

ÉCOLE DOCTORALE Vie et Santé – ED 414
EA7294, DIATHEC

THÈSE présentée par :

Anaïs SCHASCHKOW

soutenue le : **23 septembre 2016**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Science de la Vie et de la Santé / Aspect Moléculaire et Cellulaire de la Biologie

Développement et validation de matériaux biomimétiques pour l'optimisation de la transplantation d'îlots pancréatiques

THÈSE dirigée par :

Mme Dr SIGRIST Séverine

Dr, Centre Européen d'Etude du Diabète

RAPPORTEURS :

Mme SZANTO DENES CARPENTIER Ildiko

Dr, Université de Genève

M. WERHLE-HALLER Bernhard

Dr, Université de Genève

AUTRES MEMBRES DU JURY :

M. LAVALLE Philippe

Dr, UMR-S 1121 INSERM

Mme PEDRACINI Elisa

Dr, Centre Européen d'Etude du Diabète

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier le Pr. Michel Pinget pour m'avoir accueilli durant ces trois ans au sein du laboratoire du Centre Européen D'Etude du Diabète mais également pour son soutien notamment lors des évènements publics.

Je remercie aussi très chaleureusement le Dr. Séverine Sigrist, pour avoir accepté de diriger cette thèse. Merci pour ta disponibilité, et surtout, merci pour m'avoir fait confiance durant ces 3 années. Tu es un véritable modèle de carrière et de réussite, merci.

Un merci tout particulier et du fond du cœur à ma « directrice de thèse par intérim », le Dr. Elisa Maillard-Pedracini, sans toi je ne pense pas que j'aurais pu y arriver, toujours là pour trouver le petit truc qui fait que non : tout n'est pas merdique et tout pourri. Tu es investie et regorge d'idées (parfois un peu trop ^^). Merci pour avoir été toujours là, même lors des moments de doutes parfois difficiles, aussi bien du côté professionnel que personnel. Merci pour ta confiance, merci de m'avoir laissé une grande liberté de travail (et pour m'avoir laissé décellulariser tous les organes que j'ai trouvé : foie, vessies, omentum, pancréas...). Merci pour tout ce que tu m'as appris durant ces trois années, j'espère avoir été à la hauteur.

Je remercie vivement les membres du jury, le Dr. SZANTO DENES CARPENTIER Ildiko (Service d'endocrinologie, diabétologie, hypertension et nutrition, groupe stress oxydatif et insuline, Université de Genève) ; le Dr. WERHLE-HALLER Bernhard (Département de physiologie cellulaire et métabolisme, groupe migration cellulaire, Université de Genève) ainsi que le Dr. LAVALLE Philippe (UMR-S 1121 INSERM Biomatériaux et Bioingénierie, Strasbourg), d'avoir accepté de siéger au jury et d'évaluer ce travail de thèse.

Merci à nos partenaires, le Dr. Pascal Marmey, du Centre de Transfert de Technologie du Mans et l'équipe du Pr. Patrick Vermette à Sherbrooke (Canada) pour leur implication et leur expertise au sein de ce projet. Un grand merci aussi au Pr. Catherine Bruant-Rodier, qui en plus de sa formidable bonne humeur, est d'excellent conseil via à vis de nos transplantations chez nos « petites bestioles ». Merci aussi de m'avoir permis d'assister aux opérations de chirurgie reconstructrice, ce fut un réel plaisir de partager ce moment avec vous et votre équipe.

Je voudrais ensuite remercier le Dr. Karim Bouzakri, pour ta bonne humeur, tes conseils et pour m'avoir fait découvrir jusqu'où la technologie automobile pouvait aller (le truc qui te donne ta ceinture ndlr). Je te dois une bouteille, je n'ai pas oublié ☺.

Un grand merci au Dr. Stéphanie Ros, pour ta sympathie, ton implication et ta sincérité. Tu as su m'écouter quand j'en avais besoin, surtout, reste comme tu es, tu es quelqu'un de génial.

Merci au Dr. Allan Langlois, tes blagues (pas toujours) drôles, ont sauvé mes matinées « off ». Merci aussi de m'avoir fait participer aux transplantations le 2 janvier 2013 à 7h du matin après un nouvel an plutôt « chargé ».

Merci à Romain, pour ta gentillesse, tes conseils avisés, tes associations vestimentaires toujours justes et ta fantastique implantation capillaire, qui par chance te permettra de n'être jamais chauve ;).

Merci ensuite à notre formidable équipe technique. A vrai dire je n'aime pas trop ce terme, je préfère les super-héros du labo, merci pour toute l'aide que vous m'avez apportée ! Merci à William, pour tout ce que tu m'as appris au démarrage de mon stage de master, pour ton aide et ton soutien sans faille « de toute façon, ce que tu fais, c'est de la merde ^^ ».

Merci à Cynthia, ton m'aide et ta calligraphie m'ont été précieuses lors des manips *in vivo*, merci pour ce que tu es, quelqu'un de franc et vrai, merci de t'être occupé de Momo comme une maman, je te le confie à temps plein maintenant, et je finirai sans trop m'étaler sur le sujet par un « Boobs ☺ ».

Merci Elodie, pour ta rigueur et ton travail bien fait, merci pour ses moments passés à parler chanson et zumba, merci d'avoir partagé avec moi, les mots fléchés les plus difficiles du monde (force 4 ndlr).

Merci à Harzo, la personne la plus adorable de ce monde, toujours bienveillante, toujours à l'écoute et surtout, toujours en possession de chocolat lors des coups durs. Merci pour tes conseils, ton sourire et pour nos virées en LUPO bleue électrique, les premières resteront gravées à vie dans ma mémoire ☺, même si franchement, je trouve que ta conduite est maintenant à la limite de l'excellence.

Un énorme merci à Claude, Claudio ou l'âme de ce labo, sans toi ici ce n'est plus le CEED (j'écris ceci dans un moment nostalgique où tu te dores les fesses au soleil pendant que nous on est là sous ce temps dégueulasse de juillet dont seul Strasbourg a le secret). Merci pour tout ce que tu as fait pour moi, pour avoir pris soin avec moi de tous ces ratounets (dont je suis toujours éperdument amoureuse), pour toutes les manips, mais aussi surtout, pour ton côté humain. Merci d'avoir toujours cette volonté d'en apprendre encore, c'est un vrai plaisir de travailler avec toi, même si j'avoue que quand tu fredonnes des trucs bizarres à l'animalerie, torse nu sous ta blouse verte, tu me fais parfois un peu peur. N'oublies pas, tu m'as promis de me dire un truc le jour où je pars, j'attends.

Carole, je pense qu'une thèse ne suffirait pas à te remercier pour tout ce que tu as pu faire pour moi. Je vais commencer par dire que non, malgré les apparences, on ne vit pas (encore) ensemble (même si on vient ensemble le matin, on descend ensemble à l'animalerie et on rentre ensemble le soir). Je voudrais te dire mille millions de merci pour ta disponibilité,

pour avoir accepté de me supporter des heures durant toutes ces chirurgies, mais aussi durant les moments chiants, tu es vraiment quelqu'un sur qui on peut compter. Merci pour t'être extasiée avec moi devant les chir, pour m'avoir soutenue et encouragée et merci pour ta joie quand enfin, on a réussi à guérir ces petits rats du diabète ! Merci pour ces kilomètres courus ensemble, alors que même tu disais que « moi, jamais de ma vie je n'irai courir » (tu vois, bientôt, tu viendras au boulot en vélo, et tu feras de la zumba ;)). Merci pour ces soirées passées ensemble, pour le réconfort que tu m'apportes quand ça ne va pas, et pour tes très belles qualités humaines. Tu es l'une de mes plus belles rencontres ici, tu pourras toujours compter sur moi.

Merci à la team des thésards et docteurs, Aida pour avoir partagé quelques nuits à la merci d'un prise électrique, merci à Sahla, de me raconter tes rêves prémonitoires et pour m'avoir fait découvrir des spécialités de chez toi. Merci à Pauline (j'ai pris grand soin de ton bureau et de tes clés), qui m'a permis de découvrir London ! Merci Remmelt, pour les soirées partagées et les barbeucs dans ton fantastique jardin et merci Doudou, l'homme le plus en retard du monde, le plus blaireau de tous les thésards, mais surtout quelqu'un d'extra et tellement gentil, qui n'hésite jamais à rendre service.

Mais la team thésard ne serait pas la même sans toi, la dernière arrivée (enfin revenue ^^) ma connasse préférée, ma Czuby d'amour, Elodie. Merci pour être ce que tu es, pour tes vocalises d'enfer, pour me supporter en face de toi, moi et mes multiples personnalités, quand je parle ou rigole seule, et pour être là quand j'en ai besoin. Merci pour ces litres de mojito et de lambrusco partagés, pour ces soirées dont l'issue est souvent incertaine, pour tes escaliers en colimaçon tous pourris (bon plus maintenant mais quand même ^^). Tu fais partie de ces collègues qui deviennent bien plus, des amis. N'oublies pas que tu pourras toujours compter sur moi !

Merci à Carine et Nathalie pour tout le boulot que vous faites pour nous en permanence, merci aussi à Estelle, Marion, Claire et Claude Seyller. Merci aussi à Thierry, ta joie de vivre fait toujours plaisir à voir !

Un grand merci à la team Defymed, Richard, Jordan, CTB, Aladin, Aram, et Fred. Je vous souhaite toute la réussite que vous méritez ☺ ! Merci aussi pour avoir commandé des rats dark agoutis trop mignon, (moins merci de les avoir zigouillés).

Merci aussi aux stagiaires ayant participé au projet, Céline pour avoir trimé sur les coupes de foie greffés, à Emna pour ton implication et pour tes fameux « c'est vrai ?? ». Merci aussi à Rémy, Aurélien, Julien, Charlotte, Florent (si tu es sage, tu auras mon bureau) et tous les autres qui ont pu fouler les couloirs du CEED.

Merci à toute l'équipe d'ASDIA, d'ETP et de REDOM. Je citerais tout particulièrement Barbara, toujours pleine de bonne volonté, motivée et complètement barrée (mais pas très

douée en plomberie...), Sarah, tu es vraiment quelqu'un de superbe, de gentille et de sincère, ne change pas, mais aussi Claudia, pour m'avoir prêté ton gilet rose lors de notre superbe course en tenue de troll Barbie (Electrodash).

Un énorme merci à tous mes amis, rencontrés tout au long de ma vie. Merci ML, ma binôme de toujours, merci Antho, Cynthia pour les virées Parisiennes, merci Camille, pour s'être mouillé les fesses pour moi pendant l'un de nos guénials week-ends. Merci à ma copine de galère, ma Justine d'amour, pour nos discussions passionnantes 😊.

Je voudrais enfin finir par remercier ma famille, papa, maman, pour avoir été là tout au long de cette vie pas toujours rose, mais aussi Gisèle et Denis. Un grand merci à ma mamie, toujours très fière de moi, même si elle ne comprend pas grand-chose à ce que je fais, « Isa m'a dit qu'elle avait vu que tu avais mis sur Facebook un truc que tu as fait... ».

Un merci sans limite à ma moitié, Mickaël, ma Ginette d'amour pour avoir partagé ces longues années à mes côtés et pour réussir à me supporter, il en faut des nerfs solides ;), merci aussi à toute ta famille qui m'a accueillie les bras ouverts.

Merci aussi à tout le reste de ma famille, cousins, cousines, marraine, oncles et tantes qui m'avez tant apporté. Pour finir, j'aimerai dédier ce travail de thèse à la mémoire de mon parrain, Raymond.

SOMMAIRE

Liste des figures	I
Liste des tableaux	IV
Liste des abréviations	V
1 Introduction générale.....	1
1.1 La glycémie	1
1.2 Le pancréas.....	1
1.2.1 Le pancréas exocrine.....	3
1.2.2 Le pancréas endocrine : les îlots pancréatiques	3
1.2.2.1 Hormone hypoglycémiantre : l'insuline	5
1.2.2.1.1 Structure primaire et conformation tridimensionnelle	5
1.2.2.1.2 Biosynthèse et libération de l'insuline	6
1.2.2.1.3 Mode d'action de l'insuline	8
1.2.2.1.3.1 Action de l'insuline sur le foie	10
1.2.2.1.3.2 Action de l'insuline sur le muscle strié et le tissu adipeux.....	11
1.2.2.2 Hormone hyperglycémiantre : le glucagon.....	13
1.2.2.2.1 Structure primaire et conformation tridimensionnelle	13
1.2.2.2.2 Biosynthèse et libération du glucagon	13
1.2.2.2.3 Mode d'action du glucagon.....	15
1.2.2.2.3.1 Action du glucagon sur le foie	16
1.2.2.2.3.2 Action du glucagon sur le muscle strié et le tissu adipeux	16
1.2.2.2.3.3 Action du glucagon sur la cellule β	17
1.3 Le diabète	17
1.3.1 Le diabète de type 1.....	19
1.3.1.1 Physiopathologie du DT1	20

1.3.1.1.1	Génétique	20
1.3.1.1.2	Auto-immunité	20
1.3.1.1.3	Facteurs environnementaux	21
1.3.1.1.4	Physiopathologie du diabète de type 1.....	21
1.3.2	Le diabète de type 2.....	22
1.3.2.1.1	Génétique	23
1.3.2.1.2	Facteurs environnementaux	23
1.3.2.1.3	Physiopathologie du diabète de type 2.....	24
1.3.3	Les complications du diabète.....	24
1.3.3.1	Les complications aigues.....	24
1.3.3.1.1	L'hyperglycémie, l'acidocétose et le coma hyperosmolaire	24
1.3.3.1.2	L'hypoglycémie	25
1.3.3.2	Les complications chroniques	25
1.3.3.2.1	Les macro-angiopathies.....	25
1.3.3.2.2	Les micro-angiopathies.....	26
1.3.3.2.3	Les infections	26
1.3.3.2.4	Le pied diabétique	26
1.3.3.4	Les traitements du diabète de type 1	27
1.3.4.1	Apport d'insuline exogène	27
1.3.4.1.1	Les différents types d'insuline.....	29
1.3.4.1.2	Les modes d'administration de l'insuline.....	31
1.3.4.2	Suivi associé au diabète de type 1	33
1.3.4.3	Bénéfices et risques	34
1.3.4.4	Apport d'insuline endogène	34
1.3.4.4.1	La greffe de pancréas	34
1.3.4.4.1.1	Historique	34

1.3.4.4.1.2	Technique chirurgicale	35
1.3.4.4.1.3	Immunosuppression.....	35
1.3.4.4.1.4	Résultats et survie du greffon	35
1.3.4.4.1.5	Complications	36
1.3.4.4.1.6	Conclusion	37
1.3.4.4.2	La greffe d'îlots pancréatiques.....	37
1.3.4.4.2.1	Historique	37
1.3.4.4.2.2	Sélection du receveur.....	38
1.3.4.4.2.3	Sélection du donneur	38
1.3.4.4.2.4	Procédure	39
1.3.4.4.2.5	Immunosuppression.....	42
1.3.4.4.2.6	Résultats et survie du greffon	43
1.3.4.4.2.7	Complications	45
1.3.4.4.2.8	Conclusion	45
1.4	Problématiques de la greffe d'îlots	46
1.4.1	Problématiques liées à l'isolement	47
1.4.1.1	Anoïkis.....	47
1.4.1.2	Hypoxie	51
1.4.2	Problématiques liées au site receveur	53
1.4.3	Re-vascularisation	53
1.4.4	IBMIR	53
1.4.5	Immunosuppresseurs, détoxification	56
1.5	Solutions existantes et d'avenir	56
1.5.1	Lutte contre l'anoïkis : apport de matrices de substitution.....	56
1.5.1.1	Les matrices inertes	56
1.5.1.1.1	PEG-DA (polyéthylène glycol diacrylate).....	56

1.5.1.1.2 Dextran-PEG	57
1.5.1.1.3 Hydroxy-Propyl-Méthyl-Cellulose (HPMC).....	57
1.5.1.1.4 Agarose	58
1.5.1.1.5 Alginate.....	59
1.5.2 Les matrices actives.....	59
1.5.2.1.1 L'acide hyaluronique	59
1.5.2.1.2 La fibrine	60
1.5.2.1.3 Les organes décellularisés	62
1.5.3 Lutte contre l'IBMIR et l'hypoxie: changement de site receveur	63
1.5.3.1 Le muscle.....	64
1.5.3.2 La capsule rénale.....	64
1.5.3.3 L'omentum.....	64
1.5.3.4 Les autres sites receveurs	65
2 Résumé de la problématique et objectifs	67
3 Matériels et méthodes	68
3.1 Ethique & animaux	68
3.2 Biomatériaux utilisés	68
3.3 Préparation et stabilité des émulsions de PFD	70
3.4 Obtention du plasma de rat	72
3.5 Obtention d'organes décellularisés	72
3.6 Inclusion d'organes	73
3.7 Tests de biocompatibilité des biomatériaux.....	73
3.8 Isolement d'îlots pancréatiques de Rat.....	74
3.9 Condition de culture des îlots pancréatiques	75
3.10 Viabilité des îlots pancréatiques	77
3.11 Fonctionnalité des îlots pancréatiques	77
3.12 Dosage du VEGF	78

3.13	Extraction protéique	78
3.14	Apoptose des îlots pancréatiques	78
3.14.1	Mesure de la caspase 3 effectrice par ELISA.....	78
3.14.2	Mesure de l'ADN clivé par technique TUNEL.....	79
3.15	Western blot.....	79
3.16	Mesure du stress oxydant.....	80
3.17	Chimiotactisme macrophagique	81
3.18	Test de coagulation <i>in vitro</i> : TCA.....	82
3.19	Mesure de diffusion de l'oxygène dans les biomatériaux	83
3.20	Transplantation d'îlots pancréatiques	84
3.20.1	Induction du diabète	84
3.20.2	Préparation des receveurs	84
3.20.3	Pose des pompes à insuline	85
3.20.4	Transplantation intra-hépatique.....	86
3.20.5	Transplantation intra-omentale.....	87
3.20.5.1	Sous forme de pochon	87
3.20.5.2	En intra-tissulaire	88
3.20.6	Procédures post-chirurgicales.....	89
3.20.7	Suivi métabolique à court terme.....	89
3.20.8	Suivi métabolique à long terme	89
3.20.9	Tests de tolérance au glucose	90
3.20.10	Explantation des greffes intra-omentale.....	90
3.20.11	Sacrifices	90
3.21	Immunomarquages	91
3.22	Statistiques	92
4	Résultats	93

4.1	Biomatériaux de référence : le plasma gel	93
4.1.1	Viabilité et fonctionnalité des îlots	93
4.1.2	Interaction avec la matrice et voies de signalisations	95
4.1.3	Apoptose des îlots	96
4.1.4	Hypoxie des îlots	97
4.1.5	Transplantation intra-portale des îlots cultivés dans le plasma gel	99
4.1.5.1	Etude à court terme	99
4.1.5.2	Etude à long terme	100
4.1.5.3	Statut inflammatoire post-greffe	101
4.1.5.4	Analyses histologiques	102
4.2	IBMIR, responsable de cette perte ?	104
4.3	Screening des biomatériaux candidats	105
4.3.1	Biocompatibilité des différents biomatériaux	105
4.3.2	Viabilité et fonction des îlots cultivés en présence des différents biomatériaux	106
4.3.2.1	Groupe biomatériaux support	106
4.3.2.2	Groupe biomatériaux interactions	108
4.3.2.3	Groupe biomatériaux support et interactions	109
4.3.2.4	Etablissement d'un classement des biomatériaux	110
4.3.3	Quantification de l'hypoxie dans les biomatériaux sélectionnés	110
4.3.4	Etudes des voies de survie dans les biomatériaux sélectionnés	111
4.3.5	Transplantation intra-omentale : technique du pochon	114
4.3.6	Mesure de la diffusion de l'O ₂ dans les matrices plasma gel et HPMC	115
4.3.7	Transplantation intra-omentale : greffe intra-tissulaire	116
4.3.7.1	Suivi métabolique	116
4.3.7.2	Tests de tolérance au glucose	120

4.3.7.3	Fructosamine	122
4.3.7.4	Poids des omentums.....	123
4.3.7.5	Histologie	124
5	Discussion	125
5.1	Effets <i>in vitro</i> d'une matrice de référence : le plasma	126
5.2	Transplantation intra-hépatique des îlots cultivés dans le plasma	129
5.3	Recherche d'un biomatériau de substitution	130
5.4	Transposition à un site alternatif : l'omentum	136
5.5	Transplantation intra-tissulaire.....	139
6	Conclusions.....	143
7	Références	144
8	Publications	155
9	Résumés publiés	156
10	Brevet et publication en préparation	157
11	Conférences et congrès	158
12	Distinctions	159
13	Annexes	160

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Le pancréas.....	2
Figure 2 : Le pancréas exocrine et endocrine	2
Figure 3 : Ilots de Langerhans de rat	4
Figure 4 : Anatomie des îlots de Langerhans murin et humain	5
Figure 5 : L'insuline, structure primaire et configuration spatiale.....	6
Figure 6 : La pré-pro-insuline	7
Figure 7 : Biosynthèse de l'insuline	8
Figure 8 : Le récepteur à l'insuline et les cascades de signalisation associées	9
Figure 9 : Structure de la molécule de glycogène	10
Figure 10 : Flux de glucose dans l'organisme : action de l'insuline.....	12
Figure 11 : Glucagon, structure primaire et conformation spatiale	13
Figure 12 : Sécrétion de glucagon par la cellule α	14
Figure 13 : Le récepteur au glucagon et les voies de signalisations associées (15)	15
Figure 14 : Nombre de diabétiques à travers le monde : chiffres 2013, IDF 2015	18
Figure 15 : Histoire naturelle du DT1	22
Figure 16 : Histoire naturelle du DT2	24
Figure 17 : Les complications du diabète	27
Figure 18 : Evolution journalière de la glycémie et de l'insulinémie d'une personne saine ..	28
Figure 19 : Schéma d'injection basal-bolus d'insuline	28
Figure 20 : Les analogues de l'insuline	30
Figure 21 : Les seringues (gauche) et stylos (droite) à insuline	31
Figure 22 : La pompe à insuline sous-cutanée	32
Figure 23 : La pompe à insuline implantable	32
Figure 24 : Le système du pancréas artificiel, système MiniMed 640G	33
Figure 25 : Lecteur de glycémie, bandelette et auto-piqueur	34
Figure 26 : Survie d'un greffon pancréatique.....	36
Figure 27 : Schéma du circuit permettant l'isolement d'îlots pancréatiques et photographies de différentes étapes	41
Figure 28 : Transplantation d'îlots, du donneur au receveur	42

Figure 29 : Mesure de glucose en continue sur un patient pré- et post-transplantation d'îlots	43
Figure 30 : Résultats de la greffe d'îlots	44
Figure 31 : Nombre de transplantations d'îlots réalisées dans les centres Européens et Australiens	44
Figure 32 : Diminution du nombre d'îlots fonctionnels au cours du processus d'isolement-transplantation	46
Figure 33 : Structure des intégrines (A) forme inactive (droite) et active (gauche) ; ligands des intégrines (B)	48
Figure 34 : Signalisation intégrines β 1-Fak, survie cellulaire et suppression de l'anoïkis	50
Figure 35 : Normoxie vs. hypoxie, rôle de HIF-1	52
Figure 36 : Instant Blood Mediated Inflammatory Reaction	55
Figure 37 : Structure de la molécule de PEG-DA	57
Figure 38 : Structure de l'HPMC	58
Figure 39 : Structure du polymère d'agarose	58
Figure 40 : Structure de l'alginate	59
Figure 41 : Structure de l'acide hyaluronique	60
Figure 42 : Polymérisation et clivage de la fibrine	61
Figure 43 : Organes décellularisés	63
Figure 44 : Sites receveurs expérimentaux et cliniques de greffe d'îlots pancréatiques	66
Figure 45 : Structure de la perfluorodécaline	71
Figure 46 : Décellularisation d'un pancréas de porc	73
Figure 47 : Dispositif de pose de pompes à insuline	85
Figure 48 : Implantation intra-portale d'îlots pancréatiques	87
Figure 49 : Implantation intra-omentale d'îlots pancréatiques, technique du pochon	88
Figure 50 : Implantation intra-omentale d'îlots pancréatiques, injection intra-tissulaire	88
Figure 51 : Viabilité et fonction des îlots cultivés dans un gel de plasma	94
Figure 52 : Interactions îlots-plasma gel	95
Figure 53 : Apoptose des îlots cultivés dans un gel de plasma	96
Figure 54 : Ratio p-ERK/ERK	97
Figure 55 : Hypoxie des îlots cultivés dans un gel de plasma	98

Figure 56 : Expression de FOXO-1 et sécrétion de VEGF	99
Figure 57 : Viabilité des îlots après dissolution du gel de plasma.....	99
Figure 58 : Suivi de greffe à court terme.....	100
Figure 59 : Suivi métabolique de la greffe à long terme	101
Figure 60 : Dosage sanguin de TAT après transplantation.....	102
Figure 61 : Migration des cellules immunitaires après greffe.....	103
Figure 62 : Confirmation du déclenchement d'IBMIR.....	104
Figure 63 : Coloration au trichrome de Masson des zones d'implantation des biomatériaux	106
Figure 64 : Viabilité et fonction des îlots en présence des différents biomatériaux du groupe support 3D	107
Figure 65 : Viabilité et fonction des îlots en présence des différents biomatériaux du groupe interactions.....	108
Figure 66 : Viabilité et fonction des îlots en présence des différents biomatériaux du groupe support 3D et interactions	109
Figure 67 : Etude de l'hypoxie : expression d'HIF-1 α	111
Figure 68 : Comparaison des biomatériaux sélectionnés : voie des intégrines.....	112
Figure 69 : Identification du composant permettant l'activation des intégrines	113
Figure 70 : Suivi métabolique après transplantation intra-omentale sous forme de pochon	115
Figure 71 : Test de diffusion d'O ₂ dans les biomatériaux.....	116
Figure 72 : Viabilité et fonctionnalité des îlots transplantés	117
Figure 73 : Suivi métabolique des rats transplantés en intra-omental, injection intratissulaire	119
Figure 74 : Tests de tolérance au glucose des rats transplantés	121
Figure 75 : Fructosamine plasmatique des rats transplantés	122
Figure 76 : Omentums au sacrifice : poids et aspect macroscopique.....	123
Figure 77 : Etude histologique et quantification de la densité vasculaire dans l'îlot transplanté	124

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Critères d'éligibilité et d'exclusion des patients pour une transplantation d'îlots	38
.....	
Tableau 2 : Liste des biomatériaux utilisés	69
Tableau 3 : Taille et index de polydispersité des émulsions de PFD.	71
Tableau 4 : Liste des anticorps utilisés en western blotting.....	80
Tableau 5 : Liste des anticorps utilisés en immuno-marquage	92

LISTE DES ABBREVIATIONS

µm : micromètre	Fig. : Figure
3D : Tri-dimensionnel	fMLP : Formyl-Met-Leu-Phe
AB/AM : Antibiotique-antimycotique	FOXO : Forkhead box O
AH : acide hyaluronique	g : Gramme
AMPc : Adénosine monoPhosphate cyclique	GAG : Glycosamino glycane
ATP : Adénosine tri-phosphate	GF : Growth factor
AUC : Area under the curve	GLUT : Transporteur de glucose
CD31 : Cluster de différenciation 31	HbA1c : Hémoglobine glycquée
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité	HBSS : Hank's balanced salt solution
CO₂ : Dioxyde de carbone	HGPO : Hyper-glycémie provoquée par voie orale
CQDM : Consorqium Québécois sur la Découverte du Médicament	HIF : Hypoxia inducible factor
CTL : Contôle	HLA : Human leucocyte antigen
CTTM : Centre de Transfert de Technologie du Mans	HPMC : Hydroxypropylméthyl cellulose
DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole	HRP : Horse Radish Peroxydase
Dcp : Pancréas décellularisé de porc	IBMIR : Instant blood mediated inflammatory reaction
Dcr : Pancréas décellularisé de rat	IEQ : Ilots équivalent
DHE : Dihydroéthidium	IL : Interleukine
DT1 : Diabète de type 1	IMC : Indice de masse corporelle
DT2 : Diabète de type 2	IpGTT : Intra-peritoneal glucose tolerance test
ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay	IRS : Insulin receptor substate
ePFD : Perfluorodécaline émulsionnée	L : Litre
ERK : Extracellular-signal Regulated Kinase	MAPK : Mitogen-activated protein kinase
FAK : Focal adhesion kinase	MEC : Matrice extra-cellulaire
FDA : Fluorescéine di acétate	mg : Milligramme
	min : Minute
	mL : Millilitre

mmHg : Millimètre de mercure	SLC : Solute Carrier family
mmol : Millimole	STZ : Streptozotocine
N/A : Non applicable	SVF : Sérum de veau fœtal
N₂ : Azote	TAT : Thrombin anti-thrombin complex
O₂ : Oxygène	TBP : TATA-binding protein
OMS : Organisation mondiale de la santé	TCA : Temps de céphaline activée
PEG-DA : Poly-Ethylène glycol – diacétate	TF : Facteur tissulaire
PFA : Paraformaldéhyde	TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
PI : Iodure de Propidium	UDP : Uridine di-phosphate
Pi3K : Phosphoinositol 3 kinase	UV : Ultra-violet
pM : Picomolaire	UW : Université du Wisconsin
RGD : Arginine-Glycine-Acidé Aspartique	VEGF : Vascular endothelial growth factor
ROS : reactive oxygen species	
rpm : Rotation par minute	
Shc : Src homology 2 domain containing	

1 Introduction générale

1.1 La glycémie

La glycémie ou taux plasmatique de glucose reflète la quantité de glucose (ou sucre) dans le sang. Le glucose est la principale source d'énergie des cellules de l'organisme et constitue avec les lipides, une réserve d'énergie pour le corps. La glycémie est traditionnellement exprimée en mg/dL, ou g/L mais le système international de mesure utilise des millimoles de glucose par litre de sang (mM).

