantation* 2000; **69**: 761-766.
94. Mattsson G, Jansson L, Carlsson PO. Decreased vascular density in mouse pancreatic islets after transplantation. *Diabetes* 2002; **51**: 1362-1366.
95. Menger MD, Vajkoczy P, Leiderer R, Jager S, Messmer K. Influence of experimental hyperglycemia on microvascular blood perfusion of pancreatic islet isografts. *J Clin Invest* 1992; **90**: 1361-1369.
96. Menger MD, Jaeger S, Walter P, Feifel G, Hammersen F, Messmer K. Angiogenesis and hemodynamics of microvasculature of transplanted islets of Langerhans. *Diabetes* 1989; **38 Suppl 1**: 199-201.
97. Mendola JF, Goity C, Fernandez-Alvarez J, Saenz A, Benarroch G, Fernandez-Cruz L *et al.* Immunocytochemical study of pancreatic islet revascularization in islet isograft. Effect of hyperglycemia of the recipient and of in vitro culture of islets. *Transplantation* 1994; **57**: 725-730.
98. Lau J, Carlsson PO. Low revascularization of human islets when experimentally transplanted into the liver. *Transplantation* 2009; **87**: 322-325.
99. Schrezenmeir J, Kirchgessner J, Gero L, Kunz LA, Beyer J, Mueller-Klieser W. Effect of microencapsulation on oxygen distribution in islets organs. *Transplantation* 1994; **57**: 1308-1314.
100. Schrezenmeir J, Gero L, Laue C, Kirchgessner J, Muller A, Huls A *et al.* The role of oxygen supply in islet transplantation. *Transplant Proc* 1992; **24**: 2925-2929.

101. Avgoustiniatos ES, Colton CK. Effect of external oxygen mass transfer resistances on viability of immunoisolated tissue. *Ann N Y Acad Sci* 1997; **831**: 145-167.
102. McClelland RE, Coger RN. Use of micropathways to improve oxygen transport in a hepatic system. *J Biomech Eng* 2000; **122**: 268-273.
103. Folkman J, Hochberg M. Self-regulation of growth in three dimensions. *J Exp Med* 1973; **138**: 745-753.
104. Klossner J, Kivisaari J, Niinikoski J. Oxygen and carbon dioxide tensions in the abdominal cavity and colonic wall of the rabbit. *Am J Surg* 1974; **127**: 711-715.
105. Dufrane D, Steenberghe M, Goebbels RM, Saliez A, Guiot Y, Gianello P. The influence of implantation site on the biocompatibility and survival of alginate encapsulated pig islets in rats. *Biomaterials* 2006; **27**: 3201-3208.
106. Langlois G, Dusseault J, Bilodeau S, Tam SK, Magassouba D, Halle JP. Direct effect of alginate purification on the survival of islets immobilized in alginate-based microcapsules. *Acta Biomater* 2009; **5**: 3433-3440.
107. Robitaille R, Dusseault J, Henley N, Rosenberg L, Halle JP. Insulin-like growth factor II allows prolonged blood glucose normalization with a reduced islet cell mass transplantation. *Endocrinology* 2003; **144**: 3037-3045.
108. Dusseault J, Langlois G, Meunier MC, Menard M, Perreault C, Halle JP. The effect of covalent cross-links between the membrane components of microcapsules on the dissemination of encapsulated malignant cells. *Biomaterials* 2008; **29**: 917-924.
109. Lehmann R, Zuellig RA, Kugelmeier P, Baenninger PB, Moritz W, Perren A *et al.* Superiority of small islets in human islet transplantation. *Diabetes* 2007; **56**: 594-603.
110. MacGregor RR, Williams SJ, Tong PY, Kover K, Moore WV, Stehno-Bittel L. Small rat islets are superior to large islets in in vitro function and in transplantation outcomes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; **290**: E771-779.
111. Buchwald P. FEM-based oxygen consumption and cell viability models for avascular pancreatic islets. *Theor Biol Med Model* 2009; **6**: 5.