Le glucose ($C_6H_{12}O_6$) ayant un poids moléculaire de 180g/mol, un facteur de 18 intervient entre les mM et les mg/dL, 1mM est donc équivalent à 18mg/dL ou 0,18g/L.

Les valeurs normales de la glycémie chez un homme sain varient de 0,70 et 1,0g/L (soit 3,9 à 5,5mM) et se doivent d'être maintenues en deçà de 0,8g/L en période préprandiale et 1,2g/L en période postprandiale. Les repas sont donc d'importants facteurs de variation de la glycémie, mais cette dernière est toujours maintenue autour d'une valeur moyenne de 1g/L grâce à l'homéostasie glycémique, qui fait entrer en jeu différents systèmes de stockage/déstockage de glucose ainsi que des régulateurs hormonaux sécrétés par le pancréas.

1.2 Le pancréas

Le pancréas est une glande de forme triangulaire mixte constituée d'un tissu glandulaire et d'un système de canaux, qui pèse environ 80 g chez l'Homme adulte. Il est situé en arrière de la cavité abdominale, s'étend derrière l'estomac et s'inscrit dans la courbe du duodénum. Quatre parties le composent : la tête du pancréas, le col ou isthme, le corps et la queue. Le canal de Wirsung traversant le pancréas dans sa longueur draine le liquide pancréatique (les sucs digestifs notamment) jusqu'au duodénum (Fig. 1).

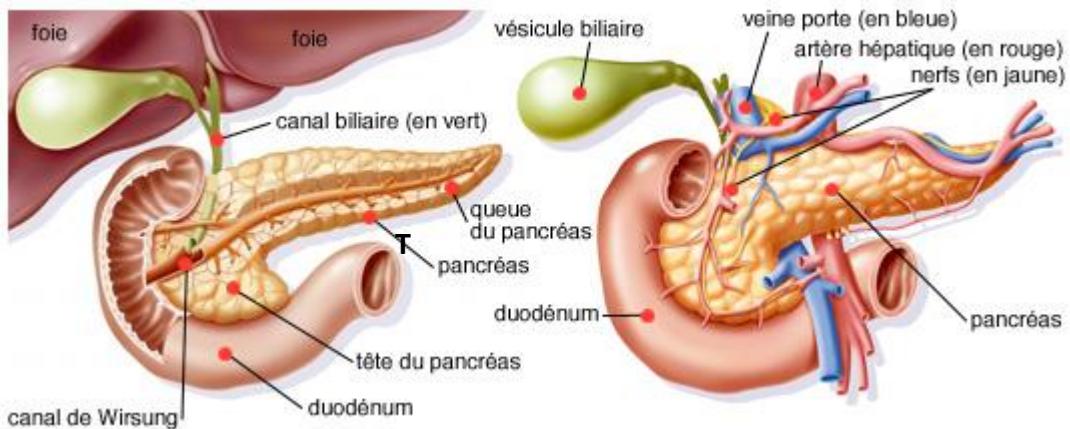


Figure 1 : Le pancréas

Schéma d'un pancréas humain, face ventrale.

D'après : <http://www.arcagy.org/infocancer/localisations/appareil-digestif/cancer-pancreas/maladie/un-peu-d-anatomie.html>

Le pancréas possède deux rôles principaux dans le métabolisme. Le premier est un rôle de digestion, de par sa fonction exocrine, le second de par sa fonction endocrine, permet une régulation précise de la glycémie (Fig. 2).

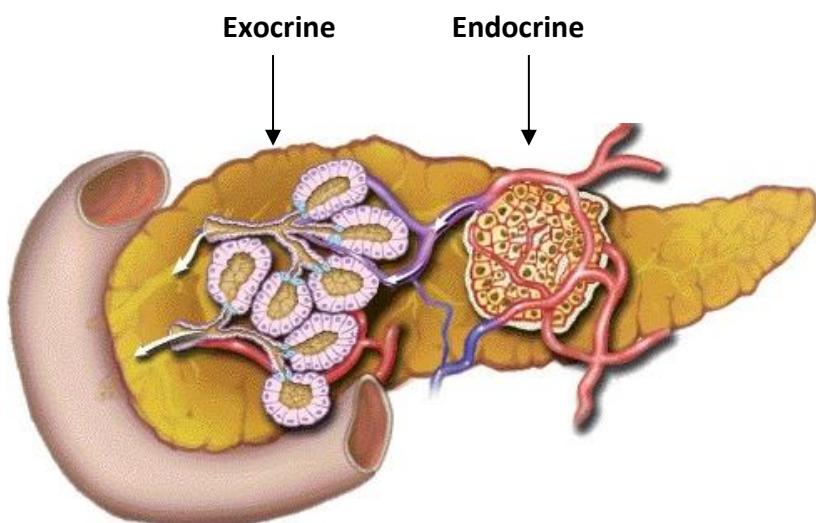


Figure 2 : Le pancréas exocrine et endocrine

Représentation schématique des deux composantes du pancréas: exocrine (tissu acinaire et ductal) et endocrine (îlots de Langerhans). Adapté de Gorelick F, et al., 2003(1).

1.2.1 Le pancréas exocrine

Après ingestion du bol alimentaire, les cellules acineuses du pancréas exocrine sécrètent des enzymes digestives que sont les protéases, lipases et amylases qui permettent de dégrader les nutriments. Les enzymes pancréatiques sont collectées dans les canaux pancréatiques qui convergent vers le canal de Wirsung (2, 3). Les cellules épithéliales formant la paroi de ces canaux élaborent et déversent dans leur lumière une sécrétion aqueuse, riche en bicarbonate, qui contribue, avec la sécrétion enzymatique des acini, à former le « suc pancréatique » finalement déversé dans le duodénum. Les ions bicarbonate (HCO_3^-) permettent également de neutraliser l'acide produit par l'estomac et participent donc à l'assimilation du glucose exogène. Une fois hydrolysé, le glucose est alors absorbé par les entérocytes, principales cellules de l'intestin, afin d'être distribué dans la circulation sanguine. Il se produit alors une augmentation de la glycémie ayant divers effets et cibles.

1.2.2 Le pancréas endocrine : les îlots pancréatiques

Une des cibles principales du glucose est le pancréas endocrine. Le pancréas est en effet composé de 2% d'îlots pancréatiques, décrits pour la première fois par Langerhans en 1869 (4). Ces îlots se retrouvent majoritairement au niveau de la queue du pancréas et leur nombre est compris entre 1 à 2 millions, soit 2% du volume total du pancréas (5). Ces derniers sont des amas cellulaires (500 à 2500 cellules) d'une taille comprise entre 50 et 250 μm de diamètre (Fig. 3).

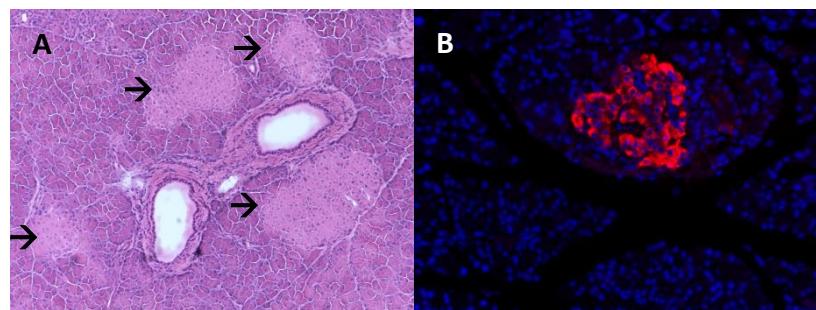


Figure 3 : Ilots de Langerhans de rat

Coloration hématoxyline-éosine d'une coupe de pancréas de rat. Les zones plus claires marquées par des flèches sont des îlots pancréatiques (A). Marquage immuno-histochimique de l'insuline sur une coupe de pancréas, en rouge l'îlot pancréatique marqué à l'aide d'un anticorps anti insuline (Texas-Red) (B). Clichés du laboratoire.

Trois types de cellules majoritaires composent un îlot de Langerhans (Fig. 4). Les cellules β , sécrétant l'insuline, hormone hypoglycémiant; les cellules α produisant le glucagon, hormone hyperglycémiant; ainsi que les cellules δ la somatostatine qui inhibe la sécrétion digestive et la sécrétion d'autres hormones aussi bien endocrines, qu'exocrines. Présentes dans une faible proportion, les cellules PP sécrètent le polypeptide pancréatique exerçant des effets sur le tractus digestif et les cellules ϵ , la ghréline une hormone orexigène. La sécrétion moyenne d'un îlot pancréatique humain est repartie de la sorte : insuline (82%), glucagon (13%), somatostatine (4%), polypeptide pancréatique (1%) et ghréline (supposée <1%) (3). Suivant les espèces, la répartition des cellules au sein de l'îlot est différente (Fig. 4C) mais la composition reste la même. Les îlots sont donc des acteurs majeurs de l'homéostasie glycémique puisqu'ils peuvent sécréter des hormones hypo- ou hyperglycémiantes.

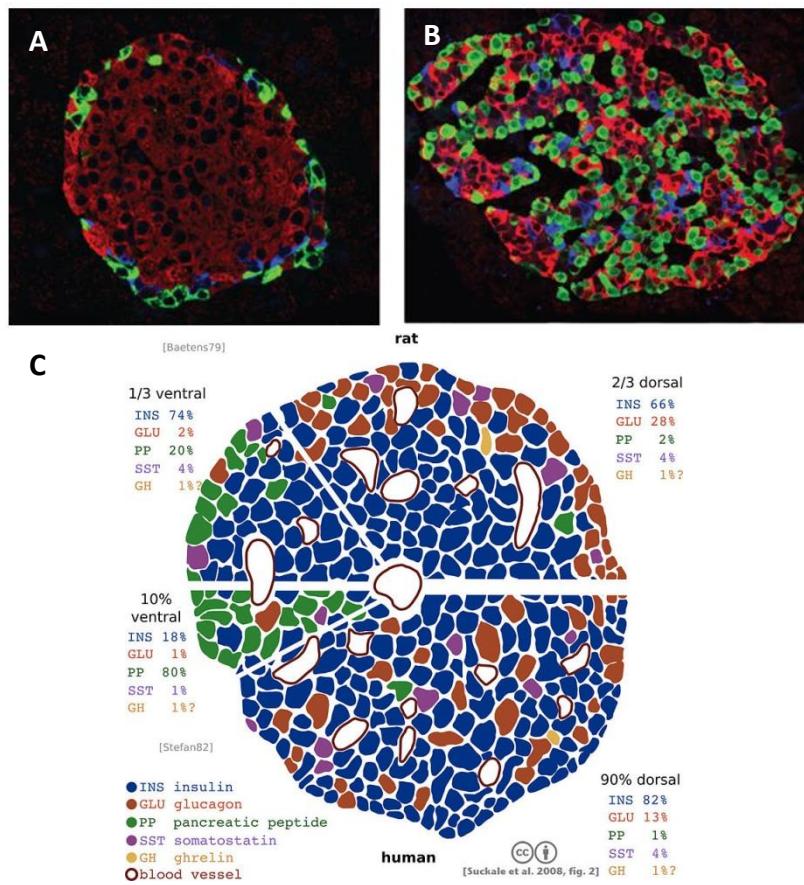


Figure 4 : Anatomie des îlots de Langerhans murin et humain

Marquage immuno-histochimique d'îlots pancréatiques. L'insuline et donc les cellules β sont marquées en rouge, le glucagon, soit les cellules α sont marquées en vert et les cellules δ , sécrétaires de somatostatine en bleu. Ilot murin : les cellules α se retrouvent à la périphérie de l'îlot (A). Ilot humain : les cellules sont disposées de façon plus aléatoire (B)(6). Répartition des cellules insulaires selon l'espèce (C) (3).

1.2.2.1 Hormone hypoglycémiant : l'insuline

1.2.2.1.1 Structure primaire et conformation tridimensionnelle

La cellule β pancréatique est au cœur de la régulation glycémique : elle va en réponse à une élévation en glucose, sécréter une hormone hypoglycémiant : l'insuline. L'insuline, de poids moléculaire voisin de 5,8kDa est composée de 51 acides aminés répartis en 2 chaînes : la chaîne A contenant 21 acides aminés et la B qui en contient 30. Ces deux chaînes sont reliées entre elles par deux ponts disulfures (-S-S-) et une troisième liaison intra-chaîne existe entre les acides aminés 6 et 11 de la chaîne A. La molécule d'insuline se présente spatialement

sous la forme d'un hexamère composé de 3 dimères situés autour d'un axe ternaire passant par trois atomes de zinc (7) (Fig. 5).

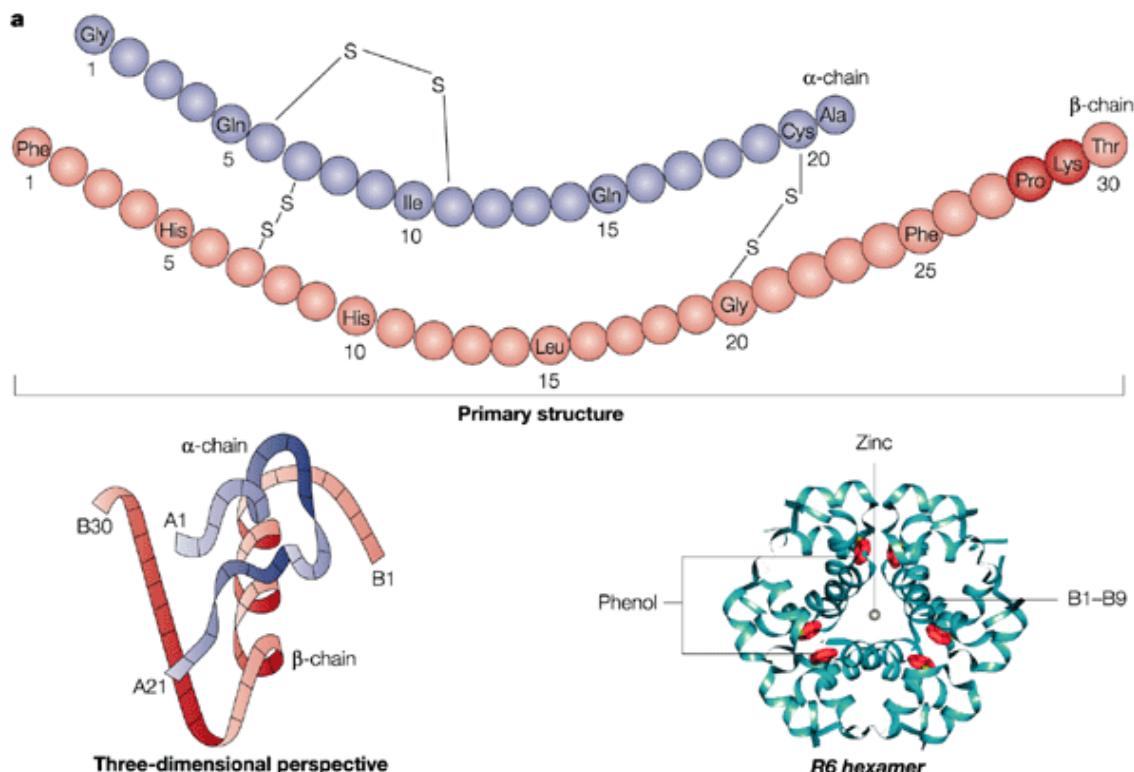


Figure 5 : L'insuline, structure primaire et configuration spatiale.

L'insuline composée de 2 chaînes est retrouvée sous la forme d'un hexamère regroupé autour d'atomes de zinc (8).

1.2.2.1.2 Biosynthèse et libération de l'insuline

L'insuline est synthétisée sous la forme d'une macromolécule : la pré-pro-insuline composée des deux chaînes de l'insuline, d'un peptide signal et du peptide C (Fig. 6). Après traduction de l'ARNm, celle-ci est directement déversé dans la lumière du réticulum endoplasmique et transformée en pro-insuline par clivage du peptide signal. La maturation finale est effectuée dans l'appareil de Golgi où la pro-insuline est convertie en insuline via clivage du peptide C. Après cette séparation, l'insuline ainsi que le peptide C (présent donc en quantité équimolaire) sont internalisés dans des vésicules de sécrétion (Fig. 7). C'est également dans ces vésicules que l'insuline est retrouvée sous sa forme hexamérique. Le processus de

biogenèse de l'insuline du noyau à son stockage prend de 1h à 3h. L'exocytose est effective dès lors que les besoins en insuline augmentent, ceux-ci étant principalement lié à une augmentation de la glycémie. En effet, le glucose présent dans la circulation sanguine va pénétrer dans la cellule β grâce aux transporteurs de glucose GLUT-2, puis métabolisé pour former de l'ATP. Cet ATP provoque l'ouverture des canaux ATP-dépendants et la dépolarisation de la membrane de la cellule par un efflux d'ion potassium (K^+) et une entrée d'ion calcium (Ca^{2+}), permettant alors l'exocytose des vésicules d'insuline (Fig.7). La cellule β possède donc un capteur permettant de détecter une augmentation de glucose et de libérer l'insuline nécessaire en conséquence.

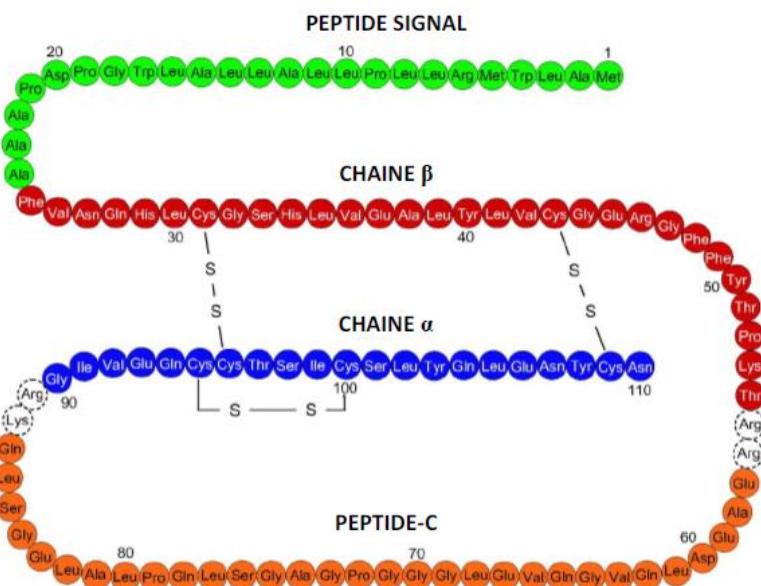


Figure 6 : La pré-pro-insuline

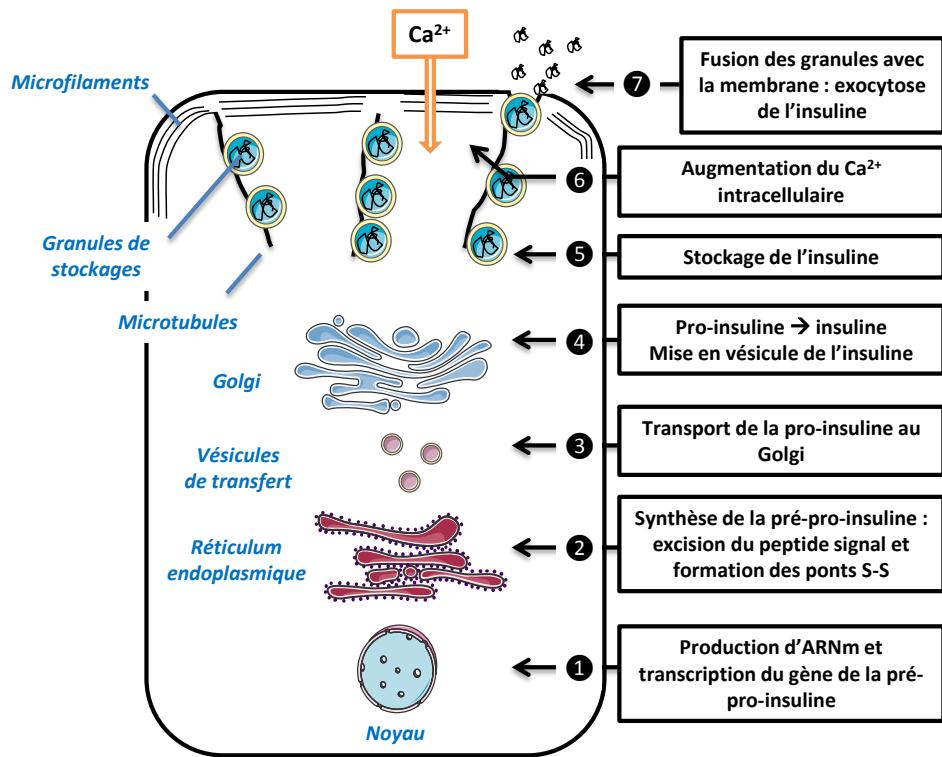


Figure 7 : Biosynthèse de l'insuline

1.2.2.1.3 Mode d'action de l'insuline

L'insuline va permettre la diminution de la glycémie en stimulant le processus anabolique et la mise en réserve du glucose. Elle agit principalement sur le métabolisme glucidique et lipidique de 3 organes cibles : le foie, le muscle et le tissu adipeux. Son action s'exerce de plusieurs façons : soit en favorisant l'entrée des substrats dans les cellules, soit en agissant directement sur leur métabolisme ou encore en inhibant certaines voies métaboliques intracellulaires du glucose (glycogénolyse, gluconéogenèse). Elle agit sur ces cibles lors de sa liaison à son récepteur. Celui-ci est une glycoprotéine composée de 2 chaînes α extracellulaires reliées par des ponts disulfures à 2 chaînes β transmembranaires. Le récepteur est un dimère constitutif portant un site de liaison pour la molécule d'insuline sur chaque chaîne α . Les chaînes β possèdent chacune en intracellulaire un domaine tyrosine-kinase et 7 résidus tyrosyls pouvant s'autophosphoryler (Fig. 8A).

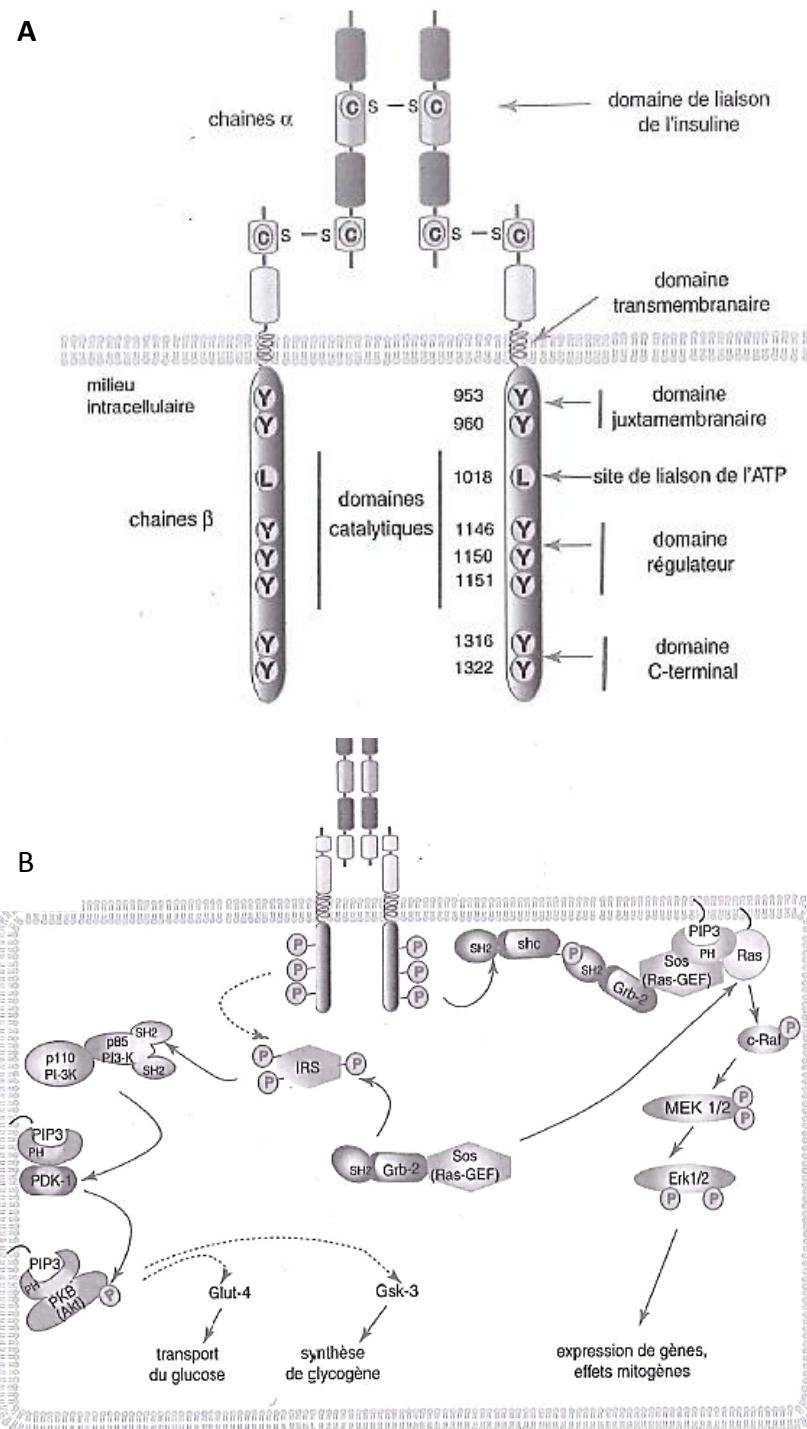


Figure 8 : Le récepteur à l'insuline et les cascades de signalisation associées

Après la liaison de l'insuline à son récepteur plusieurs cascades de phosphorylation sont enclenchées. L'activation de la voie des MAPK est déclenchée grâce à la phosphorylation de Shc et aboutit à l'expression génique au niveau du noyau. La phosphorylation d'IRS (insulin

receptor substrate), permet *in fine* l'activation de la glycogène synthétase et donc le stockage de glucose sous la forme de glycogène. D'autre part, la phosphorylation de la phosphatidylinositol-3-kinase (Pi3K) va provoquer la translocation des vésicules contenant GLUT-4 (transporteur de glucose) à la membrane et donc favoriser l'entrée du glucose dans les cellules (Fig. 8B).

1.2.2.1.3.1 Action de l'insuline sur le foie

L'insuline va favoriser la mise en réserve du glucose dans le foie, principal organe du stockage du glucose, sous forme de glycogène. Lorsque le glucose arrive dans le foie, il est transformé en glucose-6-phosphate (G6P) par une glucokinase (GSK3) dont la synthèse est stimulée par l'insuline. Il est ensuite soit utilisé directement par les hépatocytes pour la formation d'énergie via la glycolyse, soit stocké. Pour se faire, une phosphoglucomutase va convertir le G6P en G1P. Ce dernier, en présence d'uridine triphosphate (UDP), est transformé en uridinediphosphoglucose (UDPG) qui va être polymérisé en glycogène. La glycogène synthétase forme les chaînes linéaires (liaison 1-4), et l'alpha-1,4-D-glucanne relie les chaînes entre elles (liaisons 1-6) (Fig. 9). L'insuline est aussi capable de stimuler la glycolyse, ainsi que la voie des pentoses-phosphate, permettant l'utilisation du glucose en plus de son stockage sous forme de glycogène et donc une diminution de la glycémie.

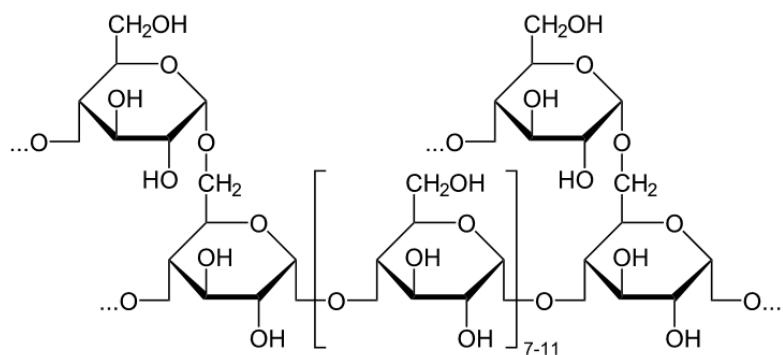


Figure 9 : Structure de la molécule de glycogène

1.2.2.1.3.2 Action de l'insuline sur le muscle strié et le tissu adipeux

L'insuline stimule le transport du glucose par l'activation de la translocation de certains transporteurs de glucose : GLUT. Parmi les transporteurs GLUT répertoriés (1 à 6), seules la synthèse et l'activité de GLUT-4 (présent dans les tissus adipeux et musculaires) sont médiées par l'insuline. L'insuline favorise donc l'entrée du glucose dans les cellules musculaires et adipeuses mais y stimule aussi les voies métaboliques. En effet, le muscle est aussi en capacité de stocker du glucose via la glycogénogénèse. L'insuline au même titre que dans le foie, y active la GSK3, stimulant cette mise en réserve. Mais son action principale dans le muscle est de stimuler l'utilisation du glucose via la glycolyse, les muscles étant après le cerveau et les intestins, les principaux utilisateurs de glucose notamment lors d'un effort physique. Dans les cellules adipeuses, l'insuline stimule la lipogenèse et donc le stockage d'énergie sous forme de triglycérides grâce à la conversion des glucides excédentaires en acétyl-coenzyme-A initiant la synthèse d'acide gras.

L'insuline permet donc l'utilisation du glucose par l'organisme et sa mise en réserve dans les tissus comme le foie, le muscle ou encore le tissu adipeux et de ce fait la diminution de la glycémie (Fig. 10). En revanche, en dehors des repas, il se peut que le taux de glucose dans le sang ne soit plus assez élevé pour subvenir aux besoins de l'organisme, comme dans le cas d'un effort physique intense. C'est à ce moment là qu'intervient le glucagon, hormone hyperglycémante qui permet le déstockage des réserves en glucose. Les îlots pancréatiques sont toujours au cœur de ce système puisqu'ils produisent le glucagon dans les cellules α .

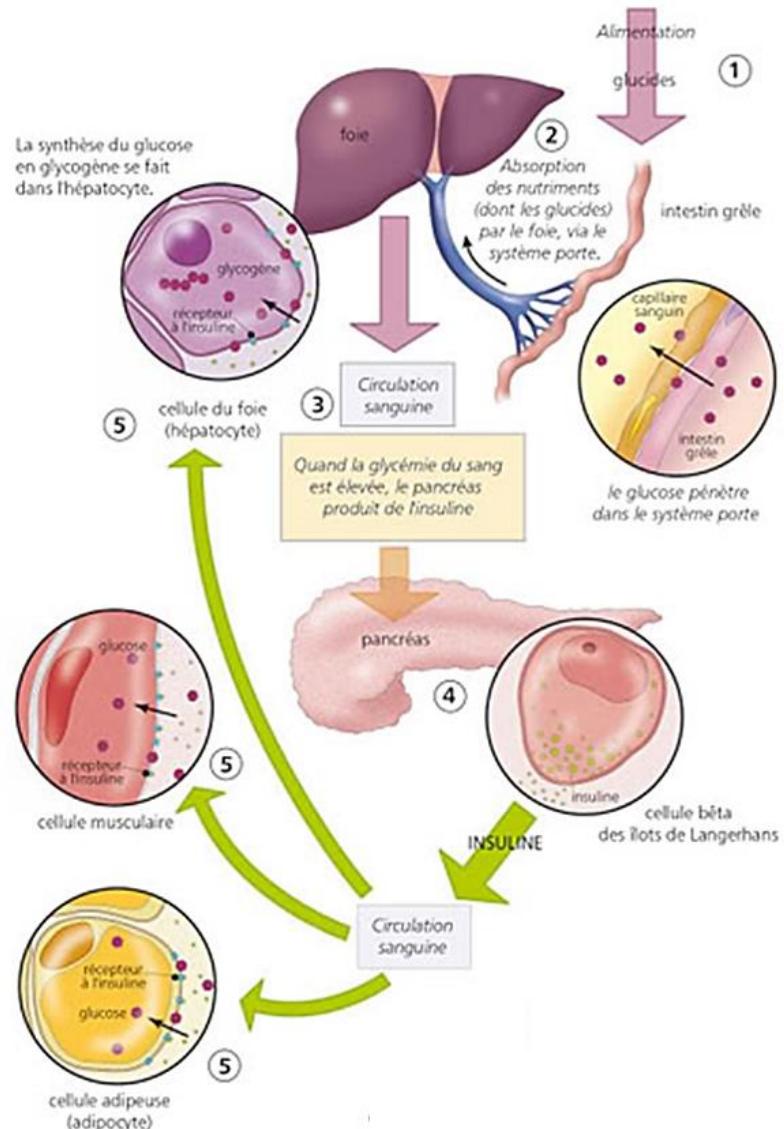


Figure 10 : Flux de glucose dans l'organisme : action de l'insuline

Lors de l'ingestion du bol alimentaire, les glucides sont transformés en nutriments assimilables par le tractus digestif (1). L'absorption de ces nutriments est faite via les cellules intestinales et le glucose (entre autre) qui permettent le passage de ces nutriments dans la circulation porte (2) puis ils sont distribués dans la circulation générale (3). Lors de l'arrivée du glucose au niveau des cellules β pancréatiques, celles-ci produisent de l'insuline (4). L'insuline est également distribuée par la circulation sanguine et favorise la diminution de la glycémie par la stimulation du stockage et de l'utilisation du glucose sanguin par les hépatocytes, les myocytes et les adipocytes (5). <http://www.voixmedicales.fr/wp-content/uploads/2015/01/>.

1.2.2.2 Hormone hyperglycémiant : le glucagon

1.2.2.2.1 Structure primaire et conformation tridimensionnelle

La cellule α pancréatique joue également un rôle important quant à la régulation glycémique ; elle sécrète le glucagon, une hormone hyperglycémiant, en réponse à une diminution du taux de glucose sanguin (9). Le glucagon, de poids moléculaire 3,5 kDa est composé de 29 acides aminés organisés en mono-chaîne. Il ne possède pas de ponts disulfures, sa structure secondaire étant formée d'une seule hélice α (Fig. 11). Il ne possède pas non plus de structure tertiaire.

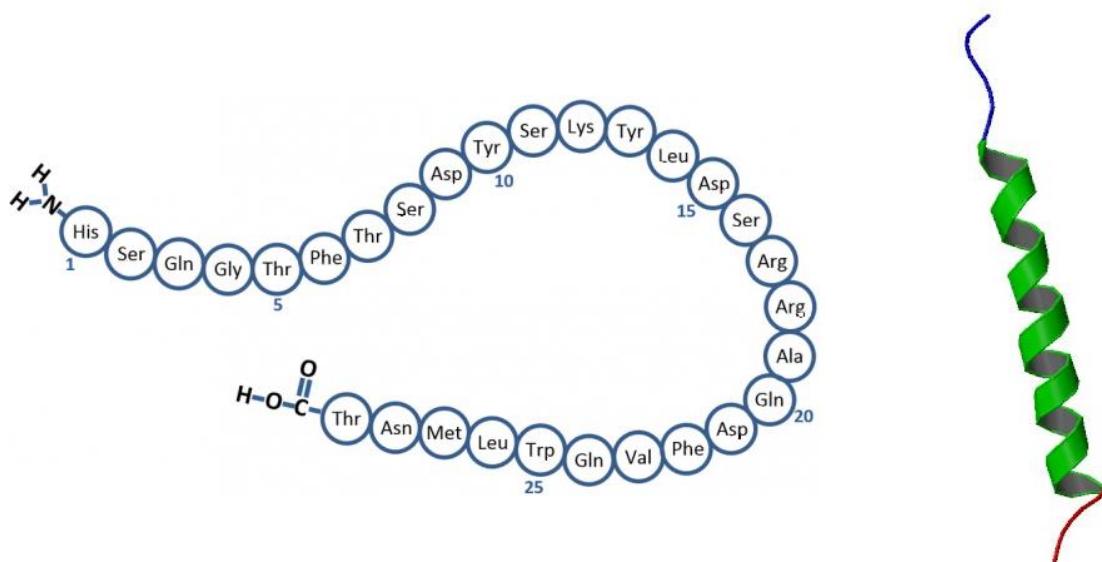


Figure 11 : Glucagon, structure primaire et conformation spatiale

D'après <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00040> et <http://www.diapedia.org/metabolism-insulin-and-other-hormones/51040851520/glucagon>.

1.2.2.2.2 Biosynthèse et libération du glucagon

Dans le pancréas, la biosynthèse du glucagon se fait également en plusieurs étapes. Il est tout d'abord élaboré sous la forme d'un précurseur : un pré-pro-glucagon. Ce long peptide va ensuite être clivé en pro-glucagon dans le réticulum endoplasmique grâce à des enzymes. La maturation de celui-ci se poursuit comme pour l'insuline avec notamment la participation

d'enzymes comme les trypsines, qui vont permettre la formation du peptide biologiquement actif. Ce dernier est également stocké dans des vésicules, qui sont exocytées en réponse à un influx calcique (10, 11).

La cellule α , possède un mécanisme de réponse à la glycémie différent de celui de la cellule β . La cellule α incorpore le glucose via un transporteur SLC2A1 et conserve une activité électrique, même à de très faibles concentrations de glucose (12). Cette dernière permet la production d'ATP, l'activation de canaux potassiques ATP dépendant et la dépolarisation de la membrane. S'en suit l'augmentation de l'influx calcique via l'activation des canaux sodiques et calciques voltage dépendant et donc l'exocytose des vésicules de glucagon. La sécrétion du glucagon est réalisée en continue lorsque les taux de glucoses sont moyen ou bas. En revanche, lorsque la glycémie augmente, le ratio ATP/ADP s'élève fortement, ce qui entraîne le blocage des canaux potassiques ATP dépendants et dépolarise la membrane à un niveau tel que les canaux voltages dépendants comme les canaux calciques se retrouvent totalement inhibés. Cet influx glucidique massif a donc pour conséquence l'inhibition de l'influx calcique et donc de la sécrétion de glucagon (13) (Fig. 12).

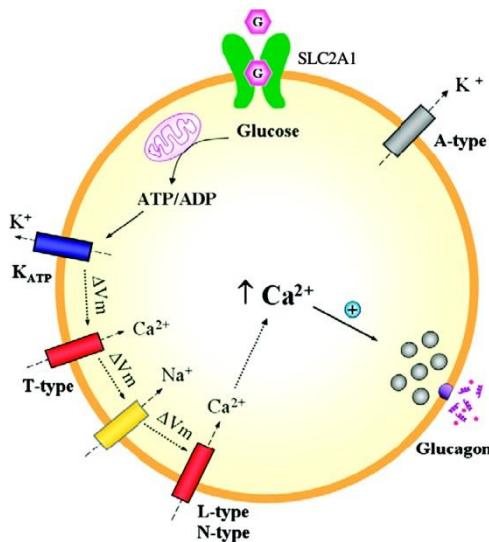


Figure 12 : Sécrétion de glucagon par la cellule α

Les cellules α pancréatiques sont équipées d'un panel de canaux spécifiques qui génèrent des potentiels d'actions et permet l'activation des canaux Na et Ca voltage dépendant même avec de très faibles taux de glucose. Cette activité électrique va permettre l'influx calcique et donc l'exocytose des vésicules de glucagon. Des concentrations élevées en glucose vont inhiber tous ces événements (13).

1.2.2.2.3 Mode d'action du glucagon

Le glucagon stimule les processus cataboliques, via la fixation à son récepteur. Le récepteur au glucagon fait partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)(14). Ce récepteur active deux voies de signalisations différentes : la première, la voie calcique (via une activation de la phospholipase C, et conversion du phosphoinositolbi-phosphate en phosphoinositol 3 phosphate) ayant comme conséquence l'augmentation de la glycogénolyse, et la diminution de la glycolyse et glycogénogenèse et la seconde, la voie médiée par l'AMPc (Adénosine mono-phosphate cyclique). Cette dernière va permettre l'activation de protéines kinases dépendantes de l'AMPc, activant au final la glycogénolyse (Fig. 13).

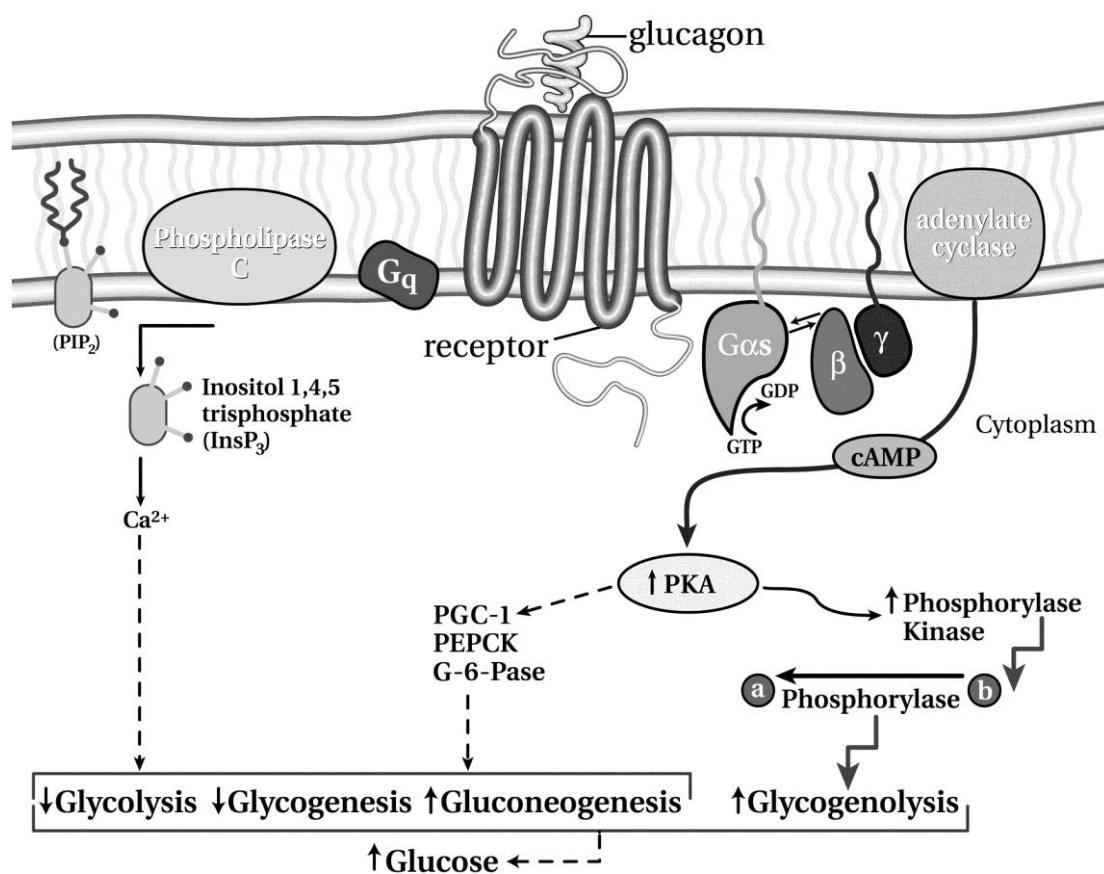


Figure 13 : Le récepteur au glucagon et les voies de signalisations associées (15)

La liaison du glucagon à son récepteur entraîne l'activation de deux voies métaboliques : la voie calcium dépendante (Pi3P) et la voie AMPc dépendante. Toutes deux convergent vers l'augmentation du déstockage du glucose et l'arrêt de sa dégradation pour augmenter la glycémie.

Cette hormone, comme l'insuline, agit au niveau du métabolisme glucidique, lipidique et protéique.

1.2.2.2.3.1 Action du glucagon sur le foie

Le glucagon exerce son action principale sur le foie en stimulant la glycogénolyse (activation de la phosphorylase). Cette étape représente la mobilisation du glucose à partir du glycogène. C'est le processus inverse de la glycogénogénèse qui intervient dès lors que les besoins en glucose de l'organisme augmentent. Les liaisons secondaires d'embranchement du glycogène sont scindées grâce à l'amylo-1,6-glucosidase. Le glycogène est alors clivé en G6P sous l'action de plusieurs phosphorylases et une phosphoglucomutase. Le G6P est libéré dans la circulation sous forme de glucose après action de la glucose-6-phosphatase et peut alors être utilisé par l'organisme (16). Le glucagon peut aussi diminuer la glycogénogenèse (inactivation de la glycogène synthase), inhiber la glycolyse (inhibition de la 1-phosphofructokinase), stimuler la néoglucogénèse (fabrication de glucose à partir de substrats non glucidiques comme les acides aminés, le glycéról, les lactates, le pyruvate et l'oxaloacétate) par activation de la fructose 1,6-diphosphatase et par l'augmentation de la capture des acides aminés par les hépatocytes. Le glucagon permet aussi l'activation de la production d'énergie à partir des lipides via l'augmentation de la cétogenèse hépatique grâce à l'activation de la triglycéride lipase.

1.2.2.2.3.2 Action du glucagon sur le muscle strié et le tissu adipeux

Le glucagon exerce sur le muscle les mêmes effets que sur le foie : il stimule la glycogénolyse et inhibe la glycolyse ainsi que la glycogénogenèse. Au niveau du tissu adipeux, le glucagon active la triglycéride lipase aboutissant à la formation de glycéról et d'acides gras. Ceux-ci ainsi formés peuvent être relâchés dans le sang et transformés en énergie via la β -oxydation des acides gras et le cycle de Krebs.

1.2.2.2.3.3 Action du glucagon sur la cellule β

En plus de tous ces effets, le glucagon stimule la sécrétion d'insuline grâce aux récepteurs au glucagon situé sur la cellule β . Ainsi, il active la synthèse et la libération de glucose et, via son potentiel de stimulation de l'insulino-sécrétion, permet l'utilisation du glucose par les cellules.

Le couple insuline-glucagon permet donc une régulation fine de la glycémie, assurant un apport énergétique convenable aux cellules de l'organisme. Il existe en revanche des dérèglements de ces systèmes, pouvant provoquer diverses pathologies, comme le diabète.

1.3 Le diabète

Le diabète est défini par l'organisation mondiale de la santé (OMS) comme suit : il s'agit d'une maladie chronique qui survient lorsque le pancréas ne produit pas assez d'insuline ou lorsque l'organisme n'est pas capable d'utiliser efficacement l'insuline qu'il produit. Il en résulte une concentration accrue de glucose dans le sang (hyperglycémie). Aujourd'hui le diabète est une véritable épidémie avec plus de 382 millions de personnes atteintes à travers le monde (Fig. 14). Le diabète est diagnostiqué à l'aide de plusieurs tests impliquant la mesure de la glycémie. Si la glycémie à jeun est supérieure à 1,26g/L, le diabète est prononcé, en revanche lorsque la glycémie à jeun est comprise entre 1,10g/L (6mM) et 1,26g/L (7mM), une suspicion de diabète peut être évoquée nécessitant la réalisation d'un test d'hyperglycémie provoquée par voie orale (HGPO). L'HGPO est réalisée sur des sujets à jeun. Elle consiste en l'ingestion de 75g de glucose et à un suivi glycémique et insulinémique sur 2h. Le résultat est normal si la glycémie ne dépasse pas 1,1 g/l à jeun et 1,4 g/l à la 2^{ème} heure post-ingestion. Une intolérance au glucose est révélée lorsque la glycémie dépasse une de ces valeurs et un diabète est diagnostiqué lorsque la glycémie dépasse 1,26 g/l à jeun ou 2 g/l à la 2^{ème} heure. Les normes de l'insulinémie sont de 15 μ U/ml à jeun et de 80 μ U/ml à la 2^{ème} heure.

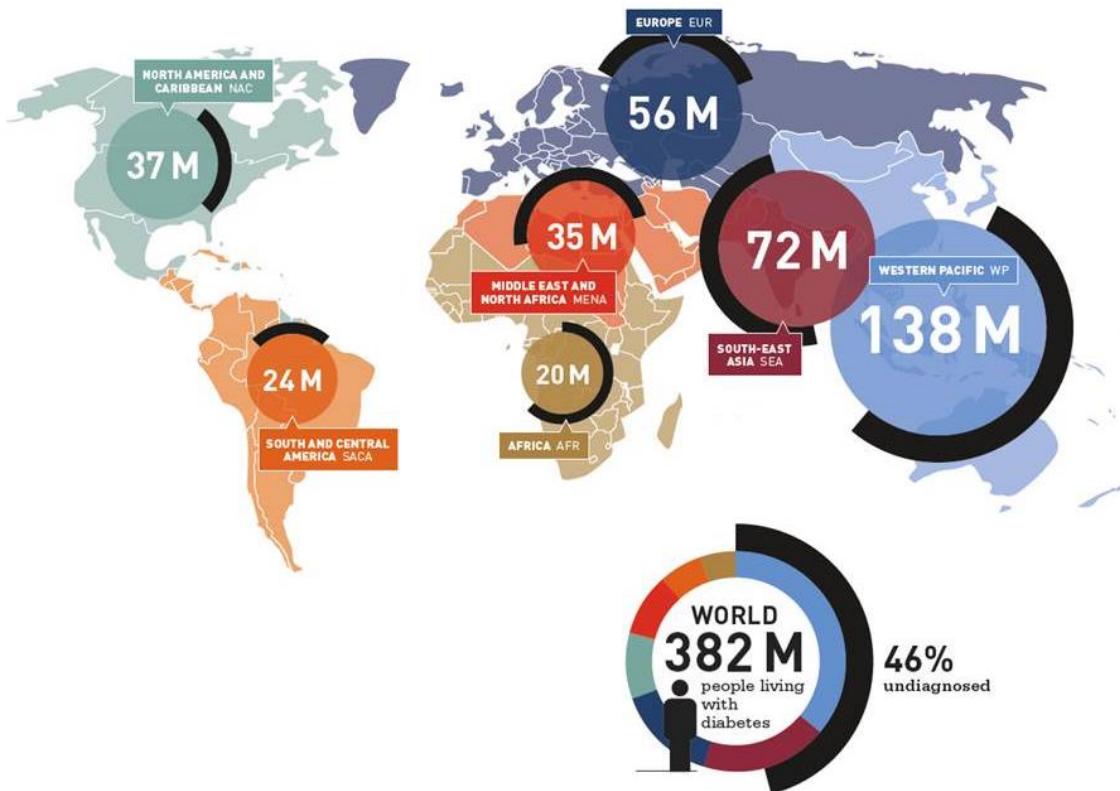


Figure 14 : Nombre de diabétiques à travers le monde : chiffres 2013, IDF 2015

Il existe deux types majoritaires de diabète : le diabète de type 1 (diabète insulinodépendant ou diabète juvénile) se caractérise par une production d'insuline insuffisante et le diabète de type 2 (diabète non insulinodépendant ou diabète adulte) résulte de l'utilisation inadéquate de l'insuline par l'organisme. Il est souvent la conséquence d'un excès pondéral et de l'inactivité physique.

Il existe ensuite d'autres types de diabètes secondaires, de causes diverses. Certaines sont génétiques comme pour les diabètes MODY ou le diabète mitochondrial, d'autres résultent d'un état physiologique ou pathologique comme le diabète gestationnel, le diabète médicamenteux, ou le diabète secondaire à un cancer du pancréas. Enfin d'autres comme le diabète de type 3 (type 1B ou africain) s'apparentent au diabète de type 1.

Le diabète MODY (Maturity Onset Diabetes Of the Young) est un diabète secondaire à une mutation au niveau de facteurs transcriptionnels. Il représenterait 2 à 5 % des diabètes non

insulino-dépendants et 5 types existent. Par exemple, le MODY 2, le plus fréquent, est secondaire à une mutation du gène de la glucokinase et se manifeste par la survenue d'une hyperglycémie modérée, peu évolutive, chez un sujet jeune et mince. Le diabète mitochondrial, lui est un diabète monogénétique secondaire à une mutation de l'ADN mitochondrial en position 32-43. Il peut être insulino-dépendant ou non insulino-dépendant et est caractérisé par une insulino-résistance liée à une atteinte musculaire par la maladie.

Le diabète gestationnel est quant à lui un diabète transitoire, où l'hyperglycémie est détectée pendant la grossesse. Ce dernier résulte d'une mauvaise adaptation du pancréas à la physiologie de la femme enceinte.

Le diabète médicamenteux et le diabète lié à un cancer du pancréas sont tous deux d'origine pathologique. Le premier étant le plus souvent lié à l'utilisation de corticoïdes et résulte d'une hyperproduction hépatique de glucose et le second, où le pancréas peut se retrouver altéré et donc déclencher le diabète de manière indirecte.

Enfin, le diabète de type 3 ou Africain est appelé ainsi car il touche les patients de cette origine. Il se manifeste plus fréquemment chez l'homme, autour de la quarantaine. Il se présente au départ comme un diabète de type 1 mais avec des phases de rémission plus ou moins prolongées.

1.3.1 Le diabète de type 1

Le diabète de type 1 (DT1) concerne 10% des diabétiques dans le monde et 8% en France. Il touche principalement les sujets jeunes (<20 ans), mais atteint également les adultes. Le DT1 est la résultante d'une destruction des cellules β pancréatiques productrices d'insuline par le système immunitaire, il s'agit donc d'un diabète insulinodépendant nécessitant un apport exogène d'insuline.

1.3.1.1 Physiopathologie du DT1

Le DT1 est donc une maladie auto-immune au même titre que la sclérose en plaque par exemple. La perte du potentiel d'insulino-sécrétion est la conséquence d'une réaction auto-immune provoquée par un ou plusieurs facteurs environnementaux (virus, toxiques, stress...) sur un fond génétique prédisposé.