112. Zhang WJ, Laue C, Hyder A, Schrezenmeir J. Purity of alginate affects the viability and fibrotic overgrowth of encapsulated porcine islet xenografts. *Transplant Proc* 2001; **33**: 3517-3519.
113. Skjak-Braek G, Murano E, Paoletti S. Alginate as immobilization material. II: Determination of polyphenol contaminants by fluorescence spectroscopy, and evaluation of methods for their removal. *Biotechnol Bioeng* 1989; **33**: 90-94.
114. Tam SK, Dusseault J, Polizu S, Menard M, Halle JP, Yahia L. Impact of residual contamination on the biofunctional properties of purified alginates used for cell encapsulation. *Biomaterials* 2006; **27**: 1296-1305.
115. De Vos P, De Haan BJ, Wolters GH, Strubbe JH, Van Schilfgaarde R. Improved biocompatibility but limited graft survival after purification of alginate for microencapsulation of pancreatic islets. *Diabetologia* 1997; **40**: 262-270.
116. Mallett AG, Korbitt GS. Alginate modification improves long-term survival and function of transplanted encapsulated islets. *Tissue Eng Part A* 2009; **15**: 1301-1309.
117. Klock G, Pfeffermann A, Ryser C, Grohn P, Kuttler B, Hahn HJ *et al.* Biocompatibility of mannuronic acid-rich alginates. *Biomaterials* 1997; **18**: 707-713.
118. Zimmermann U, Klock G, Federlin K, Hannig K, Kowalski M, Bretzel RG *et al.* Production of mitogen-contamination free alginates with variable ratios of mannuronic acid to guluronic acid by free flow electrophoresis. *Electrophoresis* 1992; **13**: 269-274.
119. Orive G, Ponce S, Hernandez RM, Gascon AR, Igartua M, Pedraz JL. Biocompatibility of microcapsules for cell immobilization elaborated with different type of alginates. *Biomaterials* 2002; **23**: 3825-3831.
120. Menard M, Dusseault J, Langlois G, Baille WE, S KT, Yahia L *et al.* Role of protein contaminants in the immunogenicity of alginates. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.*
121. Robitaille R, Dusseault J, Henley N, Desbiens K, Labrecque N, Halle JP. Inflammatory response to peritoneal implantation of alginate-poly-L-lysine microcapsules. *Biomaterials* 2005; **26**: 4119-4127.
122. De Vos P, Smedema I, van Goor H, Moes H, van Zanten J, Netters S *et al.* Association between macrophage activation and function of micro-encapsulated rat islets. *Diabetologia* 2003; **46**: 666-673.

123. Cardozo AK, Proost P, Gysemans C, Chen MC, Mathieu C, Eizirik DL. IL-1beta and IFN-gamma induce the expression of diverse chemokines and IL-15 in human and rat pancreatic islet cells, and in islets from pre-diabetic NOD mice. *Diabetologia* 2003; **46**: 255-266.
124. Kulseng B, Thu B, Espevik T, Skjak-Braek G. Alginate polylysine microcapsules as immune barrier: permeability of cytokines and immunoglobulins over the capsule membrane. *Cell Transplant* 1997; **6**: 387-394.
125. De Vos P, de Haan BJ, de Haan A, van Zanten J, Faas MM. Factors influencing functional survival of microencapsulated islet grafts. *Cell Transplant* 2004; **13**: 515-524.
126. De Vos P, Hillebrands JL, De Haan BJ, Strubbe JH, Van Schilfgaarde R. Efficacy of a prevascularized expanded polytetrafluoroethylene solid support system as a transplantation site for pancreatic islets. *Transplantation* 1997; **63**: 824-830.
127. Petruzzo P, Pibiri L, De Giudici MA, Basta G, Calafiore R, Falorni A *et al.* Xenotransplantation of microencapsulated pancreatic islets contained in a vascular prosthesis: preliminary results. *Transpl Int* 1991; **4**: 200-204.
128. Bloch K, Papismedov E, Yavriyants K, Vorobeychik M, Beer S, Vardi P. Photosynthetic oxygen generator for bioartificial pancreas. *Tissue Eng* 2006; **12**: 337-344.
129. Zimmermann U, Noth U, Grohn P, Jork A, Ulrichs K, Lutz J *et al.* Non-invasive evaluation of the location, the functional integrity and the oxygen supply of implants: ¹⁹F nuclear magnetic resonance imaging of perfluorocarbon-loaded Ba²⁺-alginate beads. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2000; **28**: 129-146.
130. Maillard E, Sanchez-Dominguez M, Kleiss C, Langlois A, Sencier MC, Vodouhe C *et al.* Perfluorocarbons: new tool for islets preservation in vitro. *Transplant Proc* 2008; **40**: 372-374.
131. Mendoza V, Klein D, Ichii H, Ribeiro MM, Ricordi C, Hankeln T *et al.* Protection of islets in culture by delivery of oxygen binding neuroglobin via protein transduction. *Transplant Proc* 2005; **37**: 237-240.
132. Tilakaratne HK, Yang B, Hunter SK, Andracki ME, Rodgers VG. Can myoglobin expression in pancreatic beta cells improve insulin secretion under hypoxia? An exploratory study with transgenic porcine islets. *Artif Organs* 2007; **31**: 521-531.