1.3.1.1.1 Génétique

Dans le diabète de type 1, il n'y a pas de mutation génétique mais un terrain prédisposant ou rendant le sujet plus sensible aux processus détruisant les cellules β des îlots de Langerhans. Une quarantaine de régions génétiques intervenant dans la prédisposition génétique au diabète de type 1 ont été localisées, mais seuls certains gènes ont été identifiés.

Ce terrain génétique fait intervenir pour moitié les gènes codant pour les antigènes de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) ou Human Leucocyte Antigen (HLA) chez l'Homme. Il s'avère que les individus possédant la combinaison HLA DR3-DQ2/HLA DR4-DQ8 présentent un risque de survenue du diabète plus élevé que le reste de la population.

D'autres gènes présentent également un rôle dans cette prédisposition comme par exemple le locus IDDM2 contenant la région du gène de l'insuline, PTPN22 codant pour la protéine lymphoïde tyrosine phosphatase (LYP), IL2RA (Inter-Leukine 2 receptor α), CTLA4 (Cytotoxic T Lymphocyte Asssociated Antigen 4) ou encore TNF- α (Tumor Necrosis Factor-alpha). Ces derniers sont plus directement liés à l'immunité et notamment aux lymphocytes T, responsables en partie de la destruction des îlots pancréatiques.

1.3.1.1.2 Auto-immunité

La présence d'auto-anticorps dirigés contre les îlots pancréatiques avant même les signes cliniques de la maladie suggèrent un développement séquentiel du DT1. Ces anticorps anti-îlots (ICA, islets cell antibody) sont retrouvés chez 60 à 90% des sujets jeunes et quasi 50% des sujets plus âgés. Ils représentent aussi un facteur de prédisposition au développement du DT1. D'autres types d'anticorps ont pu être mis en évidence comme par exemple des anticorps anti-insuline (IAA, insulin auto-antibody), des anticorps anti-tyrosine phosphatase

(IA2, ICA512 auto-antibody) ou encore un anticorps dirigé contre un autoantigène présent à la surface des granules de sécrétion d'insuline (ZNT8Zinc transporteur 8, anticorps anti-transporteur de zinc).

Le terrain génétique n'explique pas tout : dans les cas de gémellités vraies ou un des deux enfants est atteint de DT1, le deuxième jumeau ne développe un DT1 que dans un cas sur deux. Le développement DT1 dépend donc environ pour moitié des facteurs génétiques, l'autre moitié étant attribuée à des facteurs environnementaux.

1.3.1.1.3 Facteurs environnementaux

Les facteurs environnementaux consistent souvent en des agents infectieux comme certains virus (Enterovirus, virus de la grippe, cytomégalovirus, Epstein Barr...) ou bactéries intestinales. Ces virus ne sont pas la cause directe du déclenchement du DT1 mais présenteraient des réactions antigéniques croisées ayant pour cible différents acteurs de la sécrétion d'insuline. Le microbiote intestinal quant à lui, s'il est déséquilibré peut également favoriser le déclenchement d'un diabète.

L'alimentation aussi jouerait un rôle dans le développement du DT1 ; il a notamment été montré que la consommation de lait de vache et de protéines de blé pouvait favoriser l'apparition d'un diabète alors que la vitamine D par exemple serait plutôt protectrice (17).

1.3.1.1.4 Physiopathologie du diabète de type 1

Au départ, le sujet diabétique de type 1 possède une prédisposition génétique qui suite à un facteur déclenchant conduit à une insulite. Lors de cette première phase, il n'y a pas de défaut de sécrétion d'insuline. L'étape suivante se caractérise par l'apparition d'auto-anticorps anti-îlots (ICA, IAA etc.) et le début d'une intolérance au glucose, il s'agit du pré-diabète. L'insulino-sécrétion est alors très fortement diminuée et les signes cliniques se manifestent mais le taux de peptide C reste positif. Enfin, le dernier stade correspond au diabète : la carence en insuline est alors totale et ni le peptide C, ni les ICA ne sont détectables. Il existe une phase de rémission appelée « honeymoon » pendant laquelle les besoins en insuline diminuent, mais celle-ci n'est que transitoire (Fig. 15).

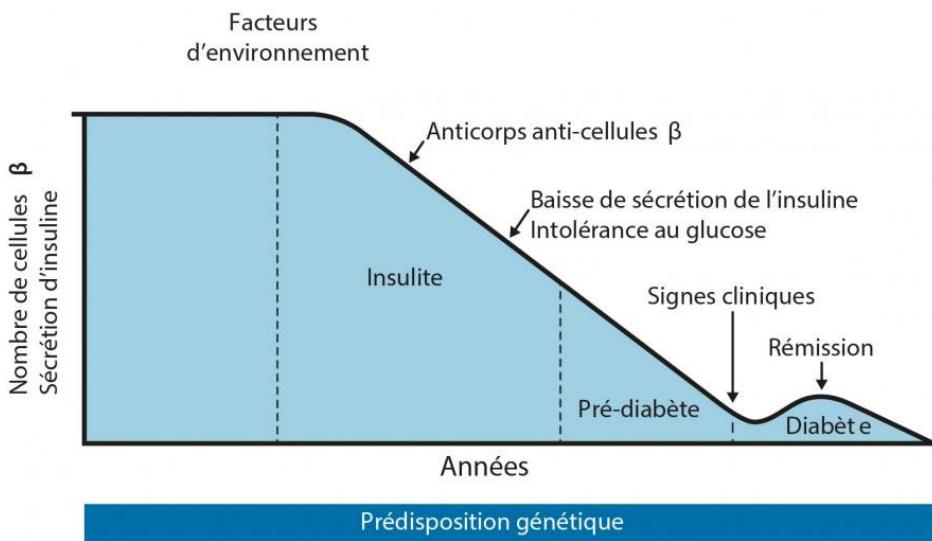


Figure 15 : Histoire naturelle du DT1

<http://www.ajd-diabete.fr/la-recherche-sur-le-diabete/les-causes-du-diabete/>

1.3.2 Le diabète de type 2

Le diabète de type 2 (DT2) représente quant à lui 90% des diabétiques et est souvent associé à une surcharge pondérale et une sédentarité accrue. Il touche principalement les sujets de 40 ans et plus et résulte non seulement de l'insulino-résistance des tissus périphériques que sont le muscle (18), le tissu adipeux (19) et le foie (20) mais aussi de l'incapacité des cellules β à répondre correctement au glucose (21). Il est non-insulino-dépendant, puisque le pancréas produit toujours de l'insuline. En revanche, il est la résultante d'une mauvaise utilisation de l'insuline par l'organisme. Dans le but de compenser cette mauvaise utilisation, le pancréas va produire de plus en plus d'insuline et s'épuiser progressivement. Dans les cas les plus sévères, cet épuisement est total et les apports d'insuline exogène se révèlent nécessaires ; le diabète est alors dit insulino-requérant.

Les patients atteints de DT2 présentent plusieurs perturbations de l'homéostasie glucidique et une diminution du nombre de cellules β fonctionnelles. L'insulino-résistance peut résulter soit d'un problème au niveau du récepteur de l'insuline, soit d'un problème en aval de la voie de signalisation, ou des deux. En effet, l'hyper-insulinémie persistante chez les sujets diabétiques de type 2 provoque non seulement une régulation négative du nombre de récepteurs à insuline, mais aussi une diminution de leur activité via une sous-activation de la

tyrosine kinase. De plus, la diminution de l'activité et du nombre de transporteurs de glucose (GLUT-4 notamment) accroît encore plus les phénomènes d'insulino-résistance. Les diabétiques de type 2 présentent donc une boucle de régulation de la glycémie altérée et qui auto-amplifie le problème. De plus, des dépôts amyloïdes sont retrouvés dans les îlots pancréatiques, provoquant la désensibilisation des cellules β au glucose et perturbant le relargage d'insuline (22). Enfin, la glucotoxicité et la lipoglucotoxicité observées dans le diabète contribuent également à l'augmentation du stress oxydant délétère pour les îlots (23).

1.3.2.1.1 Génétique

En plus des facteurs environnementaux, la composante génétique du DT2 est de plus en plus mise en avant. L'étude de familles de diabétiques, notamment celle de jumeaux monozygotes (24), a permis de définir que si l'un des deux jumeaux est atteint, l'autre deviendra diabétique dans quasi 100% des cas. A l'heure actuelle, les gènes impliqués sont toujours à l'étude et le premier à avoir été identifié est le gène PPARy. Plus de 50 loci ont été mis en relation avec le DT2 ; ils sont pour la plupart reliés à l'intolérance au glucose et à l'insulino-résistance. Par contre, les produits de ces gènes ne sont pas tous bien connus.

1.3.2.1.2 Facteurs environnementaux

De façon assez évidente, l'obésité et le manque d'activité physique sont fortement associés au développement d'un DT2. De plus la composition des repas, et notamment un apport important en acides-gras saturés augmente le risque d'insulino-résistance et de dysfonction pancréatique (25). L'âge joue également un rôle puisque les cellules β présentent une réduction de leur réactivité face à l'apport en carbohydrates au cours du temps (26). Encore plus en amont, l'environnement *in utero* pourrait lui aussi affecter le risque de développement d'une obésité pour la descendance (27).

1.3.2.1.3 Physiopathologie du diabète de type 2

Le développement d'un diabète de type 2 est également séquentiel. Dans un premier temps le sujet présente une tolérance au glucose tout à fait normale. L'anomalie métabolique fondamentale qui précède le diabète de type 2 est l'insulino-résistance qui entraîne en réponse, un hyperinsulinisme. Le pancréas s'épuise alors petit à petit et il apparaît par la suite une insulino-déficience responsable de l'hyperglycémie, il s'agit du diabète débutant. Lorsque la sécrétion d'insuline est fortement diminuée, le diabète est dit décompensé. Dans le dernier stade, l'insulinopénie est alors totale et le sujet devient insulino-réquierant (administration d'insuline exogène nécessaire). Les phases sont résumées sur la figure 16.

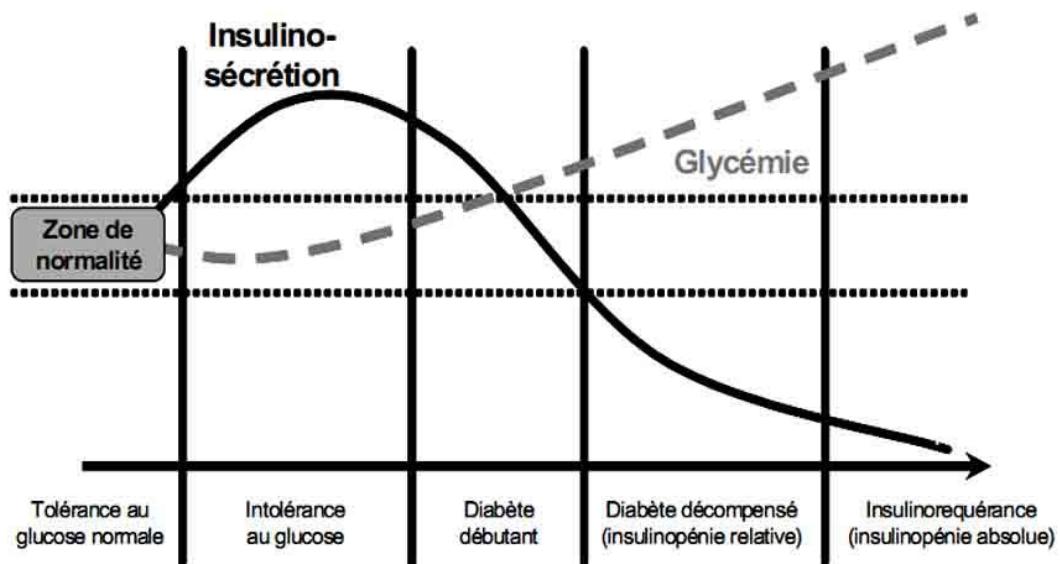


Figure 16 : Histoire naturelle du DT2

1.3.3 Les complications du diabète

1.3.3.1 Les complications aigues

1.3.3.1.1 L'hyperglycémie, l'acidocétose et le coma hyperosmolaire

La première complication d'un diabète reste l'hyperglycémie, définie par une glycémie supérieure à 1,26g/L (7mM). Malgré le taux de glucose dans le sang trop élevé, celui-ci sans insuline ne peut pas apporter aux cellules l'énergie dont elles ont besoin. La carence en

insuline entraîne une augmentation de la lipolyse qui à terme accroît la production de corps cétoniques, acide acéto-acétique, acide β -hydroxybutyrique, toxiques pour l'organisme. Ces derniers provoquent une acidose métabolique dont les symptômes se manifestent notamment par une haleine acétonique « pomme reinette ».

De plus, l'augmentation excessive de la glycémie ne permet plus aux reins de réabsorber totalement le glucose, et une glycosurie apparaît. Celle-ci est combinée à une polyurie puisque une molécule de glucose entraîne avec elle 18 molécules d'eau. Une trop grande fuite hydrique pourra quant à elle entraîner un coma hyperosmolaire.

1.3.3.1.2 L'hypoglycémie

L'hypoglycémie n'est pas la cause directe du diabète, mais des traitements. En cas d'inadéquation entre les besoins et les doses d'insuline administrées (effort physique intense, apport en carbohydrate insuffisant ...) le glucose sanguin peut alors se retrouver trop diminué ($<0,6\text{g/L (}3,3\text{mM})$). Pour y remédier, il faut ingérer le plus rapidement possible du sucre et dans les cas les plus graves, une injection intra-veineuse de glucose ou intramusculaire de glucagon doit être réalisée. Si l'hypoglycémie sévère n'est pas traitée à temps, elle peut conduire au coma voir à la mort du patient.

1.3.3.2 *Les complications chroniques*

1.3.3.2.1 Les macro-angiopathies

Les macro-angiopathies dans le cadre du diabète sont des atteintes du système cardio-vasculaire et sont à l'origine de 60 à 70% des décès de diabétiques de type 2. Les plaques d'athérome se caractérisent par une accumulation lipidique pouvant à terme boucher les artères. Ces plaques représentent un risque supplémentaire car dans l'éventualité où elles viendraient à se détacher, elles pourraient obstruer des vaisseaux en aval. L'artériosclérose est le durcissement de la paroi artérielle rendant l'ensemble du système artériel moins réactif au changement de pression sanguine. Le risque d'infarctus et d'accident vasculaire cérébral (AVC) ainsi que l'obstruction des vaisseaux notamment au niveau des membres inférieurs est donc augmenté chez le sujet diabétique.

1.3.3.2.2 Les micro-angiopathies

Les complications micro-angiopathiques comprennent la rétinopathie, la néphropathie et la neuropathie diabétique. En effet, l'hyperglycémie chronique chez le diabétique provoque des troubles de la coagulation (risque de thrombose) ainsi que l'épaississement de la membrane basale des capillaires sanguins ce qui augmente le risque d'obstruction des vaisseaux. Elle induit également une perturbation au niveau des facteurs hémorhéologiques comme par exemple un déficit dans la production d'oxyde nitrique (NO), agent vaso-relaxant. La rétine et le rein étant tous deux richement vascularisés, des atteintes au niveau des capillaires peuvent donc provoquer d'une part, une cataracte, un glaucome voire même la cécité et de l'autre part l'insuffisance rénale. Les neuropathies sont directement reliées à l'apport insuffisant en oxygène au niveau des nerfs (via les micro-vaisseaux), les sujets diabétiques ressentent le plus souvent de picotements, et présentent des pertes de sensibilité au niveau des extrémités (orteils et doigts) qui remontent progressivement le long des membres.

1.3.3.2.3 Les infections

Ces complications sont fréquentes chez le diabétique, elles témoignent d'un déséquilibre du diabète et l'aggravent. Il s'agit principalement d'infections cutanées, respiratoires ou urinaires.

1.3.3.2.4 Le pied diabétique

Il est lié à une combinaison des atteintes vasculaire, neurologique et infectieuse et doit être surveillé de façon régulière. En effet, les diabétiques risquent l'amputation à hauteur de 10%. L'obstruction des vaisseaux, la perte de sensibilité thermique et nociceptive mais aussi les infections à répétition peuvent créer un terrain favorable au développement de l'ulcère du pied diabétique.

L'ensemble des complications chroniques liées au diabète sont résumées sur la figure 17.

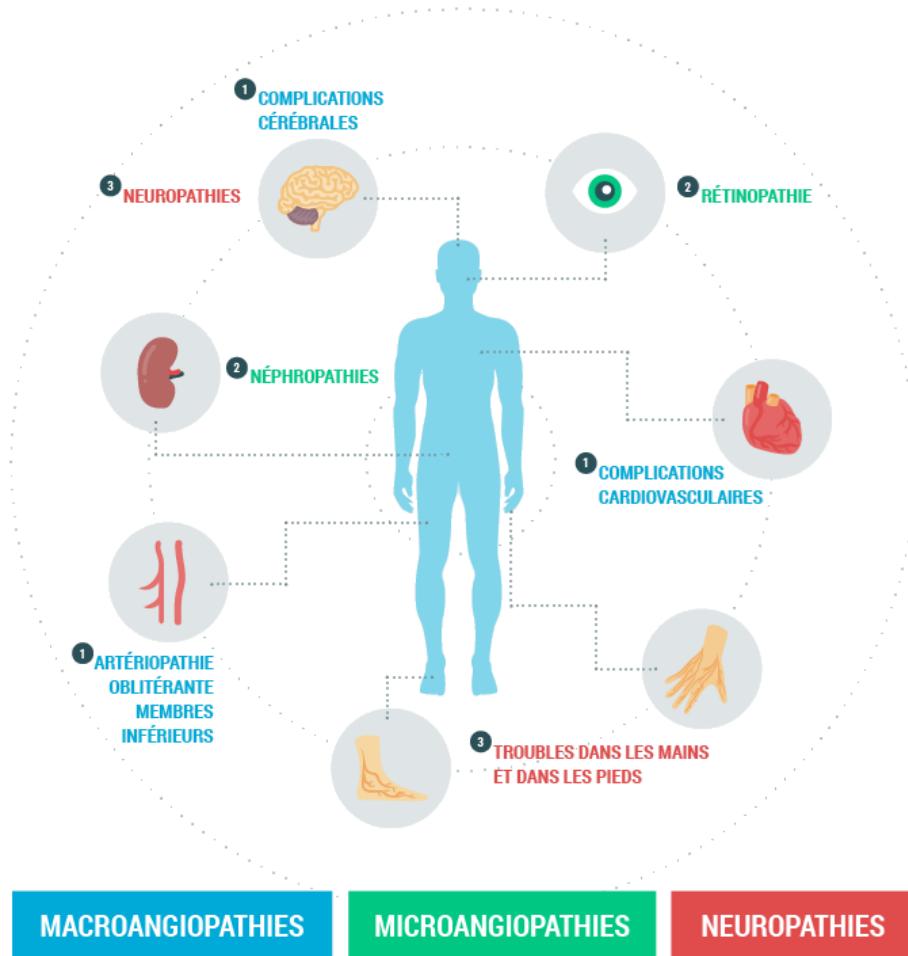


Figure 17 : Les complications du diabète

<http://ceed-diabete.org/fr/le-diabete/diabete-et-complications/>

1.3.4 Les traitements du diabète de type 1

1.3.4.1 Apport d'insuline exogène

Le pancréas ne produisant plus d'insuline, des apports exogènes sont nécessaires. Ces apports se font le plus souvent sous forme d'injections pluriquotidiennes ayant pour but de mimer au plus proche la physiologie de la sécrétion endocrine. En effet, chez une personne saine, le pancréas sécrète en continu un niveau basal d'insuline servant à l'entrée du glucose dans les cellules. De plus, en réponse à une augmentation de la glycémie consécutive à un repas, les cellules β augmentent leur production d'insuline afin de normaliser cette glycémie (Fig. 18).

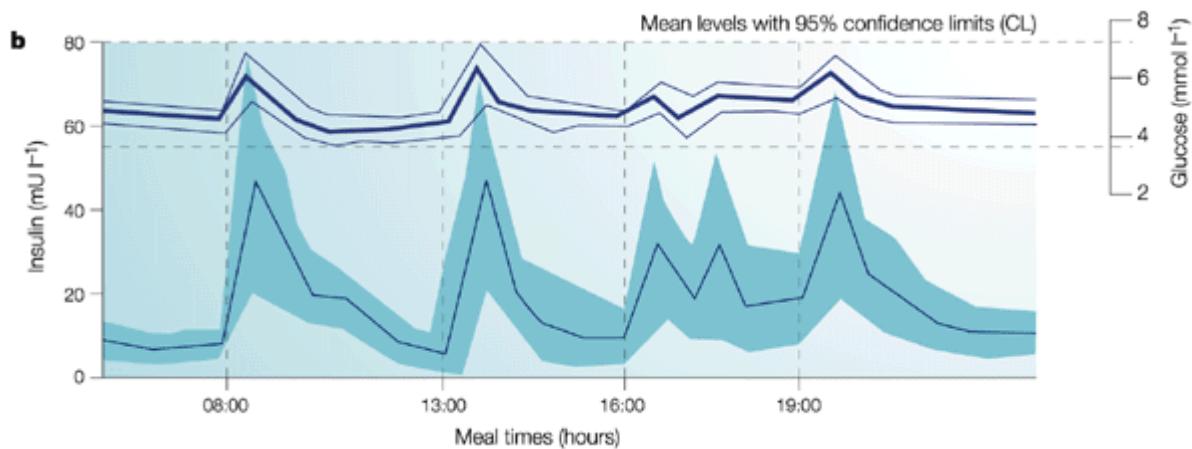


Figure 18 : Evolution journalière de la glycémie et de l'insulinémie d'une personne saine

La glycémie est contrôlée par la sécrétion d'insuline après l'ingestion d'un repas (8).

Pour mimer au mieux le pancréas, les injections d'insuline doivent être réalisées en fonction des besoins, c'est à dire une sécrétion basale et des bolus d'insuline au moment des repas (Fig. 19). Pour se faire, plusieurs types d'insuline existent sur le marché.

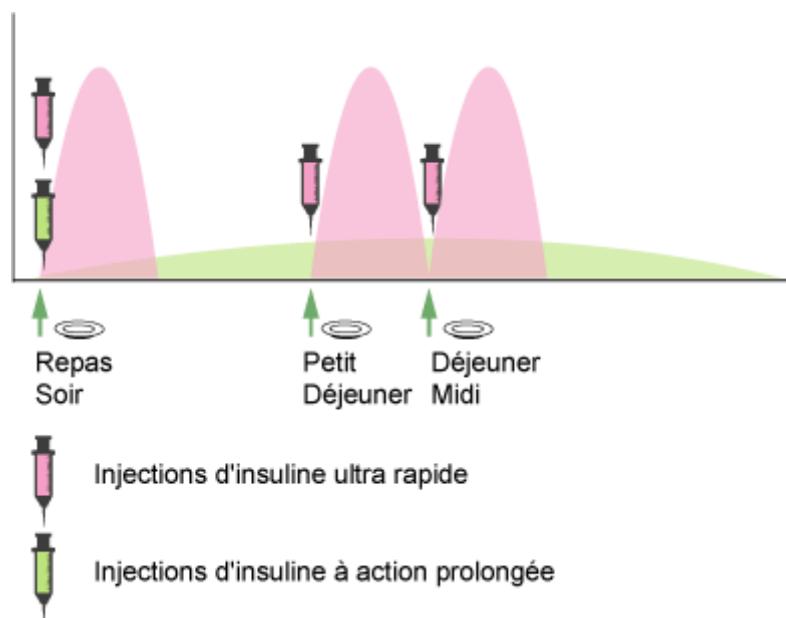


Figure 19 : Schéma d'injection basal-bolus d'insuline

Après sa découverte en 1921 par Frederick Banting et Charles Best, l'insuline utilisée pour traiter le diabète est d'origine animale (porcine et/ou bovine). Dans les années 1980, la

technologie a permis la production d'insuline humaine recombinante et d'analogues de l'insuline aux propriétés pharmacocinétiques améliorées.

Ces nouvelles méthodes de production ont été accompagnées par des avancées dans la formulation qui ont mené au développement d'insuline dite à action rapide pour une utilisation lors des repas et d'insuline à action lente ou prolongée pour les besoins basaux. La combinaison d'une série de diverses formes d'insuline est utilisée. Il existe actuellement près de 180 préparations d'insuline dans le monde.

1.3.4.1.1 Les différents types d'insuline

L'insuline soluble, semblable à l'insuline endogène, est une forme non modifiée. Après injection, le pic plasmatique d'insuline est obtenu en 1-3h et retourne au niveau basal en 6-8h. Les différents types d'insuline développés peuvent être classés suivant leur durée d'action : ultra-rapide, rapide, intermédiaire, lente ou ultra lente. L'insuline ultra-rapide permet la diminution de la glycémie 15min seulement après injection, son action elle dure de 3 à 4h. Les insulines dites rapides ont un délai d'action de 15 à 30min et une durée de 4 à 6h. Les intermédiaires de 1 à 2h et durent de 12 à 24h. Les insulines lentes elles possèdent un délai d'action de 1 à 2h et une durée de 22 à 24h. Les ultra-lentes elles, ont une action en 1 à 2h et une durée d'action pouvant aller jusqu'à 42h.

Les différences de propriétés pharmacocinétiques sont obtenues par des modifications chimiques. Ainsi, la modification de certains acides-aminés peuvent réduire l'affinité des molécules d'insuline entre elles et donc faciliter l'abortion rapide depuis le tissu sous-cutané vers la circulation sanguine (insuline rapide et ultra rapide, lispro, Humalog® et aspart, Novorapid®). La modification de la solubilité à pH physiologique permet aux insulines lentes d'être faiblement absorbées par le tissu sous-cutané après injection. Elle est réalisée via un mélange avec de la protamine et/ou du zinc (insuline isophane, NPH®) ou par la modification du point isoélectrique (insuline glargin, Lantus®). La création d'acétylations covalentes (insuline detemir, Levemir®) va favoriser la liaison insuline-albumine et créer un dépôt sous-cutané d'insuline permettant aussi sa libération continue durant la journée (Fig. 20). Le cas

particulier de l'insuline ultra-lente (insuline degludec , Tresiba®) est une combinaison de modifications chimiques : une thréonine est remplacée par un acide gras couplé à un acide glutamique et lié à une lysine. Cette structure permet à l'insuline de former dans le tissu sous cutané des hexamères qui s'alignent en multi-hexamères. Ces longues chaînes sont ensuite libérées dans la circulation sanguine. La liaison de l'acide gras à l'albumine garantit une prolongation supplémentaire de la demi-vie.

De plus, plusieurs mélanges d'insuline (ex : insuline lispro + insuline lispro protamine, HumalogMix®) ont été développés pour pallier au grand nombre d'injections journalières que nécessite un diabète de type 1. Ainsi, le besoin basal ainsi qu'un bolus peuvent être pris en une seule injection.

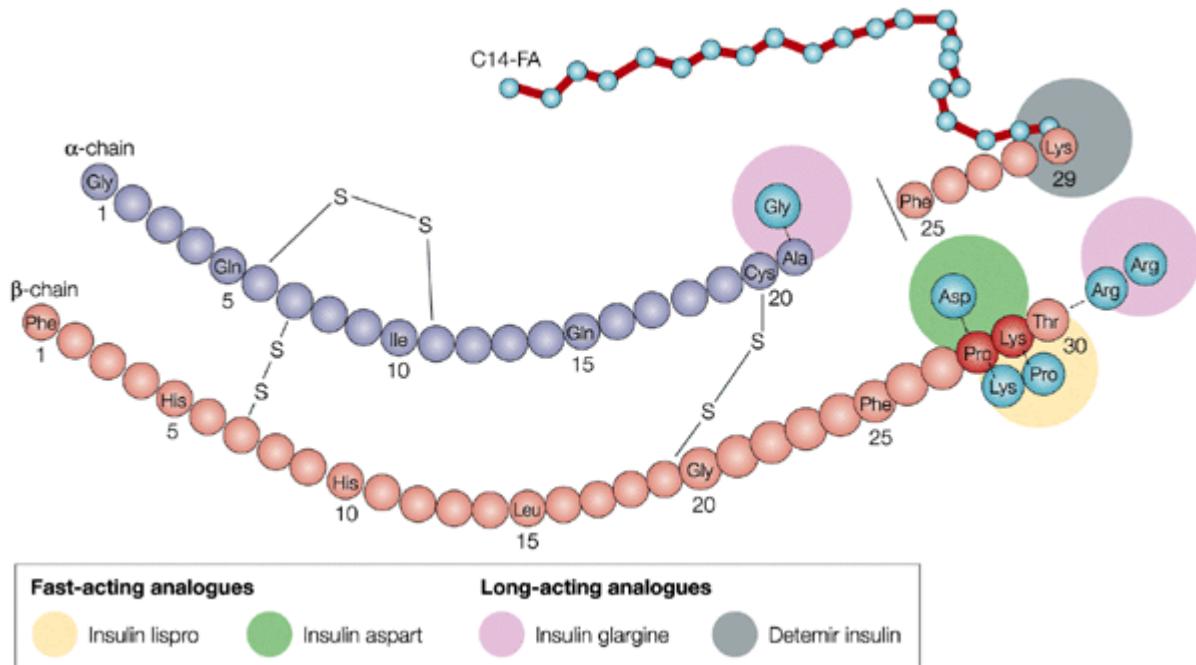


Figure 20 : Les analogues de l'insuline

D'après (8).

Les insulines sont donc à durée d'action variable et sont également disponibles sous différentes formes.

1.3.4.1.2 Les modes d'administration de l'insuline

Les seringues et stylos à insuline

L'insuline sous sa forme commerciale se présente soit en flacon nécessitant l'utilisation d'une seringue ou encore sous forme de stylo avec aiguille intégrée (Fig. 21).



Figure 21 : Les seringues (gauche) et stylos (droite) à insuline

<https://www.bd.com/us/diabetes/hcp/main.aspx?cat=63257&id=63569>

Les pompes à insuline sous-cutanées

Les pompes à insuline sous-cutanées (Fig. 22) permettent de limiter le nombre de piqûres d'insuline journalières. Elles sont constituées d'un cathéter implanté sous la peau qui est relié à un réservoir contenant l'insuline. Le cathéter doit être remplacé tous les 2 à 3 jours seulement. La pompe permet d'injecter des doses précises d'insuline à action rapide sous le format basal-bolus. Le débit basal est obtenu par l'administration continue de petites quantités d'insuline, les bolus se font à la demande par simple pression sur les commandes de la pompe.



Figure 22 : La pompe à insuline sous-cutanée

<https://www.medtronicdiabete.ca/technologie-sous-pompe-a-insuline>

Les pompes à insuline implantables

La pompe à insuline implantable ($\varnothing \approx 8$ cm) est constituée d'un réservoir à insuline et d'un cathéter intra-péritonéal (Fig. 23). Une intervention chirurgicale réalisée sous anesthésie générale est nécessaire pour sa mise en place. L'orifice central permet le rechargement de la pompe toutes les 6 à 8 semaines en hôpital de jour. Le principe basal-bolus est le même que pour la pompe sous cutanée, le réservoir étant relié à un boîtier de commande externe.



Figure 23 : La pompe à insuline implantable

<http://www.diapedia.org/type-1-diabetes-mellitus/2104588419/cipii-intraperitoneal-insulin-shortcut>

Le pancréas artificiel

Les progrès technologiques de ces dernières années ont notamment permis de créer un système appelé pancréas artificiel. Ce système est une combinaison d'une pompe à insuline et d'un capteur de glucose (CGMS, continuous glucose monitoring system) qui fonctionnent de pair (Fig. 24). Ce système permet au patient de ne pas avoir à se piquer plusieurs fois par jour que ce soit pour contrôler ses glycémies, ou pour s'injecter l'insuline.

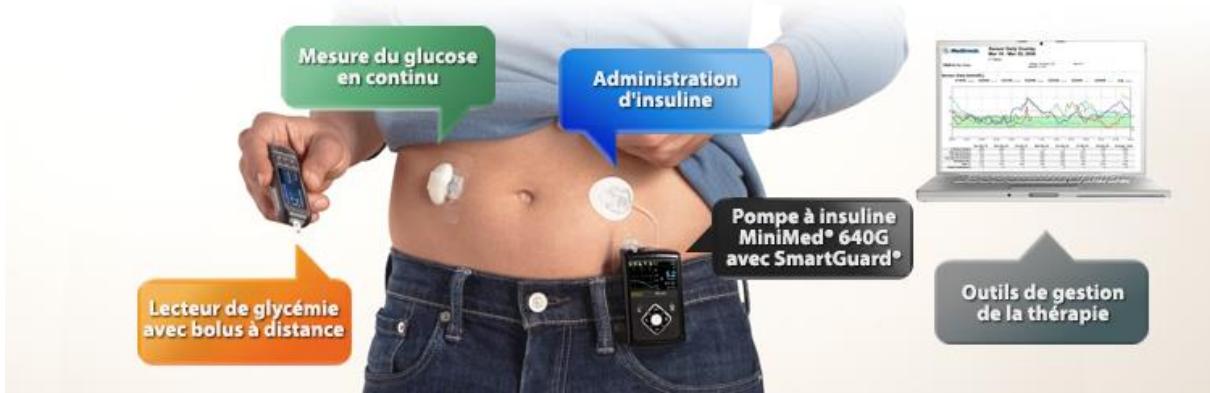


Figure 24 : Le système du pancréas artificiel, système MiniMed 640G

<https://www.medtronic-diabete.com/systeme-minimed/syst%C3%A8me-minimed-640g>

1.3.4.2 Suivi associé au diabète de type 1

Pour pouvoir injecter la dose correcte d'insuline, la glycémie doit être contrôlée très régulièrement, par l'utilisation d'un dispositif d'autocontrôle : un lecteur de glycémie (Fig. 25). Un auto-piqueur est utilisé pour faire apparaître une goutte de sang au bout des doigts. La goutte de sang est déposée sur la bandelette réactive et le lecteur affiche ensuite la glycémie du patient. Afin de contrôler la qualité du traitement, certains paramètres sanguins sont utilisés, il s'agit notamment de la mesure de l'HbA1c (hémoglobine glycosylée) ou de la fructosamine. L'HbA1c reflète le taux de glycation de l'hémoglobine des hématies qui est directement liée aux variations glycémiques du patient. Les hématies ayant une durée de vie de 120 jours, cette mesure permet de vérifier l'équilibre glycémique du patient et donc l'efficacité de son traitement sur cette même période de temps (valeurs normales : 4-6% ; valeurs cibles : 7-7,5%). La fructosamine désigne l'ensemble des protéines glyquées présentes dans le sérum dont le renouvellement est beaucoup plus rapide que celui de l'HbA1C. Elle est donc le témoin du niveau moyen du glucose dans le sang au cours des 3 dernières semaines. Comme la période sur laquelle elle donne des informations est beaucoup plus courte que celle de l'HbA1c, son utilisation est moins fréquente, sauf si on souhaite savoir rapidement dans quelle mesure un changement de traitement apporte une amélioration du contrôle glycémique (Valeurs normales : 200-290 µM, valeur cible : <350µM).



Figure 25 : Lecteur de glycémie, bandelette et auto-piqueur

<http://www.diabetes.co.uk/blood-glucose-meters/accu-chek-aviva.html>

1.3.4.3 Bénéfices et risques

L'injection d'insuline est vitale pour les patients diabétiques de type 1 puisqu'elle permet d'éviter l'hyperglycémie et les comas. Elle présente en revanche, certains désavantages : l'injection pluriquotidienne est source d'inconfort et de non compliance, et peut être à l'origine d'hypoglycémies ou d'hyperglycémies sévères. De plus, il s'avère parfois que l'apport d'insuline exogène soit insuffisant pour réguler correctement la glycémie, ou qu'une résistance à cette insuline se mette en place à force d'injections (28). Dans les cas de diabète les plus instables, où la vie du patient est en jeu, ce dernier peut se voir proposer une transplantation soit de pancréas, soit d'îlots pancréatiques permettant la délivrance physiologique d'insuline endogène.

1.3.4.4 Apport d'insuline endogène

1.3.4.4.1 La greffe de pancréas

1.3.4.4.1.1 Historique

La première greffe de pancréas a été réalisée par William Kelly and Richard Lillehei en 1966 à l'hôpital de l'université du Minnesota (Etats-unis). Elle a été réalisée en simultanée avec une greffe rénale sur un patient diabétique de type 1 (29).

Jusqu'aux années 1980, la greffe de pancréas était limitée à quelques centres aux Etats-unis et en Europe mais grâce à l'évolution des techniques chirurgicales, à l'utilisation d'une

solution de préservation d'organe adaptée (solution de l'université du Wisconsin, UW) et à l'introduction d'immunosuppresseurs comme le tacrolimus et le mycophénolate mofétyl (MMF), celle-ci a connu une belle expansion dans les années 1990 (30).

1.3.4.4.1.2 Technique chirurgicale

Le pancréas est généralement prélevé lors d'un don-multi organes. Après retrait du greffon hépatique, le greffon pancréatique est retiré en bloc avec le duodénum et la rate en préservant la naissance des artères mésentérique supérieure et splénique ainsi que de la veine porte, le greffon est ensuite immédiatement placé dans 1L de solution conservation (UW). Après une préparation du greffon, une laparotomie est alors effectuée chez le receveur, le greffon est placé préféablement dans la fosse iliaque droite du receveur (vaisseaux plus accessibles). L'implantation vasculaire du pancréas transplanté peut être réalisée par drainage systémique ou porte, le drainage exocrine peut être entérique (anastomose duodéno-jéjunale) ou vésical (anastomose duodéno-vésicale). Le pancréas natif n'est pas retiré, le patient possède donc deux pancréas à la suite de cette intervention. Le séjour à l'hôpital post-greffe est d'au minimum 1 mois.

1.3.4.4.1.3 Immunosuppression

Les traitements immunosuppresseurs les plus utilisés se composent d'une induction et d'une thérapie de maintien. L'induction est faite grâce à des sérum anti-lymphocytaires (anticorps polyclonaux anti-cellules T (ATG)) ou par des anticorps monoclonaux anti-récepteur de l'interleukine-2 (anti-ILR-2 : basiliximab, daclizumab). Le maintien est basé sur un traitement aux anti-calcineurines (tacrolimus) associé avec un anti-métabolite (mycopenolate mofetyl ou MMF) ou un traitement aux corticoïdes (prednisone).

1.3.4.4.1.4 Résultats et survie du greffon

Selon le registre international de transplantation pancréatique (IPTR), plus de 35000 greffes pancréatiques ont été réalisées (31). La survie du receveur à 1 et 5 ans est respectivement

de 95 et 88%. La survie du greffon à 1 et 5 ans est quant à lui de 84 et 60% (Fig. 26). Le rejet aigu (dans la première année) est responsable de la perte de 6% des greffons (32). La thérapie s'est considérablement améliorée puisque dans les années 1970-80, le rejet de greffe était constaté dans 80% des cas après 1 an (33). Actuellement, malgré les meilleurs résultats concernant la survie du greffon, les complications infectieuses continuent d'être les premières causes de morbidité et de mortalité.

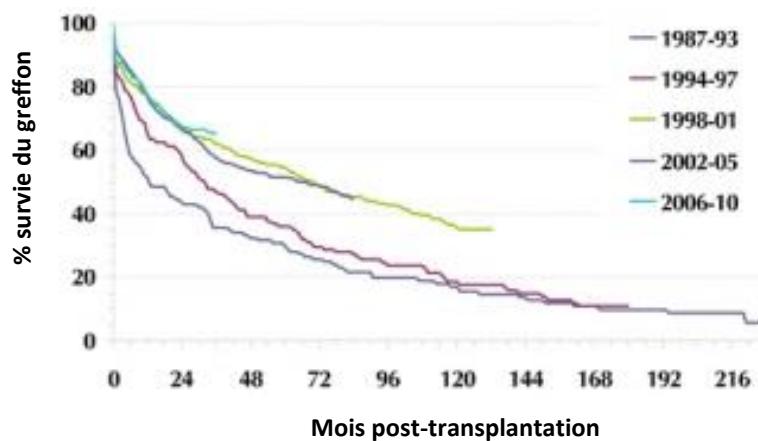


Figure 26 : Survie d'un greffon pancréatique

La survie du greffon pancréatique est classée suivant les années de greffe. Graphique tiré du IPTR (34).

1.3.4.4.1.5 Complications

En général, les premières complications découlent d'une défaillance technique suivie par un rejet aigu ou chronique. Les défaillances techniques sont par exemple les thromboses vasculaires (50% des cas), les pancréatites (20%), les infections (18%) les fistules (6,5%) et les hémorragies (2,5%). D'autres complications comme la déhiscence de la paroi abdominale sont également à déplorer (35).

La greffe pancréatique présente 10 à 20% de complications nécessitant une nouvelle laparotomie exploratrice (36) et entraîne souvent de fréquentes et sévères complications urologiques (incidence de 10 à 25% des patients) (37). Des complications métaboliques sont aussi fréquentes comme notamment l'acidose et la déshydratation due à la perte d'eau et de bicarbonate dans les urines.

La plus fréquente complication des greffes pancréatiques avec drainage entérique est la fuite intestinale, présentant un risque majeur pour la survie du patient (incidence 5 à 8%).

Les patients greffés présentent en plus un risque élevé de développer une infection par le cytomégalovirus en raison de l'utilisation de sérum anti-lymphocytaire dans les protocoles d'immunosuppression. L'incidence moyenne est de 25%. L'administration d'antibiotiques, antifongiques, et des agents antiviraux est recommandée.

Liés aux complications infectieuses et au rejet dit chronique, l'infarctus du myocarde et la mort subite sont également d'importantes causes de mortalité.

1.3.4.4.1.6 Conclusion

La transplantation de pancréas entier reste le traitement le plus efficace pour le traitement du diabète de type 1. En revanche, de nombreuses complications chirurgicales sont à déplorer et la mise en place d'une immunosuppression intensive est obligatoire, de plus la pénurie d'organe ne permet pas d'obtenir un nombre suffisant de pancréas. Cependant, les patients greffés présentent une meilleure qualité de vie et une espérance de vie plus grande. Afin de pallier aux nombreuses complications et au taux élevé de mortalité, une nouvelle thérapie émerge : la greffe d'îlots pancréatiques. Celle-ci permet la diminution des complications chirurgicales et de l'immunosuppression.

1.3.4.4.2 La greffe d'îlots pancréatiques

1.3.4.4.2.1 Historique

La première greffe d'îlots a été effectuée en 1972. Elle a permis de restaurer l'insulino-indépendance chez le rat diabétique (38). En 1989, la première greffe d'îlots réussie chez un patient diabétique a été réalisée, mais l'insulino-indépendance n'a duré qu'un mois compte tenu d'un mauvais traitement immunsupresseur (39). Dans les années suivantes, de nombreuses tentatives ont été réalisées sans grand succès (insulino-indépendance à 1 an de 10%). Par contre après l'introduction en 2000 du protocole d'Edmonton (nombre d'îlots équivalents >10000/kg et traitement immunsupresseur sans corticoïdes) (40), la greffe d'îlots a connu un essor non négligeable faisant de cette thérapie une option viable pour le

traitement du diabète de type 1. Les résultats attestent de 36% de patients insulino-indépendants 2 ans après la greffe (41).

1.3.4.4.2.2 Sélection du receveur

Les critères d'inclusion et exclusion du receveur sont listés dans le tableau 1.

Critères d'inclusion	Critères d'exclusion
Diabète de type 1 avec 5 ans de dépendance à l'insuline	IMC >30kg/m² ou poids <50kg
Peptide C simulé négatif (<0,3ng/mL)	HbA1c >10%
Gestion intensive du diabète (contrôle de la glycémie ≥ 3/jour ; insuline ≥3 injection/jour ou pompe à insuline)	Rétinopathie diabétique progressive non traitée
Hypoglycémies sévère avec perte de conscience	Hypertension artérielle
Instabilité glycémique marquée	Fonction rénale et/ou hépatique altérée
	Maladie cardiaque co-existante
	Trouble de l'hémostase/hémodynamique
	Grossesse/allaitement
	Traitements actuel satisfaisant

Tableau 1 : Critères d'éligibilité et d'exclusion des patients pour une transplantation d'îlots

Developpés en partie par le NIH Clinical Islet Transplantation Consortium. D'après (42, 43).

1.3.4.4.2.3 Sélection du donneur

De nombreux critères entrent en compte dans la sélection du donneur et plus précisément du pancréas « donneur » d'îlots, comme par exemple, l'âge, l'IMC et le temps d'ischémie froide. L'âge du donneur doit idéalement être compris entre 51 et 65 ans, tranche d'âge permettant l'isolement du plus grand nombre d'îlots (rendement de 83%). La tranche 19-28 ans par exemple permet seulement d'obtenir un rendement de 37% (44).

Les critères d'exclusion sont la présence d'un diabète de type 1 avec une HbA1c >6.5% et une forte hyperglycémie, ou la présence d'un diabète de type 2.

L'organe peut ensuite être refusé après prélèvement si le temps d'ischémie froide (dans le liquide de conservation) excède 12h. En effet, une ischémie froide prolongée est associée avec un plus faible rendement d'isolement (44).

L'IMC du donneur aussi est à prendre en compte. En effet, plus l'IMC est élevé, plus le rendement d'îlots est favorable (45). En revanche, la possibilité d'un pré-diabète (type 2) n'est pas à écarter et peut compromettre la fonction future des îlots. Un autre paramètre concerne le nombre et le temps d'arrêt cardiaque du donneur, endommageant les organes. Et enfin, l'expérience du chirurgien préleveur est un facteur déterminant, puisque seul un pancréas intact pourra être utilisé correctement à des fins d'isolement d'îlots (46).

1.3.4.4.2.4 Procédure

Prélèvement et conservation

La technique commence par prélèvement du pancréas du donneur. Celle-ci comprend une chirurgie complexe et une manipulation minimale du pancréas, l'organe est ensuite refroidi, placé dans une solution de conservation puis transporté au laboratoire d'isolement d'îlots.

Préparation et digestion du pancréas

Cette phase permet la séparation des îlots du reste du parenchyme pancréatique. Elle est réalisée par la combinaison d'une technique enzymatique et mécanique. Dans un premier temps, l'excédent de gras est retiré en veillant à ne pas abimer la capsule pancréatique. Le canal cholédoque est ensuite canulé grâce à un cathéter permettant la distension du pancréas avec de la collagénase, enzyme qui va servir à la dissociation îlot-exocrine (Fig. 27A). Après injection de l'enzyme, le pancréas distendu est coupé en plusieurs morceaux et placé dans la chambre de Ricordi (47). Jusqu'à cette étape, l'ensemble de la procédure est réalisée à 4°C. Cette chambre est reliée à un circuit fermé dans lequel circule un milieu chauffé à 37°C, elle contient des billes servant à la dissociation mécanique du pancréas ainsi qu'un tamis (Fig. 27B). Pendant le processus de digestion, la température est contrôlée et des biopsies sont prises régulièrement pour permettre un suivi de la digestion. Ces biopsies sont marquées à la dithizone (Fig. 27C) (marqueur du zinc, présent dans les vésicules à insuline des cellules β) pour pouvoir suivre la sortie des îlots de l'exocrine. Lorsque la plupart

des îlots se retrouvent libres, le processus de digestion doit être arrêté pour éviter leur destruction par la collagénase. De ce fait le suivi de digestion est un élément déterminant pour la suite du processus.

Purification des îlots

Après dissociation des îlots du tissu exocrine, les deux composantes doivent être séparés. Cette étape est basée sur la différence de densité existant entre les îlots et l'exocrine. Le digestat est alors centrifugé grâce à une COBE 2991 sur un gradient de polysaccharide (Ficoll) et d'UW. brièvement, les gradients de densité sont introduits dans le sac de la centrifugeuse COBE, du plus au moins dense, puis le digestat est ensuite chargé sur le gradient. Après centrifugation, le sac est vidé par phases collectées dans différents tubes. Le contenu de chaque tube est ensuite évalué par marquage à la dithizone. Les fractions les plus pures sont mises en commun et les îlots sont ensuite comptés.

Le comptage est réalisé en îlots équivalents (IEQs) ou 1 IEQ représente un îlot de 150 μ m de diamètre. Une coloration de Gram permet la détection de potentielles contaminations bactériennes. La viabilité est ensuite estimée grâce à un marquage à la fluorescéine di-acétate et à l'iodure de propidium (FDA/PI ; la FDA dégradé par les estérases en fluorescéine marque les cellules vivantes en vert, le PI intercalant de l'ADN, marque les cellules nécrotiques en rouge, ce dernier pénétrant au travers les membranes lésées). Un test de fonction, test de stimulation au glucose est également réalisé. Les îlots sont ensuite placés en culture jusqu'à la transplantation, afin de préparer les éléments logistiques (préparation du patient, envoi des îlots à un autre centre transplanteur).

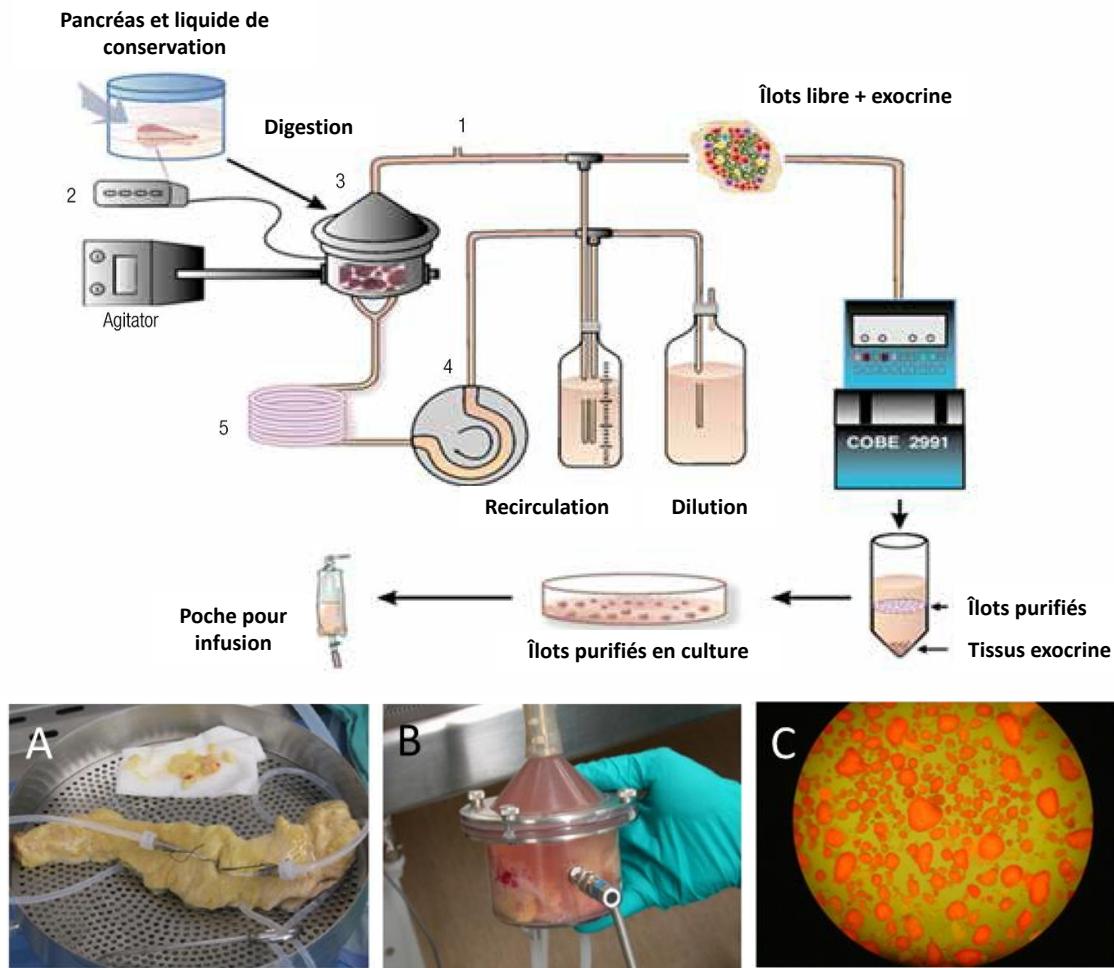


Figure 27 : Schéma du circuit permettant l'isolement d'îlots pancréatiques et photographies de différentes étapes Pancréas après canulation et avant distension par la collagénase (A), Pancréas découpé et placé dans la chambre de Ricordi (B), îlots purifiés marqués à la dithizone (C). D'après (48) et (49).

Transplantation des îlots

Les îlots purifiés sont ensuite greffés dans le foie via la veine porte (Fig. 28). Deux approches permettent l'accès à la veine porte : une laparotomie ou une approche percutanée réalisée sous radiographie. La deuxième approche est privilégiée de par son invasivité minimale, elle peut être facilement réalisée sous anesthésie locale. Avant greffe, de l'héparine est ajoutée à raison de 70U/kg à la préparation d'îlots pour minimiser le risque de thrombose veineuse. Lorsque la canule est introduite dans la veine porte, les îlots sont infusés sous le seul effet de la gravité tandis que la pression intra-portale est mesurée pour éviter toute surpression. Si l'approche percutanée n'est pas réalisable, c'est la veine mésentérique qui est canulée après

laparotomie et la suite de la procédure reste la même. Afin d'obtenir un nombre suffisant d'îlots à greffer, il est parfois possible de combiner les îlots de deux pancréas avant infusion, mais le plus souvent, plusieurs infusions sont nécessaires (entre 2 et 3 en moyenne) afin d'obtenir l'insulino-indépendance du patient.

Après transplantation, pour minimiser le stress enduré par les îlots fraîchement transplantés, un contrôle strict de la glycémie est réalisé grâce à l'insuline. Il est connu que les îlots s'intègrent mieux et sont plus rapidement fonctionnels s'ils sont placés dans un environnement euglycémique (50).

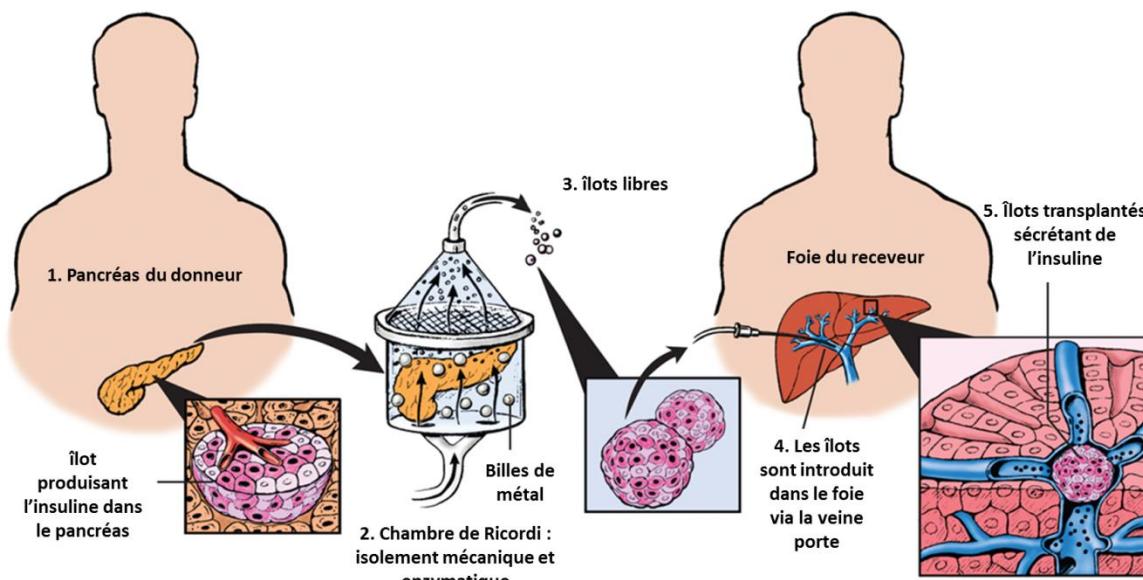


Figure 28 : Transplantation d'îlots, du donneur au receveur

D'après : <http://www.diabetesresearch.org/video-and-image-library>

1.3.4.4.2.5 Immunosuppression

Au départ, les corticoïdes étaient les composants majeurs du traitement immunosupresseur. Cependant, étant reconnus pour être eux-mêmes diabétogènes, ils entraînaient une perte rapide des îlots post-transplantation ce qui explique en partie le faible taux de succès des greffes avant les années 2000. Le protocole d'Edmonton mis en

place une immunosuppression sans stéroïde comprenant le daclizumab, ou d'autres agents dépleteurs des cellules T comme la thymoglobuline (globuline anti-thymocytes), le basiliximab ou encore l'alemtuzumab (un anti CD52). L'induction est combinée au sirolimus et au tacrolimus à faible dose pour le maintien de l'immunosuppression. Dans certains centres, le sirolimus est remplacé par le mycophénolate mofétil (MMF), mieux toléré par les patients.