133. Stagner JI, Parthasarathy SN, Wyler K, Parthasarathy RN. Protection from ischemic cell death by the induction of cytoglobin. *Transplant Proc* 2005; **37**: 3452-3453.
134. Mysore TB, Shinkel TA, Collins J, Salvaris EJ, Fisticaro N, Murray-Segal LJ *et al.* Overexpression of glutathione peroxidase with two isoforms of superoxide dismutase protects mouse islets from oxidative injury and improves islet graft function. *Diabetes* 2005; **54**: 2109-2116.
135. Hyder A, Laue C, Schrezenmeir J. Metabolic aspects of neonatal rat islet hypoxia tolerance. *Transpl Int*; **23**: 80-89.
136. Emamaullee JA, Shapiro AM, Rajotte RV, Korbitt G, Elliott JF. Neonatal porcine islets exhibit natural resistance to hypoxia-induced apoptosis. *Transplantation* 2006; **82**: 945-952.
137. Wright JR, Jr., Pohajdak B. Cell therapy for diabetes using piscine islet tissue. *Cell Transplant* 2001; **10**: 125-143.
138. Yang H, Morrison CM, Conlon JM, Laybolt K, Wright JR, Jr. Immunocytochemical characterization of the pancreatic islet cells of the Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Gen Comp Endocrinol* 1999; **114**: 47-56.
139. Emamaullee JA, Rajotte RV, Liston P, Korneluk RG, Lakey JR, Shapiro AM *et al.* XIAP overexpression in human islets prevents early posttransplant apoptosis and reduces the islet mass needed to treat diabetes. *Diabetes* 2005; **54**: 2541-2548.
140. Plesner A, Liston P, Tan R, Korneluk RG, Verchere CB. The X-linked inhibitor of apoptosis protein enhances survival of murine islet allografts. *Diabetes* 2005; **54**: 2533-2540.
141. Wang J, Cao Y, Chen Y, Gardner P, Steiner DF. Pancreatic beta cells lack a low glucose and O₂-inducible mitochondrial protein that augments cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103**: 10636-10641.
142. Kugelmeier P, Nett PC, Zullig R, Lehmann R, Weber M, Moritz W. Expression and hypoxic regulation of the endothelin system in endocrine cells of human and rat pancreatic islets. *JOP* 2008; **9**: 133-149.
143. Dong H, Woo SL. Hepatic insulin production for type 1 diabetes. *Trends Endocrinol Metab* 2001; **12**: 441-446.

144. Alam T, Sollinger HW. Glucose-regulated insulin production in hepatocytes. *Transplantation* 2002; **74**: 1781-1787.
145. Yasutomi K, Itokawa Y, Asada H, Kishida T, Cui FD, Ohashi S *et al.* Intravascular insulin gene delivery as potential therapeutic intervention in diabetes mellitus. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **310**: 897-903.
146. Chen NK, Sivalingam J, Tan SY, Kon OL. Plasmid-electroporated primary hepatocytes acquire quasi-physiological secretion of human insulin and restore euglycemia in diabetic mice. *Gene Ther* 2005; **12**: 655-667.
147. Olson DE, Paveglio SA, Huey PU, Porter MH, Thule PM. Glucose-responsive hepatic insulin gene therapy of spontaneously diabetic BB/Wor rats. *Hum Gene Ther* 2003; **14**: 1401-1413.
148. Samson SL, Chan L. Gene therapy for diabetes: reinventing the islet. *Trends Endocrinol Metab* 2006; **17**: 92-100.
149. Ricordi C, Lacy PE, Finke EH, Olack BJ, Scharp DW. Automated method for isolation of human pancreatic islets. *Diabetes* 1988; **37**: 413-420.