1.3.4.4.2.6 Résultats et survie du greffon

Le but ultime de la transplantation est le retour à un contrôle glycémique (Fig. 29) permettant de s'affranchir d'apport d'insuline exogène. Cependant, les études cliniques ont pu montrer qu'une fonction même partielle de la greffe, permet aux patients d'améliorer considérablement leur qualité de vie en réduisant de manière significative les hypoglycémies. Le protocole original d'Edmonton a montré d'excellents résultats à 1 an (100% des patients insulino-indépendants) (40). Il s'avère en revanche que 6 ans après la greffe, seulement 10% des patients étaient toujours insulino-indépendants même si 80% présentaient un peptide C positif et un bon contrôle glycémique ($\text{HbA1c} < 7,5\%$) (51) (Fig. 30A). L'avantage majeur de la greffe est de pallier aux hypoglycémies sévères observées avec l'injection d'insuline, même après la perte de l'insulino-indépendance (Fig. 30C).

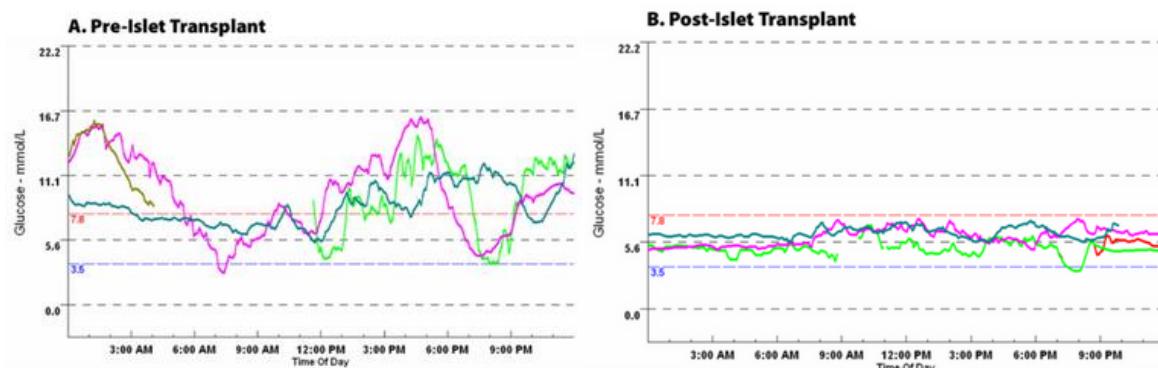


Figure 29 : Mesure de glucose en continu sur un patient pré- et post-transplantation d'ilots

D'après : <http://diabetesmanager.pbworks.com/>

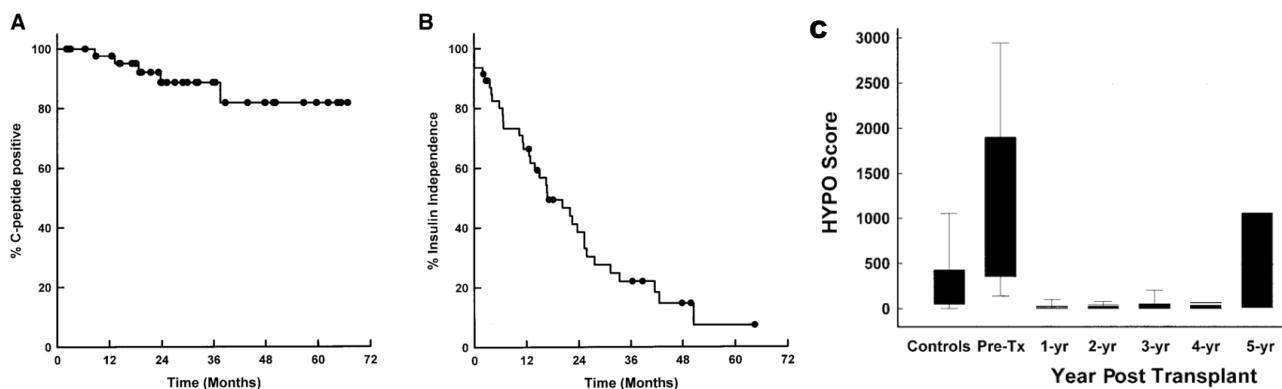


Figure 30 : Résultats de la greffe d'îlots

Après greffe, les patients restent peptide C positif dans 80% des cas au bout de 6 ans (A), par contre une perte progressive de l'insulino-indépendance est observée (B). Malgré tout, le nombre d'hypoglycémies sévères reste contrôlé durant 4 ans (C). D'après (51).

Les résultats actuels sont plutôt encourageants puisque le dernier rapport du CITR (collective islet transplant registry) datant de 2013 reporte plus de 1800 greffes réalisées entre 1999 et 2012 dans les centres Européens et Australiens. En ajoutant les données des centres Nord-Américains, le nombre de greffes passe à plus de 3700 (Fig. 31), parmi lesquelles, 27% des receveurs sont toujours insulino-indépendants 3 ans après la dernière infusion, et 80% restent peptide C positifs (52).

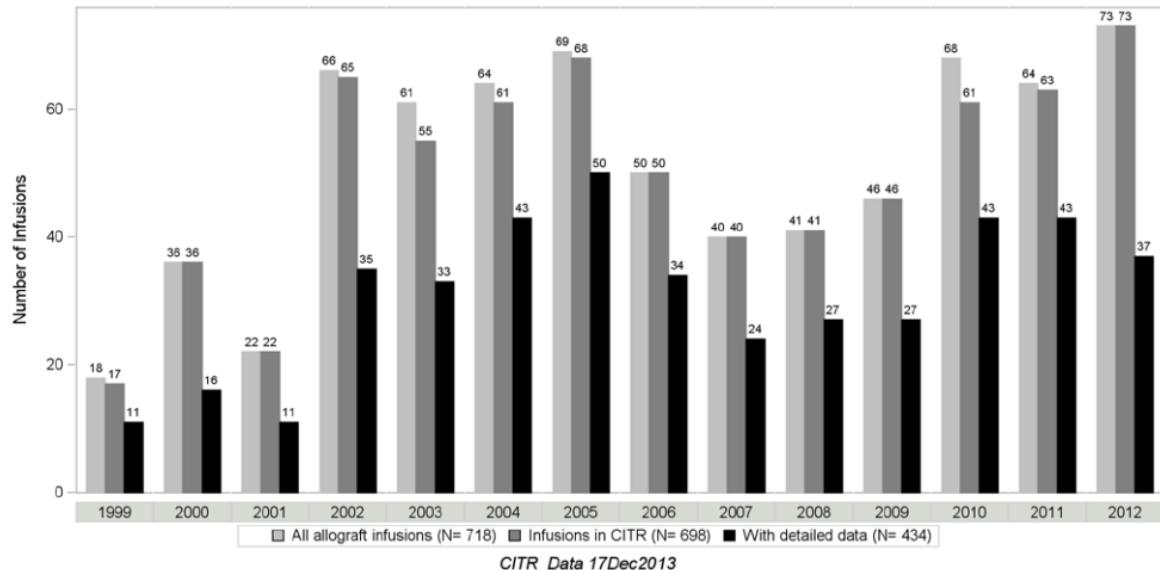


Figure 31 : Nombre de transplantations d'îlots réalisées dans les centres Européens et Australiens

Le groupe d'Edmonton a présenté un suivi de 5 ans où les résultats dépassent les 50% d'insulino-indépendance à 3 ans, en utilisant l'alemtuzumab au moment de l'induction de l'immunosuppression. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus avec la transplantation de pancréas entier, sans les risques liés à cette chirurgie.

1.3.4.4.2.7 Complications

Les deux complications majeures concernent les hémorragies (8% des cas) et la thrombose de la veine porte (5% des cas) (53), mais celles-ci sont facilement contrôlables en ajustant correctement le traitement anticoagulant du receveur. La surveillance des hémorragies est réalisée par ultrasonographie 1 jour et 1 semaine après l'infusion (41). Généralement, le patient est renvoyé chez lui avec un traitement anticoagulant (aspirine et enoxaparin) 1 à 2 jour après greffe (54). Un autre risque concerne la lyse précoce des îlots fraîchement infusés, qui en libérant une quantité massive d'insuline, peuvent provoquer des hypoglycémies.

1.3.4.4.2.8 Conclusion

La greffe d'îlots a prouvé son potentiel à stabiliser de façon efficace la glycémie des patients transplantés ainsi que son efficacité face à la survenue d'épisodes d'hypoglycémies sévères. Cette thérapie a donc totalement sa place dans l'arsenal thérapeutique du diabétique de type 1. En revanche, les faibles bénéfices à long terme se présentent comme un frein à l'expansion de la méthode. En effet, bien que les résultats à court terme soient excellents, les greffes ne restent que rarement fonctionnelles après 3 ans. De plus, pour obtenir l'insulino-indépendance, plusieurs infusions sont nécessaires ce qui nécessite donc plusieurs donneurs de pancréas. La pénurie d'organes est donc un autre des facteurs limitant l'expansion de cette thérapie à un plus grand nombre de patients.

Théoriquement, un pancréas pourrait fournir assez d'îlots pour traiter au moins 2 patients diabétiques. Pratiquement, l'insulino-indépendance n'est obtenue qu'après la réalisation de plusieurs infusions d'îlots provenant de multiples pancréas de donneurs. Le faible nombre d'îlots disponible s'explique notamment par les problématiques auxquelles font face les îlots

dans les différentes phases de la procédure de transplantation, de leur isolement à leur implantation.

1.4 Problématiques de la greffe d'îlots

Les problématiques de la greffe d'îlots sont diverses et émanent des différentes phases du processus d'isolement-transplantation. En effet, après isolement, les îlots sont exposés à divers stress conduisant à la mort cellulaire. L'apport insuffisant en oxygène, qu'est l'hypoxie, ainsi que l'absence de contact avec la MEC appelée anoikis sont les principaux responsables de la perte d'îlots en culture. Lors de la transplantation intraportale, des phénomènes d'inflammation aigüe mettent en péril la survie des îlots pancréatiques greffés, de même que l'environnement diabétique qui ne favorise pas l'implantation et la survie des îlots (Fig. 32).

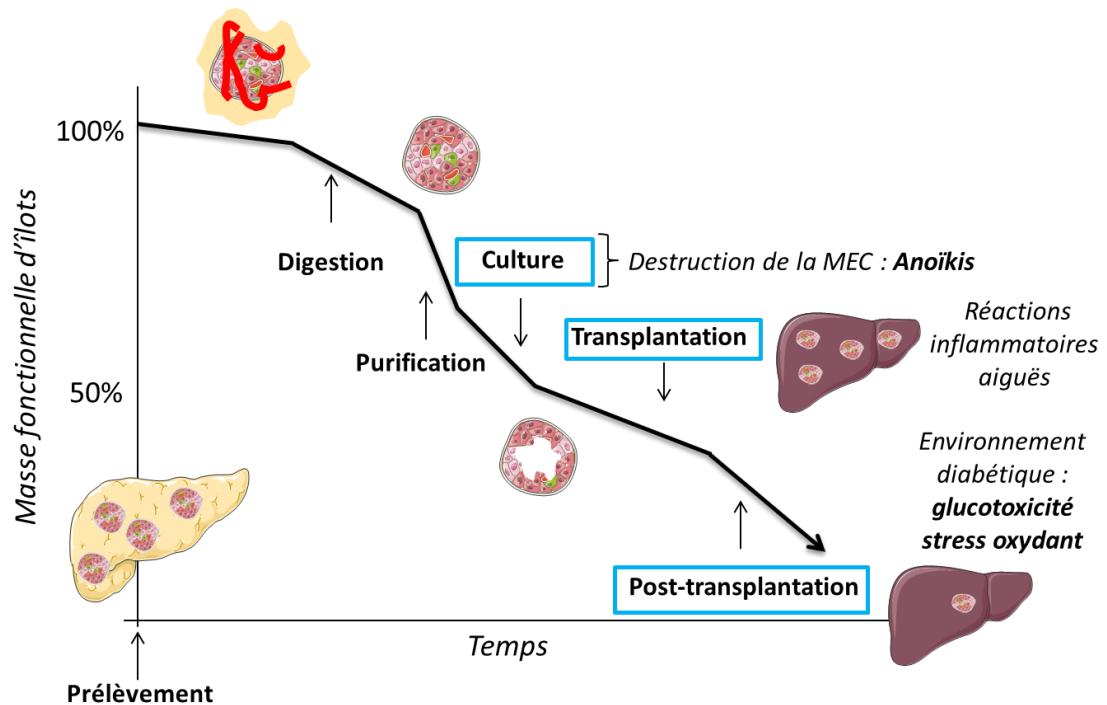


Figure 32 : Diminution du nombre d'îlots fonctionnels au cours du processus d'isolement-transplantation

Le nombre d'îlots décline tout au long du processus de greffe. Dès lors que les îlots sont extraits du pancréas, la phase de culture engendre la perte de 50% des îlots fonctionnels. Lors de la transplantation de ces amas cellulaires en intra-hépatique, des réactions inflammatoires aiguës détruisent 50% des îlots restants. A long terme, la fonction de la greffe est amenée à décliner notamment à cause de l'environnement diabétique et au site receveur, non optimal pour la survie des îlots pancréatiques. Adapté de (55).

1.4.1 Problématiques liées à l'isolement

Lors de l'isolement des îlots du reste du parenchyme pancréatique, toutes les connexions entre les deux entités sont rompues et deux phénomènes majeurs sont alors observés.

1.4.1.1 Anoïkis

Dans les tissus, les cellules réalisent la plupart de leurs processus vitaux via un réseau de protéines et polysaccharides : la matrice extracellulaire (MEC). La MEC est responsable de la transmission de nombreux signaux chimiques et mécaniques qui médient les aspects clés de la physiologie cellulaire comme l'adhésion, la migration, la prolifération, la différentiation et la mort (56). Les intégrines, récepteurs transmembranaires composés de 2 sous-unités α_n et β_n (Fig. 33), sont le pont entre la MEC et les cellules. L'attachement de la MEC aux intégrines régule l'homéostasie cellulaire par différents moyens : via le cytosquelette (notamment les filaments d'actine), ou encore via les cascades intracellulaires de transduction de signal. La rupture de ce raccordement à la matrice extracellulaire a des effets délétères sur la survie des cellules. Il mène à un type spécifique d'apoptose connu sous le nom d'anoïkis. En résumé, la cellule qui n'est plus à sa place originelle va s'autodétruire. Ce terme est également trouvé sous la dénomination anglaise de « *homelessness cell* ».

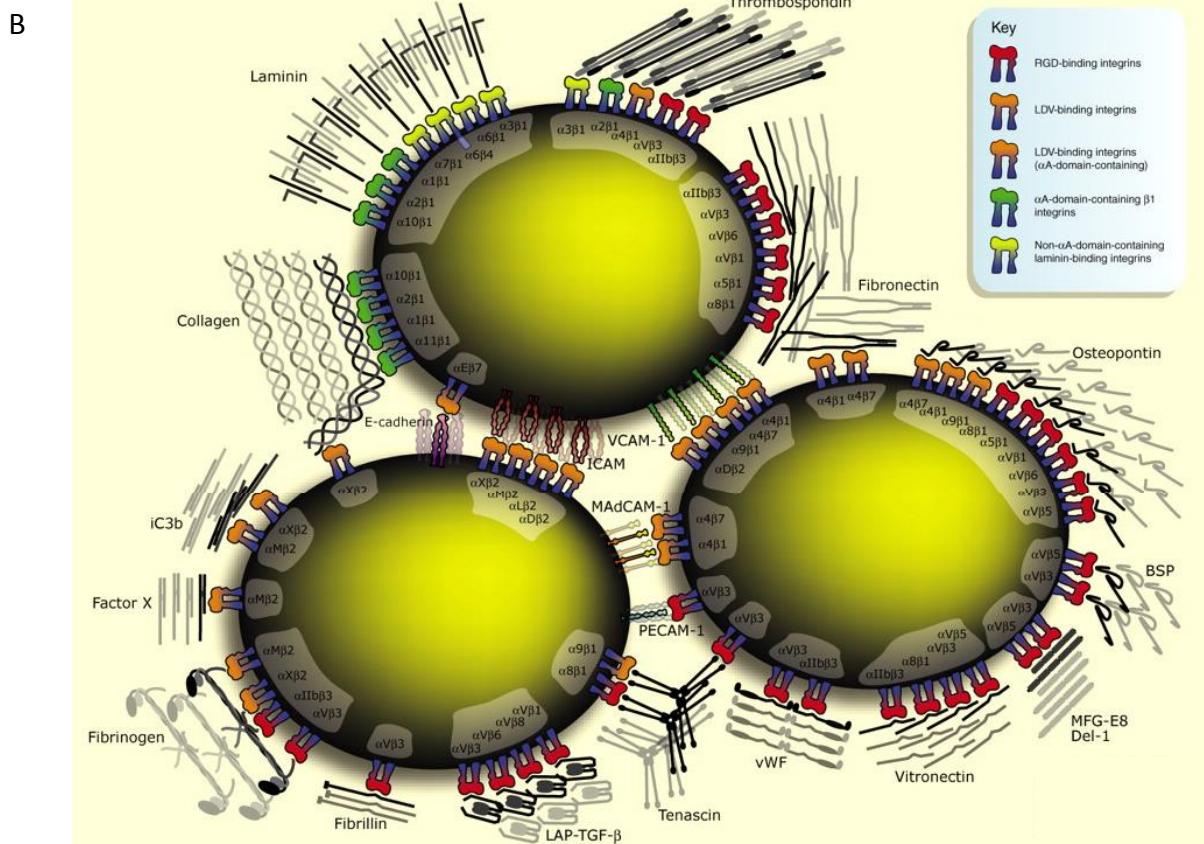
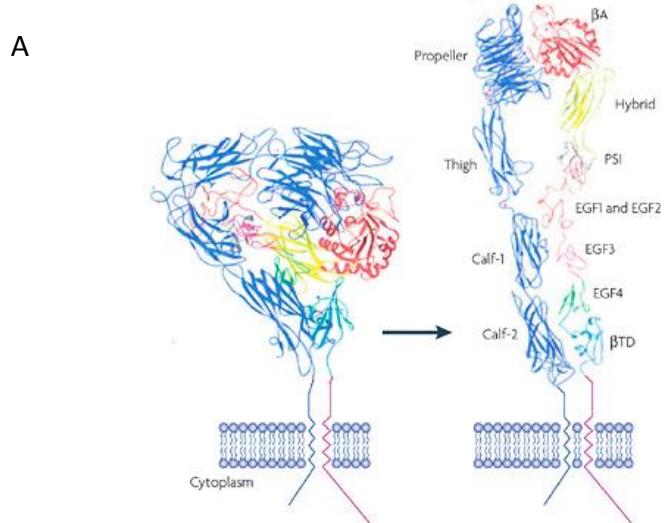


Figure 33 : Structure des intégrines (A) forme inactive (droite) et active (gauche) ; ligands des intégrines (B)

Les intégrines sont constituées de deux sous-unités : la chaîne α qui fixe des cations divalents et la chaîne β qui possède un domaine riche en cystéine. On peut différencier trois domaines : l'un extracellulaire (extrémité N-terminale), l'un transmembranaire et le dernier intracellulaire (en C-terminal) (A) (57). Actuellement 18 sous-unités α et 8 sous-unités β différentes sont connues, et leur combinaison détermine la spécificité de l'intégrine au ligand. À ce jour, 24 dimères $\alpha\beta$ fonctionnels sont connus (B) (58).

Physiologiquement, les intégrines reconnaissent et sont liées à des motifs de la MEC, de type RGD (Arginine-Glycine-Acidé Aspartique) ou LDV (Leucine-Acidé Aspartique-Valine) contenus dans les molécules comme le collagène, la laminine, ou encore la fibronectine. Lorsque cette liaison est effective, deux voies de signalisation intracellulaire principales sont activées : la voie des MAPK, ainsi que la voie PI3K/Akt. L'activation de ces voies a comme effet majeur une activation de la survie cellulaire et une répression de l'apoptose. Une autre voie annexe mettant en jeu le cytosquelette des cellules permet elle aussi d'inhiber l'anoïkis, via la création de points focaux d'adhésion permettant la séquestration des régulateurs positifs de l'apoptose qui sont Bmf et Bim et donc d'empêcher leur action. L'ensemble de cette voie de signalisation est résumée sur la figure 34.

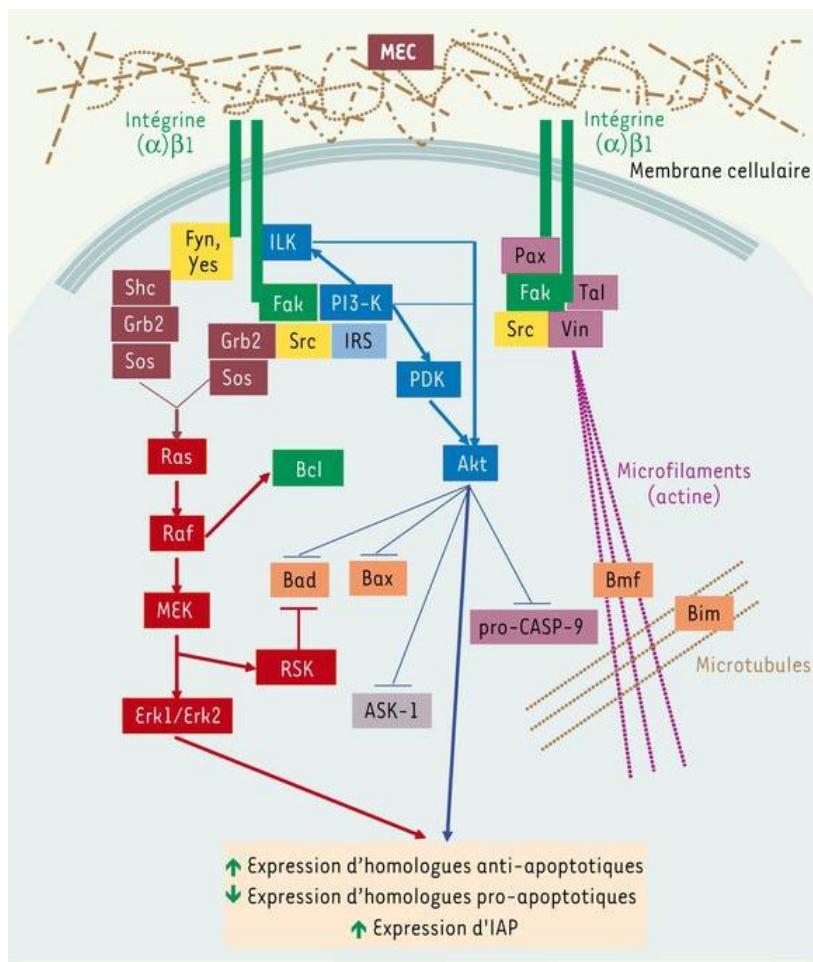


Figure 34 : Signalisation intégrines β_1 -Fak, survie cellulaire et suppression de l'anoïkis.

La liaison d'une intégrine $(\alpha_n) \beta 1$ à son ligand de la matrice extracellulaire (MEC) permet principalement le recrutement et l'activation de Fak. D'une part, Fak active la PI3-K directement, ou indirectement via la tyrosine kinase Src ou une IRS, menant à l'activation d'Akt. Akt peut également être activé via l'ILK. Akt activé phosphoryle les homologues Bcl-2 pro-apoptotiques Bad et Bax pour les inhiber, en plus de phosphoryler la pro-CASP-9 pour renforcer son état inactif. Akt phosphoryle également la kinase pro-apoptotique ASK-1, afin de l'inhiber. D'autre part, Fak peut recruter Grb2-Sos directement, ou indirectement via Src, pour mener à l'activation de la petite GTPase Ras et ainsi stimuler la voie Raf-MEK/Erk. Cette dernière voie peut également être stimulée par certaines sous-unités α partenaires de $\beta 1$, via le recrutement/activation de Fyn ou de Yes, deux autres membres de la famille Src, et leur recrutement subséquent de Shc-Grb2-Sos. Raf phosphoryle l'homologue anti-apoptotique Bcl-2 pour le stabiliser, tandis que RSK-1, un effecteur de la voie MEK/Erk, phosphoryle Bad pour l'inhiber. Dans tous les cas, la stimulation des voies PI3-K/Akt et MEK/Erk produit généralement une régulation d'expression positive des homologues de Bcl-2 (anti-apoptotiques) et d'IAP et une régulation d'expression négative pour les pro-apoptotiques. Alternativement, Fak contribuera au recrutement de la paxilline, de la taline, de la vinculine et de Src pour former les points d'adhésion focaux, en association directe avec les microfilaments d'actine. Cette stabilisation du cytosquelette permet la séquestration des homologues pro-apoptotiques Bmf et Bim et inhibe donc l'apoptose.

ASK-1 : apoptosis signal-regulating kinase-1 ; Erk1/Erk2 : extracellular regulated kinases 1 et 2 ; Fak : focal adhesion kinase ; IAP : inhibitors of apoptosis proteases ; ILK : integrin-linked kinase ; IRS : insulin receptor substrate ; MEK : mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase ; Pax : paxilline ; PDK : PI3-K dependent kinase ; PI3-K : phosphatidylinositol-3- kinase ; pro-CASP-9 : précurseur inactif de la caspase initiatrice CASP-9 ; Tal : taline ; Vin : vinculine. D'après (59).

Il est donc aisément compréhensible que les îlots, retirés de leur environnement naturel qu'est le pancréas, entrent en anoïkis lors de la phase de culture. En effet, les îlots n'étant plus en contact avec la MEC pancréatique, les voies de signalisation associées à la survie ne sont plus activées. De plus, les facteurs pro-apoptotiques que sont Bim et Bmf sont libres d'agir sur la mitochondrie puisqu'ils ne sont plus séquestrés par le réseau formé par le cytosquelette via les points d'adhésion focaux. Il s'en suit une libération de cytochrome-c et une activation des caspases. La cellule entre donc en apoptose. La perte des îlots à cause de ce phénomène est estimée à 40% (55).

1.4.1.2 Hypoxie

L'hypoxie est une condition pathologique dans laquelle le corps où une partie de celui-ci est privé d'un apport adéquat en oxygène. Les cellules peuvent contrer ceci par activation des voies de survie, mais si l'hypoxie est trop importante les phénomènes d'apoptose sont déclenchés. L'hypoxie engage un grand nombre de gènes en régulant des facteurs de transcription comme le facteur 1 α induit par l'hypoxie (hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1) (60) (Fig. 35).

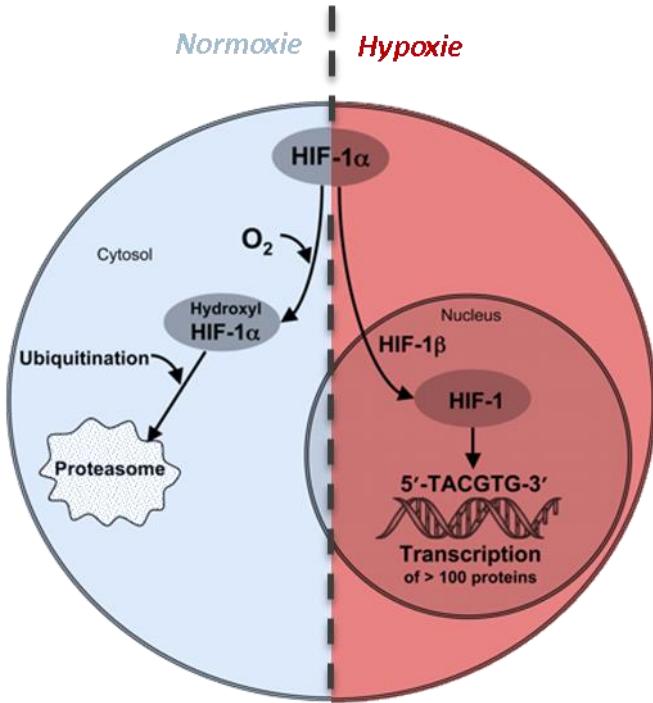


Figure 35 : Normoxie vs. hypoxie, rôle de HIF-1

En normoxie, la sous-unité HIF-1 α est hydroxylée par des prolyl-hydroxylases (PHD), dès sa sortie du noyau, puis liée par la protéine pVHL (von Hippel Lindau protein), ubiquitinilée et dégradée par le protéasome cytoplasmique. En situation d'hypoxie, la sous-unité alpha devient stable, car elle n'est plus hydroxylée par les PHD (son substrat étant l'oxygène), donc elle ne lie plus la protéine pVHL et entre dans le noyau. Elle se dimérise avec HIF-1 β pour former le complexe HIF-1 et permettre la transcription de gènes cibles. En effet, HIF-1 va pouvoir se fixer sur les séquences HRE (hypoxia response elements ou éléments de réponse à l'hypoxie) des promoteurs des gènes cibles comme par exemple l'EPO (Erythropoïétine) ou encore le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Adapté de (61).

In situ, les îlots disposent d'un large apport en oxygène (PO_2 : 40 mmHg) (62) mais pendant la procédure d'isolement, les connexions vasculaires sont interrompues résultant en une diminution des apports en nutriments et oxygène aux cellules. Les cellules β sont connues pour être très sensibles au manque d'oxygène, ce qui est une des principales causes de mort cellulaire après transplantation (63, 64). De récentes études montrent que l'hypoxie peut impacter de façon négative la sensibilité au glucose des îlots et donc diminuer la fonctionnalité des cellules β (65).

1.4.2 Problématiques liées au site receveur

La problématique majeure de la greffe d'îlots chez les patients diabétiques de type 1 est la perte massive de tissus fonctionnels au cours du processus. Malgré le fait que les îlots sont transplantés en excès (10000IEQ/kg), la capacité fonctionnelle de ceux-ci ne correspond qu'à 20% de celle d'une personne non diabétique, indiquant qu'une faible fraction seulement des îlots transplantés s'implantent correctement dans le foie (66). Le site receveur est donc en grande partie responsable de la perte massive d'îlots greffés et ce sous différents aspects.

1.4.3 Re-vascularisation

Les îlots une fois transplantés souffrent encore d'hypoxie puisqu'il faut un temps moyen de 14 jours pour voir apparaître une néo-vascularisation (62). En effet, lors de la transplantation intra-portale, les îlots s'embolisent dans les branches du foie, créant une thrombose et une hypoxie locale empêchant l'oxygène d'accéder non seulement à l'îlot mais aussi à la zone du foie où il s'est implanté. La pression partielle en oxygène du foie est d'environ 20mmHg en moyenne (67) et celle des îlots transplantés en intra-hépatique 5mmHg (62), soit 8 fois moins que dans le pancréas natif. Ainsi, un grand nombre d'îlots vont être détruits à cause d'un manque d'oxygène et de nutriment. Pour limiter au maximum cet impact négatif du manque d'oxygène, les îlots sont implantés directement dans la circulation sanguine, où l'oxygène est transporté, mais cette implantation vasculaire déclenche de fortes réactions inflammatoires.

1.4.4 IBMIR

Pendant l'infusion, le contact entre les îlots et le sang portal induit une réaction thrombotique et inflammatoire appelée "Instant Blood Mediated Inflammatory Reaction" (IBMIR, ou réaction inflammatoire instantanée médiée par le sang). L'IBMIR est caractérisée par une activation rapide de la coagulation et du complément, un recrutement et une infiltration des îlots par les leucocytes plus une adhésion et une activation immédiate des plaquettes. L'intégrité ainsi que la morphologie des îlots est affectée par la formation d'un

thrombus autour des îlots greffés, celui-ci va également attirer les macrophages, qui vont également détruire les îlots greffés (Fig. 36).

Lors de l'activation de la coagulation, l'organisme met en place différents systèmes de régulation permettant de contrôler ce phénomène. L'antithrombine (AT), inactive les serines protéases impliquées dans la coagulation (les facteurs IXa, Xa, XIa, FXIIa et la thrombine). Le complexe thrombine-antithrombine (TAT) est souvent utilisé comme marqueur d'une activation de la coagulation, puisqu'il reflète la génération de thrombine.

Cet effet préjudiciable d'IBMIR est une cause de la perte d'îlots. En effet, même sans signe clinique de thrombose intra-portale, la coagulation se produit dans les grandes branches veineuses du foie, piégeant les îlots et les empêchant d'atteindre les plus petits vaisseaux où ils peuvent s'emboliser et s'implanter correctement. Si l'IBMIR pouvait être efficacement abrogée, plus d'îlots pourraient être greffés avec succès, menant à une réduction du nombre de donneurs requis pour chaque patient (68).

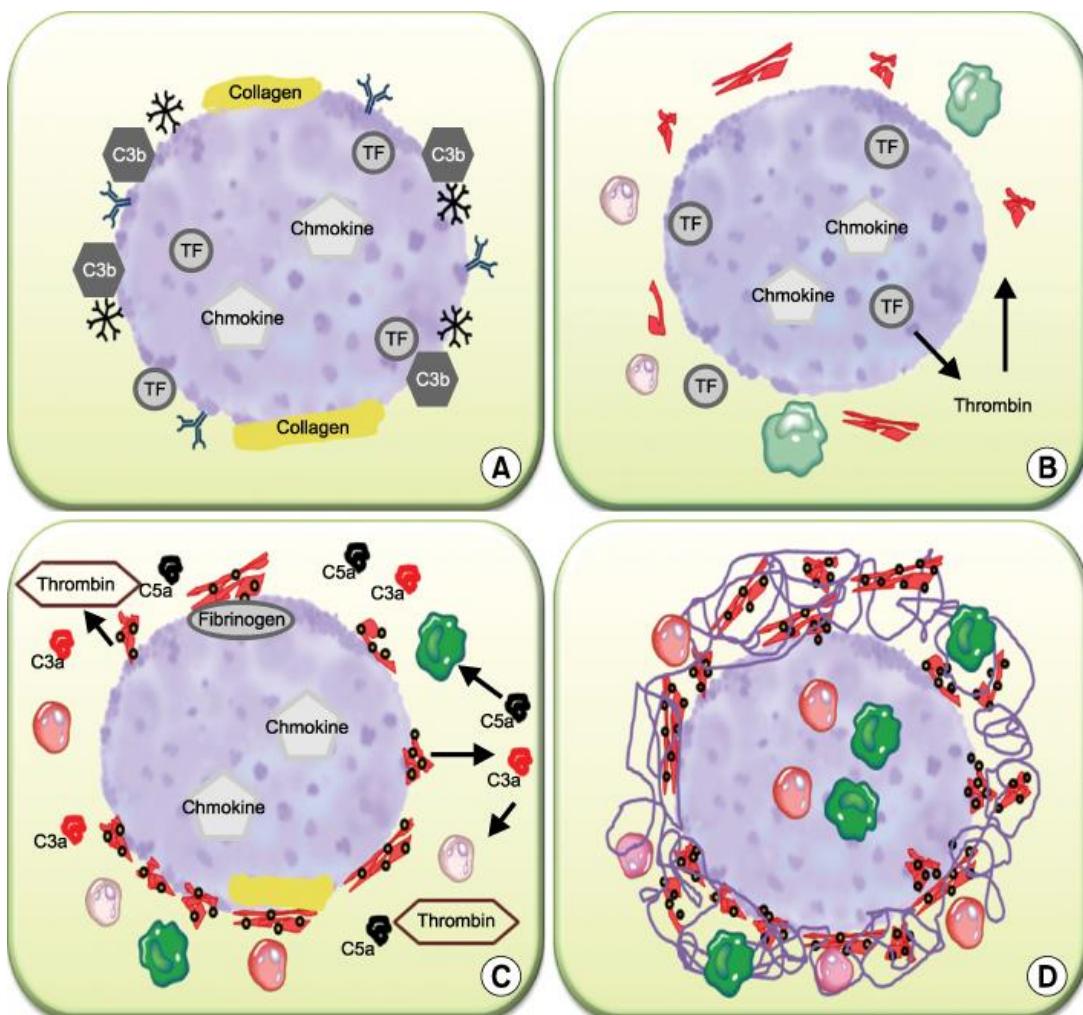


Figure 36 : Instant Blood Mediated Inflammatory Reaction

Modèle d'IBMIR. (A) Lorsque les îlots entrent en contact avec la circulation sanguine, des immunoglobulines (IgG et IgM) vont se lier à la surface de l'îlot et activer le complément, ce qui aura pour effet d'entrainer le dépôt de C3b/iC3b à la surface de l'îlot. (B) Le facteur tissulaire (« Tissue Factor », TF) active la coagulation via la voie extrinsèque ce qui a pour conséquence le clivage de la prothrombine en thrombine, puis le clivage du fibrinogène en fibrine par la thrombine menant à la formation d'un caillot et à l'activation des plaquettes. (C) L'activation des plaquettes augmente l'affinité des intégrines (GPb-IIa et α₂β₁) pour la fibrine et le collagène respectivement ce qui augmente la liaison des plaquettes activées à la surface des îlots. (D) L'activation plaquettaire va induire la production de C3a et C5a, recrutant et activant les monocytes et granulocytes. De plus, amplifiée par l'adhésion plaquettaire, la thrombine génère encore plus de fibrine formant une capsule autour des îlots contenant des plaquettes, des monocytes et des granulocytes. Des facteurs chimiotactiques (MCP-1 et IL-8) sont relargués par les îlots ce qui va avoir pour conséquence l'attraction des monocytes et granulocytes. Ces derniers vont ensuite infiltrer l'îlot et le détruire. Abbréviations: IBMIR, instant blood mediated inflammatory reaction; IL-8, Interleukin-8; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1. D'après (68).

1.4.5 Immunosuppresseurs, détoxicification

Le foie a été choisi comme site receveur de par sa riche vascularisation, sa facilité d'accès via la veine porte, et son respect du premier passage hépatique de l'insuline permettant une clairance de celle-ci avant sa répartition dans l'organisme. En revanche, il est le théâtre de réactions de détoxicification de l'organisme et concentre les traitements immunsupresseurs (69). Les îlots ainsi transplantés sont exposés aux déchets du métabolisme ainsi qu'à une grande concentration d'immunsupresseur et subissent donc des stress multiples. Cet aspect de la transplantation intra-hépatique diminue l'attrait de ce site pour la greffe d'îlots. A ce jour, le foie est le seul organe receveur approuvé en clinique ; il semble donc nécessaire de trouver d'autres sites d'implantation afin de maximiser la fonction des îlots et de limiter l'exposition aux stress de l'organisme.

1.5 Solutions existantes et d'avenir

1.5.1 Lutte contre l'anoïkis : apport de matrices de substitution

Afin de lutter contre l'anoïkis, la mise en place d'une matrice de substitution peut être envisagée. Elle a pour but de remplacer la MEC pancréatique native ou au moins de la mimer. Plusieurs approches existent quant à l'utilisation de support en transplantation d'îlots : des polymères de synthèse aux organes décellularisés en passant par les polymères naturels ou les molécules d'origine biologique. Tous ne possèdent pas les mêmes propriétés en termes d'interactions îlots-matrice. Certains sont en effet volontairement inertes tandis que d'autres apportent aux îlots les points d'ancre nécessaires à leur survie.

1.5.1.1 Les matrices inertes

1.5.1.1.1 PEG-DA (polyéthylène glycol diacrylate)

Le polyéthylène glycol diacrylate (PEG-DA) est un polymère synthétique dérivé du PEG (polyéthylène glycol) avec des unités répétées d'oxyde d'éthylène (Fig.37). Le PEG-DA est un hydrogel largement utilisé dans les applications d'ingénierie tissulaire, puisqu'il présente l'avantage d'être biologiquement inerte. De nombreuses études utilisent le PEG-DA pour

l'encapsulation d'îlots pancréatiques. GM *et al.*, ont montré que l'encapsulation des îlots de porc dans du PEG-DA permet d'améliorer la sécrétion d'insuline en réponse à une stimulation au glucose en comparaison avec des îlots non encapsulés (70). Dong *et al.* ont rapporté que la transplantation sous la capsule rénale de 500-600 IEQ encapsulés dans le PEG-DA permettait la normalisation glycémique de souris diabétiques pendant 110 jours (71).

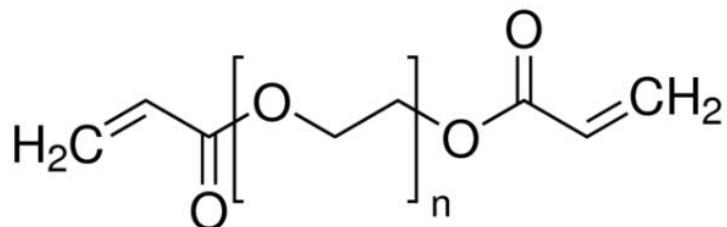


Figure 37 : Structure de la molécule de PEG-DA

<http://www.sigmadralich.com/catalog/product/aldrich/455008?lang=fr®ion=FR>

1.5.1.1.2 Dextran-PEG

Le dextran-PEG est une variante du PEG, mélange d'un polymère synthétique et naturel. Le dextran est tout comme le PEG, hydrophile et neutre. Dans le domaine médical, le dextran-PEG a fait ses preuves notamment pour la bio-ingénierie du cartilage (72).

1.5.1.1.3 Hydroxy-Propyl-Méthyl-Cellulose (HPMC)

L'HPMC, aussi appellée hypromellose dans sa version raccourcie, est un polymère semi-synthétique, inerte et viscoélastique (Fig. 38). Il est souvent utilisé dans l'industrie du médicament comme lubrifiant ophtalmologique ou comme excipient dans les médicaments à libération prolongée. Il est également présent dans l'industrie alimentaire comme additif (propriétés émulsifiantes, épaisseuses entre autres). En médecine, il est utilisé pour la lubrification ophtalmique (73), ou encore comme traitement de surface des dispositifs médicaux (74).

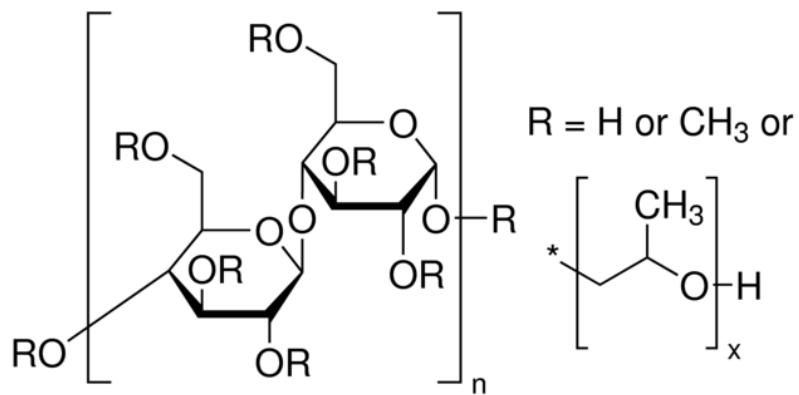


Figure 38 : Structure de l'HPMC

<http://www.sigmadralich.com/catalog/product/sigma/56340?lang=fr®ion=FR>

1.5.1.1.4 Agarose

L'agarose est un polysaccharide naturel isolé à partir d'algues marines. Structurellement, ce polymère linéaire est constitué d'une alternance de motifs D - galactose et de 3,6- anhydro - L- galactose (Fig. 39). Son utilisation principale est faite dans l'industrie agro-alimentaire, comme gélifiant. Il est également utilisé dans l'industrie pharmaceutique pour la libération contrôlée de principes actifs. Sa faible température de gélification (36°C) permet l'utilisation combinée d'agarose et de matériaux vivants comme les cellules. L'encapsulation d'îlots pancréatiques dans des billes d'agarose a permis l'amélioration de la survie et de la fonctionnalité de ceux-ci (75).

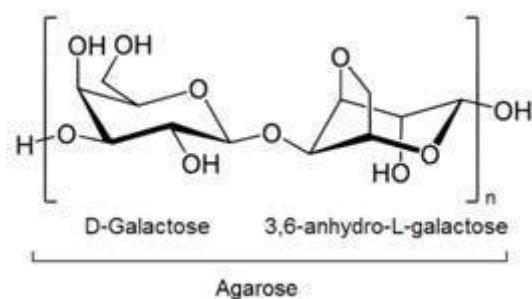


Figure 39 : Structure du polymère d'agarose

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/16500500>

1.5.1.1.5 Alginate

L'alginate est un polysaccharide obtenu à partir d'une famille d'algues brunes (phaeophyta) où il confère à la plante de la force et de la flexibilité. L'alginate est formé de 2 monomères reliés entre eux par une liaison β -1-4 : l'acide mannuronique (M) dont certains sont acétylés et l'acide guluronique (G) (Fig. 40). La proportion et la distribution de ces 2 monomères sont déterminantes dans les propriétés physiques et chimiques de l'alginate. Les alginates sont utilisés comme épaississants, gélifiants, émulsifiants et stabilisants de produits industriels les plus variés depuis les gelées alimentaires, les produits de beauté, jusqu'aux peintures et aux encres d'imprimerie. L'alginate est également utilisé en médecine comme pansement et pour encapsuler des médicaments ou des substances biologiques fragiles. L'alginate est un produit très largement utilisé pour la micro-encapsulation des îlots pancréatiques, de par son inertie et par ses propriétés anti-immunitaires. En effet, l'alginate permet aux îlots encapsulés d'échapper au système immunitaire (76), et permettrait donc la diminution du traitement immunosupresseur. Aussi, la greffe d'îlots encapsulés dans l'alginate a permis une restauration de la normoglycémie chez des souris diabétiques pendant 10 mois (77), et a également prouvé son efficacité chez le singe et le chien (78).

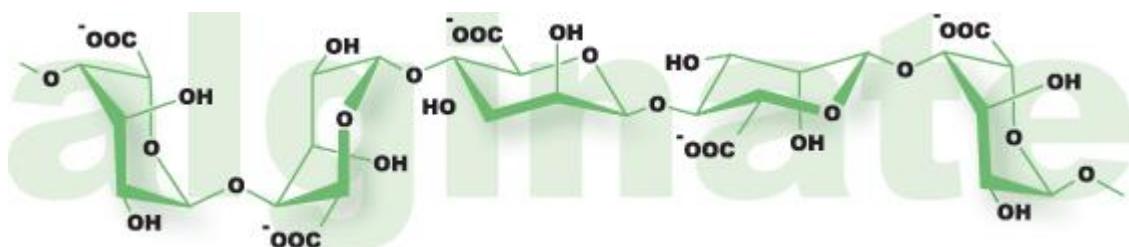


Figure 40 : Structure de l'alginate

<http://www.novamatrix.biz/Technology/Alginate.aspx>

1.5.2 Les matrices actives

1.5.2.1.1 L'acide hyaluronique

L'acide hyaluronique est un glycosaminoglycane (GAG) composant bien connu de la matrice extra-cellulaire (Fig. 41). Polysaccharides de sucre, les GAGs ont pour fonction principale de retenir l'eau dans les tissus et ainsi de les maintenir humidifiés, d'où leur nom de mucopolysaccharides. En effet, ces macromolécules de haut poids moléculaires ne

comportant pas de ramification sont formées d'une répétition de disaccharides contenant toujours une hexoamine (glucosamine ou galactosamine) et d'un autre ose (acide glucuronique, galactose ou acide iduronique). L'acide hyaluronique, seul glycosaminoglycane à ne pas être fixé à une protéine centrale est retrouvé dans le cartilage et la peau. L'acide hyaluronique confère donc des propriétés élastiques et amorti les forces mécaniques au sein des tissus où il est présent (79).

Ses applications biomédicales sont diverses : chirurgie ophtalmique (80), arthrose (81), chirurgie esthétique et réparatrice (82), ou encore comme traitement pour la gorge (83).

Etant lui-même composant de la MEC, son utilisation avec des îlots pourrait être bénéfique.

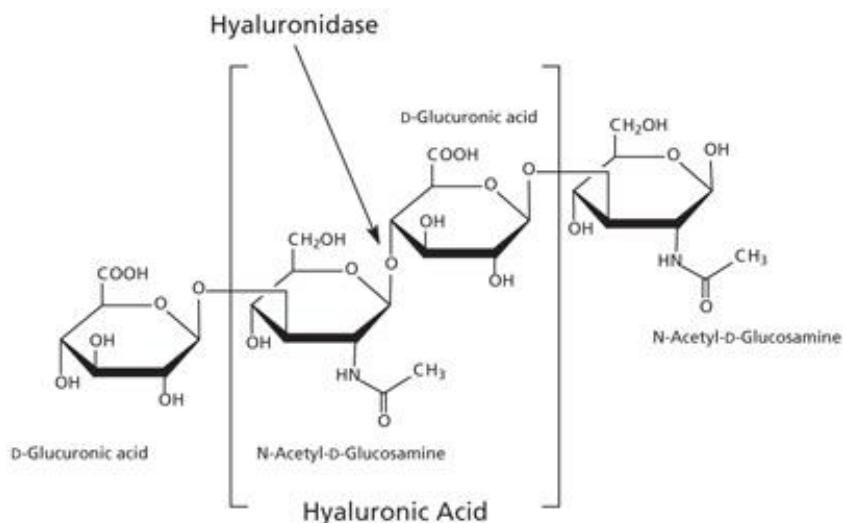


Figure 41 : Structure de l'acide hyaluronique

<http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/glycobiology/glycosaminoglycans-and-proteoglycans.html>

1.5.2.1.2 La fibrine

La fibrine est une protéine filamentuse élastique insoluble issue du clivage du fibrinogène par la thrombine (Fig. 42). Cette protéine agit notamment lors d'une blessure où les molécules de fibrine se disposent de sorte à former un caillot spongieux afin d'arrêter le saignement. Le maillage de fibrine fournit des sites d'ancrage, motif Arg-Gly-Asp (RGD), pour les plaquettes, les fibroblastes, les neutrophiles et les monocytes supportant le processus de cicatrisation. Du côté des vaisseaux, une partie du caillot formé aide à rétablir le flux sanguin normal pendant que l'autre partie au niveau du tissu lésé fournit une MEC transitoire pour la

migration cellulaire. En effet, les cellules interagissent avec la fibrine notamment à travers les intégrines; de ce fait, la fibrine pourrait être considérée comme une MEC de substitution.

Les matrices de fibrine ont démontré leur efficacité quant à la conservation des structures 3D des îlots. Dans ce support, la fonction des îlots est préservée, l'angiogenèse locale est activée, ce qui est essentiel pour l'oxygénation de l'îlot et permet d'augmenter la viabilité cellulaire après transplantation. Maillard *et al.* (84) ont démontré que les matrices de fibrine augmentent la survie des îlots humains par la diminution de l'activation de la caspase 3, une protéase dont l'activation joue un rôle central dans le déclenchement de l'apoptose. En revanche, des phénomènes d'hypoxie sont à déplorer, mais ceux-ci sont facilement abroger par l'utilisation d'un transporteur d' O_2 comme la perfluorodécaline. Le fibrinogène présent naturellement dans le sang, confère à cette matrice la possibilité d'être utilisée en autologue, c'est-à-dire d'utiliser le plasma du receveur pour produire une matrice et fournir des nutriments aux îlots sans déclencher de rejet.

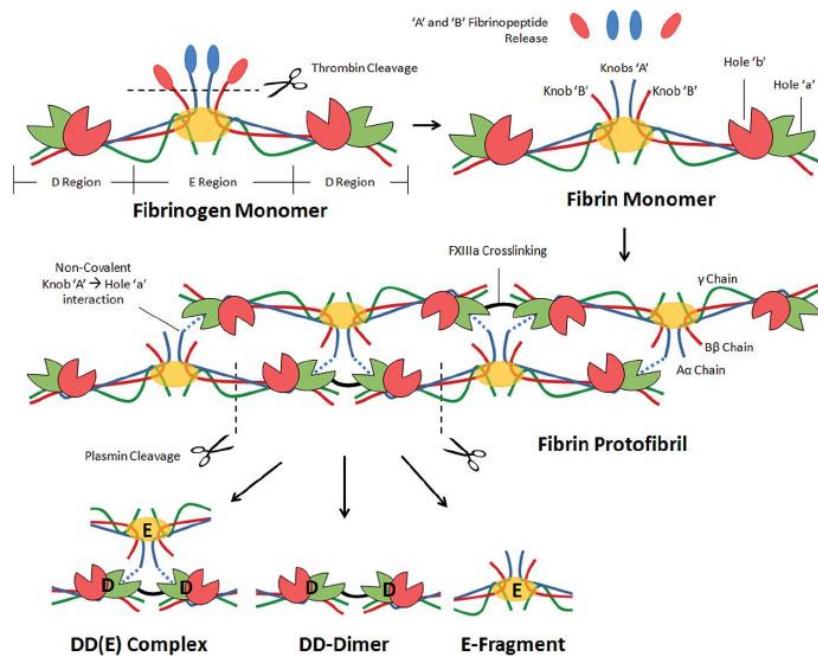


Figure 42 : Polymérisation et clivage de la fibrine

Le fibrinogène est converti en fibrine sous l'action de la thrombine. Les monomères de fibrine ainsi obtenus se polymérisent pour former des protofibrilles de fibrine. La dégradation de la fibrine est effectuée par la plasmine, clivant les protofibrilles en produit de dégradation de la fibrine (PDF)(complexes DD(E), D-dimères, Fragments-E) (85).

1.5.2.1.3 Les organes décellularisés

L'avancée scientifique a récemment permis d'exploiter les avantages de la préservation de la MEC native des organes pour leur utilisation en médecine. Ces organes « fantômes » (Fig. 43) sont vidés de toutes cellules par l'action d'un détergent, permettant la préservation de l'architecture du tissu et donc des réseaux de MEC le composant. Ceux-ci sont ensuite utilisés pour par exemple être recolonisés avec de nouvelles cellules (en transplantation par exemple, l'utilisation de la structure d'un organe donneur peut être recoloniser avec les cellules de receveur), ou encore comme enrichissement des milieux de culture. En prenant l'exemple du pancréas pour la culture des îlots, la MEC native représente une plateforme idéale pour la régénération et l'implantation des cellules, aussi bien sur le plan biochimique que sur le plan géométrique et spatial. En d'autres termes la présence de la MEC au sein des matrices réalisée à partir d'organes décellularisés présente un environnement propice au bien être cellulaire car elle contient toutes les informations indispensables pour la croissance et la fonctionnalité des cellules (86).

Ainsi, des études ont montré que la sécrétion d'insuline des îlots adhérents à la MEC pancréatique décellularisée était constante à long terme *in vitro* et permettait d'obtenir une meilleure réponse des îlots lors d'un test de stimulation au glucose. Il a été rapporté également, que la matrice pancréatique décellularisée était favorable à la viabilité des îlots à long terme (87). La MEC décellularisée peut être utilisée sous différentes formes. Sa composition permet en effet d'obtenir un gel. Sa richesse en collagène facilite son clivage enzymatique et permet de former des matrices de viscosités différentes. Elles ont notamment été utilisées avec succès dans la formation d'hydrogel à partir de myocarde, permettant la régénération du muscle cardiaque après un infarctus (88).

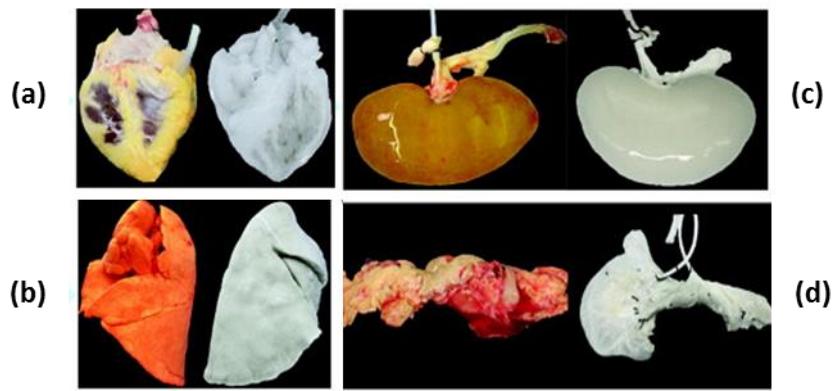


Figure 43 : Organes décellularisés

Photographies d'organes décellularisés. Cœur (a), poumons (b), rein (c) et pancréas (d). D'après (89).

1.5.3 Lutte contre l'IBMIR et l'hypoxie: changement de site receveur

Une solution quant à la réduction voire à l'abolition d'IBMIR est le changement de site receveur. En effet, l'IBMIR est déclenchée quand les îlots entrent en contact avec le sang. Théoriquement, tout site receveur ne nécessitant pas une infusion dans la circulation serait donc potentiellement meilleur que le foie. De nombreux sites receveurs ont déjà été considérés et présentent chacun, des avantages comme des inconvénients. Certains critères sont à considérer dans l'évaluation des sites alternatifs.

Il faut notamment que le site offre un environnement physiologique aux îlots transplantés avec une haute pression partielle en oxygène, un accès à un afflux sanguin, qu'il présente un pH et une clairance des métabolites toxiques adaptée. Il faut évidemment, que les îlots greffés dans ce site soient en mesure de détecter rapidement des variations de glycémie et que l'insuline y soit délivrée en systémique. Un critère important concerne aussi les aspects immunologiques, il faut que le site offre une compatibilité avec les traitements immunsupresseurs actuels, ou qu'il soit immuno-privilégié. La technique chirurgicale se doit également d'être simple et peu invasive dans un nouveau site alternatif. Dans l'idéal il devra présenter moins de problème lié à l'infusion (inflammation en intra-portal) et permettre le cas échéant une nouvelle greffe d'îlots. Aussi, avant d'être utilisé en clinique, les données obtenues sur le petit animal de laboratoire devront être confirmées sur un modèle animal plus large.

1.5.3.1 Le muscle

Le muscle présente une pression partielle en oxygène plus élevée que le foie, et possède une grande capacité de néo-angiogenèse (90). Les îlots greffés dans le muscle présentent une rapide revascularisation, et possèdent alors un afflux sanguin quasi égal au pancréas natif (91). Expérimentalement, les îlots transplantés dans le muscle ont une tolérance au glucose plus élevée que ceux greffés en intra-portal (92). De plus, la procédure est en elle-même très minime puisqu'il s'agit d'une injection directe des îlots dans le muscle. Ce site permet également le contrôle correct du greffon puisque les biopsies y sont faciles à réaliser. En revanche, ce site présente tout de même des inconvénients. L'un des points négatif est la limitation de l'espace de greffe : l'injection d'un trop grand nombre d'îlots n'est pas possible à cause de l'hypoxie. De plus dans ce genre de greffe, une fibrose massive peut être observée aussi bien expérimentalement, que cliniquement (92).

1.5.3.2 La capsule rénale

La capsule rénale est un des sites de choix utilisés sur le modèle murin. La greffe est très facile à réaliser et permet de reverser le diabète en quelques jours. Ce site permet également le retrait de la greffe par néphrectomie et donc le contrôle histologique du greffon sans pour autant tuer l'animal. Chez le rat adulte, seulement 12 à 25% de la masse endocrine totale du pancréas natif est nécessaire pour restaurer une normoglycémie (93). Malheureusement, la capsule rénale possède un faible apport sanguin (15mmHg contre 40 mmHg dans le pancréas) et ne fournit donc pas aux îlots un environnement suffisamment riche. De plus, l'accès chirurgical est très invasif (94) et présente de nombreuses comorbidités. En effet, les receveurs étant diabétique, une forte probabilité de néphropathie diabétique réduit considérablement de la sorte les chances de succès et de survie de la greffe. Ainsi, ce site est réservé à la recherche expérimentale et ne présente pour le moment pas de bénéfice notable à son application clinique.

1.5.3.3 L'omentum

L'omentum est un large tablier graisseux s'étendant de l'estomac aux viscères abdominaux. Il est composé principalement de cellules adipeuses et possède une riche vascularisation

avec une pression partielle en oxygène allant de 27 à 79 mmHg suivant les vaisseaux (capillaires sanguins : 33mmHg) (95). Ce site a été considéré comme potentiel site receveur depuis plus de 40 ans (96) : il présente l'avantage d'être immunoprivilégié (96) et pro-angiogénique, mais possède aussi la capacité dans certaines conditions de produire des cellules sécrétrices d'insuline (97, 98). L'omentum sert aussi beaucoup en chirurgie reconstructrice, de par sa capacité à faciliter la cicatrisation, la croissance et la régénération des tissus (99). Son drainage porte permet de respecter la sécrétion physiologique d'insuline, un avantage considérable (100). Sa large surface permettrait aussi la greffe de préparations d'îlots moins pures (avec plus d'exocrine, mais sans génération d'hypoxie et de confinement et donc de limiter les pertes dues à la purification) ou encore, la co-transplantation avec d'autres cellules ou support de culture (encapsulation).

Son retrait possible sans porter atteinte à la survie du receveur permet l'explantation sur des protocoles de recherche expérimentale ainsi qu'en clinique en cas de complications (101). En revanche, il est décrit dans la littérature qu'un large nombre d'îlots est nécessaire pour réverser un diabète dans l'omentum (101), mais des études prouvent que la fonction à long terme semble préservée (102) et des essais cliniques sont aujourd'hui en cours notamment aux Etats-unis (essai clinique n° NCT02213003, phase de recrutement) et en Belgique (n° essai clinique NCT00798785, phase de recrutement).

1.5.3.4 Les autres sites receveurs

Dans un modèle de souris syngénique, les îlots transplantés dans la moelle osseuse du fémur sont capables de réverser l'hyperglycémie sans perturber l'équilibre du système hématopoïétique (103).

Lors d'une greffe dans l'espace submucosal gastrique, les îlots bénéficient d'un large afflux sanguin et d'une forte pression partielle en oxygène. Les tests précliniques sur le modèle porcin montrent une perte précoce des îlots réduits et des besoins en insuline diminués en comparaison à une transplantation intra-portale (104, 105).

Le site sous-cutané paraît être un candidat idéal pour la greffe d'îlots ; il est facilement accessible, s'étend sur une large surface et permet le contrôle de la greffe via des biopsies.

Malheureusement, les résultats des greffes sous-cutanées sont plutôt décevants (106). Les raisons de cet échec résident principalement dans la faible revascularisation des îlots greffés. Certaines équipes développent des moyens permettant la préparation d'un site receveur suffisamment vascularisé avec ou sans dispositif médical (107).

Le pancréas semble être un candidat logique à l'implantation des îlots pancréatiques, mais de façon surprenante, il est l'un des moins investigué. Des études réalisées sur le rat et le chien ont montré que la survie de la greffe était bonne, avec une inflammation et une fibrose minime (108). En revanche, la possible survenue d'une pancréatite aiguë, ainsi que la toxicité des sécrétions exocrines présentent au sein même de l'organe n'en font pas un candidat viable (109).

D'autres sites receveurs ont également été testés comme le cerveau (110), le thymus (111), ainsi que les testicules (112) (immuno-privilégiés), ou encore la rate (113). Les résultats obtenus à ce jour ne permettent pas leur transposition en clinique.

Les sites receveurs ayant déjà été testés sont résumés sur la figure 44.

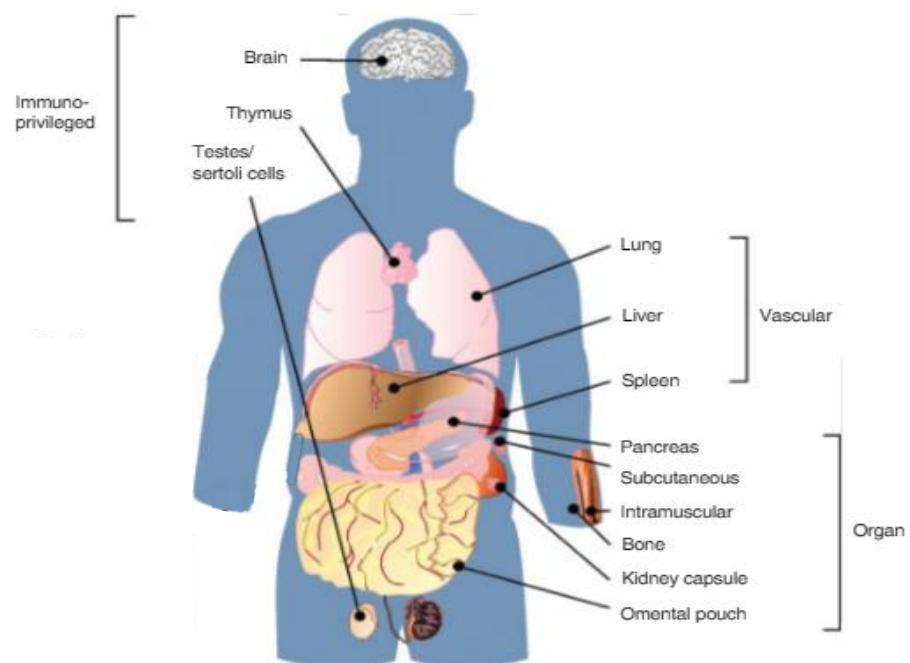


Figure 44 : Sites receveurs expérimentaux et cliniques de greffe d'îlots pancréatiques

Adapté de (94)

2 Résumé de la problématique et objectifs

Lors du processus de greffe, les îlots pancréatiques subissent donc des stress induisant la diminution massive de leur nombre et menaçant leur survie pré-, per- et post-greffé. L'une des principales causes est le manque de contact avec la matrice native du pancréas, d'où ils sont extraits afin d'être transplantés. D'autre part, l'environnement où ils sont placés par la suite, le site receveur de la greffe, joue également un rôle très important dans le maintien de la greffe. Cette thèse a pour objectif de trouver une condition de culture et un lieu d'implantation optimisés pour les îlots.

Pour se faire, cette étude est divisée en trois grandes parties :

- 1) La caractérisation et la validation *in vitro* et *in vivo* d'un biomatériau de référence ayant déjà fait ses preuves *in vitro* sur des îlots humains (forme commerciale) : le plasma.
- 2) Le screening *in vitro* d'autres biomatériaux améliorant la survie des îlots pancréatiques.
- 3) La validation *in vivo* de l'efficacité de ces biomatériaux dans l'optimisation de la transplantation d'îlots.

Pour se faire, les biomatériaux devront respecter un certain nombre de critères. Ils devront améliorer la survie des îlots pancréatiques *in vitro*, être transposables facilement *in vivo* (dissolvable pour la transplantation intra-portale par exemple) et permettre un maintien de fonctionnalité de la greffe *in vivo*.

Cette thèse a été réalisée grâce à un financement Franco-Québécois (Alsace Biovalley-Région Alsace et Consortium Québécois sur la Découverte du Médicament, CQDM).

3 Matériels et méthodes

3.1 Ethique & animaux

Toutes les expérimentations impliquant des animaux ont été réalisées en accord avec les directives de l'institut national de la santé (Décret 87-848 19/10/1987 modifié par le décret 2001-464 29/03/2001 et 2013-118 01/02/2013). Tous les protocoles ont fait l'objet de saisines approuvées par le ministère de la recherche et le Comité Régional d'Ethique en Matière d'Expérimentation Animale de Strasbourg (CREMEAS) sous le numéro d'autorisation : AL/60/67/02/13.

3.2 Biomatériaux utilisés

Les biomatériaux choisis doivent respecter un cahier des charges défini ils doivent être biocompatibles, empêcher ou limiter les phénomènes d'anoïkis et permettre la greffe d'îlots fonctionnels.

Les biomatériaux utilisés sont listés dans le tableau 2.

Biomatériaux	Rhéologie	Nature	Fonctionnalisation	Photo
Agarose	Gel solide	Inerte	Possible	
Alginate	Gel solide	Inerte	Possible	
HPMC	Gel visqueux	Inerte	Possible	
PEG-DA	Gel solide	Inerte	Possible	
Dextran -PEG	Gel solide	Inerte	Possible	
DCr	Particules	MEC entière	N/A	
Dcp	Particules	MEC entière	N/A	
RGD	Liquide	Agoniste des intégrines	N/A	 <chem>*N[C@@H](CCC(=O)N[C@@H](C*)C(=O)O)C(=O)N[C@@H](C*)C(=O)O</chem>
Acide hyaluronique	Gel visqueux	Composant de la MEC	Possible	
Plasma	Gel solide	Motifs RGD Facteurs de croissance	N/A	

Tableau 2 : Liste des biomatériaux utilisés

HPMC : hydroxy-propyl-méthyl-cellulose, PEG-DA : Polyéthylène glycol di-acrylate, Dextran-PEG : dextran polyéthylène glycol, Dcr : pancréas décellularisé de rat, Dcp : pancréas décellularisé de porc et RGD : Arg-Gly-Asp peptide. N/A : non applicable.

L'HPMC et l'acide hyaluronique sont obtenus grâce à une collaboration avec le Centre de Transfert de Technologie du Mans, CTTM. La technologie de fabrication est confidentielle.

L'agarose, l'alginate, le PEG-DA, le Dcr et le Dcp ont été obtenus en collaboration avec l'université de Sherbrooke (Canada) dans le cadre du projet BIOARTMATRIX.

Le dextran-PEG et dextran-PEG RGD sont des kits destinés à la culture cellulaire et fournis par la société Cellendes (Reutlingen, Allemagne).

La fonctionnalisation est définie comme l'ajout d'un ou plusieurs composants de la MEC (RGD, collagène, fibronectine etc.). Ici, celle-ci est réalisée soit par l'ajout de RGD, soit de plasma liquide dans les biomatériaux.

3.3 Préparation et stabilité des émulsions de PFD

La perfluorodécaline (PFD) (Fig. 45) est un perfluorocarbure (PFC) constitué d'un cycle carboné sur lequel les atomes d'hydrogène sont remplacés par des atomes de fluor plus volumineux. La molécule prend alors une nouvelle conformation et devient très stable car les liaisons carbone-fluor sont très fortes. Les perfluorocarbures sont des liquides incolores et inodores qui possèdent une densité très élevée ($d \approx 2$). L'électronégativité des atomes de fluor confèrent des propriétés chimiques intéressantes aux PFC qui peuvent dissoudre de grandes quantités de gaz comme l' O_2 ou le CO_2 . La solubilité de l' O_2 dans la PDF est de 35,5 mmol/L contre 2,2 mmol/L dans l'eau, et pour le CO_2 125,0 mmol/L contre 57,0 mmol/L (114).

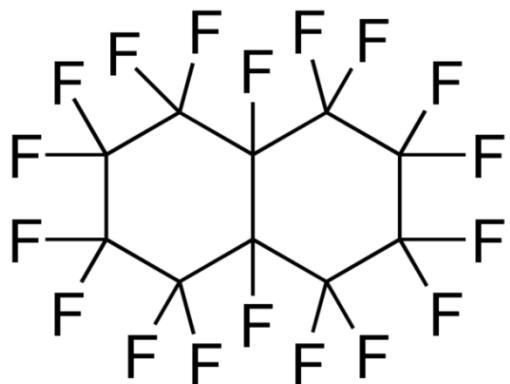


Figure 45 : Structure de la perfluorodécaline

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/ALDRICH/P9900?lang=en®ion=US>

Les perfluorocarbures sont des molécules hydrophobes qui pour être utilisées en culture cellulaire doivent être émulsionnées. Les émulsions de perfluorodécaline (ePFD) sont préparées en mélangeant 0,467mL de EYP (egg yolk phospholipids; Phospholipids, Allemagne), 10mL de M199 et 10mL de PFD (F2Chemicals, Royaume-Uni). La PFD est ajoutée goutte à goutte et homogénéisée avec les autres composants en utilisant le Polytron® (10 min). Les ultrasons sont ensuite utilisés pour réduire la taille des émulsions obtenues (2 x 24sec).

Les tests de stabilité sont réalisés sur 1 mois grâce à un granulomètre (Horiba NanoZS (Horiba, Japan), nous permettant d'obtenir la taille ainsi que l'indice de polydispersité (PDI) de l'émulsion selon le principe de diffusion dynamique de la lumière. L'indice de polydispersité renseigne sur l'homogénéité de l'émulsion, un PDI <0,4 est signe d'une bonne homogénéité.

Jours	Taille moyenne (nm)	PDI
0	216,15±2,47	0,32±0,07
15	215,50±1,19	0,33±0,02
28	210,30±1,17	0,33±0,01

Tableau 3 : Taille et index de polydispersité des émulsions de PFD.

Les résultats obtenus prouvent la stabilité des émulsions sur 1 mois.

Ces données nous permettent d'utiliser la même émulsion pendant un mois. Une fois cette période écoulée, une nouvelle émulsion est réalisée.

3.4 Obtention du plasma de rat

Le plasma a été récupéré sur les rats Wistar pour les études *in vitro* et Lewis pour les études *in vivo*. Après laparotomie, une ponction sanguine est réalisée dans l'aorte thoracique grâce à une aiguille de 23G et une seringue. Le sang est ensuite immédiatement transféré dans des tubes citrates et homogénéisé. Les tubes sont centrifugés 10 min à 4000G, puis le plasma aliquoté et conservé à -80°C jusqu'à utilisation.

3.5 Obtention d'organes décellularisés

Les pancréas de rat sont récupérés sur des rats Wistar (200-500g) au laboratoire. Les pancréas de porc sont récupérés à l'abattoir de Holtzheim (Bas-Rhin). Après prélèvement, les organes sont détaillés en pièces de 0.5cm² environ et plongés dans un bain de Tris-NaCl (10mM Tris-0,5M NaCl, Sigma) la nuit à 4°C sous agitation. Les particules ainsi obtenues sont lavées 3 fois dans des bains de PBS avant d'être immergées dans du SDS à 1% (m/v) (Merk-Millipore, Molsheim, France). Les particules sont laissées sous agitation à température ambiante jusqu'à totale décellularisation (absence de cellules, confirmée par marquage à l'hématoxyline-éosine). La solution de SDS est changée chaque jour ; le processus prend 2 à 7 jours (Fig. 46). Après complète décellularisation, les particules sont rincées plusieurs jours dans du PBS afin d'éliminer toute trace de SDS.

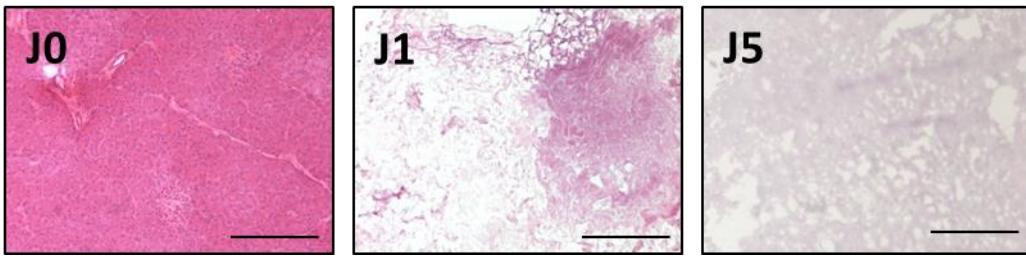


Figure 46 : Décellularisation d'un pancréas de porc

Coloration hématoxyline-éosine de pancréas de porc à différentes étapes de la décellularisation. Avant décellularisation, les tissus sont intègres (J0), après la nuit en Tris-NaCl (J1) et après le SDS, fin de décellularisation (J5).

3.6 Inclusion d'organes

Les organes des animaux sont placés au moment de leur prélèvement dans du paraformaldéhyde (PFA) 4% (m/v) (Sigma), où ils passent 24h minimum à 4°C. S'en suit des étapes de déshydratation comportant des bains d'alcool (2x10min à 70%, 2x30min à 90%, et 3x30 min à 100%) puis de toluène (3x30min). Les organes sont placés dans de la paraffine chauffée à 60°C (3x 20min) et inclus dans des cassettes histologiques (Histomold). Ces cassettes sont mises à refroidir à température ambiante jusqu'à prise de la paraffine. Les blocs contenant les organes sont alors prêts à être détaillés en section au microtome.

3.7 Tests de biocompatibilité des biomatériaux

Des tests de biocompatibilité ont été réalisés pour les différents biomatériaux. Pour se faire, ceux-ci ont été implantés en sous-cutané ou dans l'omentum chez des rats Wistar sains (200-300g). La zone d'implantation est récupérée après 30j, fixée au PFA 4% pendant 24h et inclue en paraffine (selon le protocole d'inclusion détaillé précédemment). Les coupes d'organes sont ensuite colorées au trichrome de Masson. La particularité de cette coloration est de marquer les fibres de collagène en bleu grâce au bleu d'aniline, ce qui permet de mettre en évidence une fibrose.

3.8 Isolement d'îlots pancréatiques de Rat

Les rats utilisés ont un poids corporel variant entre 180 et 250 g. Pour les études *in vitro*, les rats utilisés pour les isolements d'îlots pancréatiques sont des rats Wistar (Elevage Janvier, Le Genest Saint Isle, France). Pour les études *in vivo* les îlots pancréatiques sont isolés à partir de rats Lewis syngéniques (Elevage Janvier). Les rats sont anesthésiés par injection intrapéritonéale d'un mélange Kétamine / Xylazine 2% (Imalgène®, Merial, Lyon, France / Rompun®, Bayer, Puteaux, France) à raison de 100µl/100g de poids corporel. Après laparotomie, le canal cholédoque est dégagé, puis ligaturé à l'embouchure duodénale. Une hémisection est réalisée à l'embouchure hépatique et un cathéter inséré dans le canal dans le sens foie-pancréas. L'animal est ensuite sacrifié par exsanguination puis 10mL de solution de perfusion (0,035% de bicarbonate de sodium (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), 2,35mmol.l⁻¹ de chlorure de calcium (Sigma-Aldrich), 0,025mmol.l⁻¹ d'HEPES (Fisher, Illkirch-Graffenstaden, France) dilués dans de l'HBSS (Hank's Buffer Saline Solution, Fisher)) contenant de la collagénase de Clostridium histolyticum (10mg/mL, type XI, Sigma-Aldrich) sont injectés dans le pancréas via le cathéter. Une fois l'organe correctement dilaté par la solution de perfusion contenant l'enzyme, le prélèvement de l'organe est réalisé. Les pancréas sont conservés à 4°C dans 7,5mL de solution de perfusion contenue dans un tube à centrifuger de 50mL à raison de deux pancréas par tube.

L'étape de digestion est ensuite réalisée durant 10 min à 37°C sous agitation lente au bain-marie afin d'activer l'enzyme permettant de séparer les îlots du reste du pancréas. Après inactivation à froid de l'enzyme à l'aide d'un milieu M199 complet froid (soit 10% SVF (sérum de veau fœtal, Sigma-Aldrich) et 1% d'AB/AM (antibiotique antimycotique) Fisher), le digestat est filtré à travers un filtre de porosité 500µm (Sigma). Le filtrat est transféré dans un tube à centrifuger de 200mL et centrifugé 2min à 1200rpm. Le culot est alors repris dans un tube à centrifuger de 50mL et une nouvelle centrifugation de 2min à 1200rpm est réalisée. Le surnageant est éliminé et une purification sur gradient discontinu de Ficoll (Ficoll®PM 400, Dutscher) est réalisée, pour séparer les îlots du reste du tissu pancréatique. La première densité de Ficoll, soit 12mL de densité 1,108 est utilisée pour resuspendre le culot. La seconde densité, soit 10mL de 1,096 est ensuite délicatement déposée sur la première couche, la troisième densité soit 10mL de 1,069 est ajoutée et enfin 5mL d'HBSS

sont ajoutés pour former la quatrième et dernière densité. Une centrifugation spécifique, sans accélération ni frein est ensuite réalisée : 4min à 400rpm, puis 12min à 2000rpm. Après arrêt complet de la centrifugeuse, les tubes sont récupérés et les îlots visibles aux interphases 2/3 et 3/4 principalement sont collectés dans un tube de 50mL. Plusieurs rinçages sont effectués afin d'éliminer toute trace de Ficoll. A la fin de l'isolement, les îlots sont mis en culture dans un milieu M199 complet à 37°C sous 5% de CO₂.

3.9 Condition de culture des îlots pancréatiques

- **Condition contrôle** : les îlots sont placés dans du milieu M199 (Gibco, Fischer biobloc, Illkirch-Graffenstaden, France) supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal (SVF) (Sigma) et 1% d'antibiotique-antimycotique (AB/AM, Sigma) : milieu complet. Cette condition sera utilisée dans toutes les expériences comme référence.
- **Condition agarose** : l'agarose est dissout dans du PBS stérile à raison de 1g/100mL puis porté à ébullition pendant 2-3min. Après un temps de refroidissement, les îlots sont mélangés à l'agarose tiède et déposés dans une boîte de Petri. Après réticulation totale (3-5min), les gels obtenus sont recouverts de milieu complet.
- **Condition alginate** : l'alginate en poudre (Novamatrix, Sandvika, Norvège) est reconstitué dans du PBS stérile à une concentration de 1,5%. Les îlots sont mélangés à l'alginate et l'ensemble déposé sous forme de film au fond d'une boîte de Pétri. L'alginate est solidifié par ajout de CaCl₂ (Sigma) à 120mM. Le gel ainsi obtenu est ensuite rincé avec du PBS et recouvert de milieu complet.
- **Condition HPMC** : l'HPMC est reconstituée avec 2,5mL de milieu complet la veille de l'isolement. Après isolement, les îlots sont répartis dans le gel avec 500µL de milieu complet (volume final =3mL).
- **Condition PEG-DA** : les îlots sont mélangés au PEG-DA 5% contenant 5mM d'igracure (Sigma), un photo-liant. Après exposition 2 min aux UVs, les gels sont recouverts avec du milieu complet

- **Condition dextran-PEG** : les îlots sont mélangés au dextran (Cellendes) puis le PEG est ajouté pour effectuer la polymérisation. Le gel obtenu est alors recouvert de milieu complet.
- **Condition pancréas décellularisés de rat (DCr) ou de porc (Dcp)** : après décellularisation (cf. partie précédente), les pancréas sont mixés en très petites particules, lyophilisés et mélangés au milieu de culture contenant les îlots à raison de 1,5mg/mL.
- **Condition RGD** : les îlots sont mis en culture dans du milieu complet additionné de 120 μ M de peptide RGD (Sigma).
- **Condition acide hyaluronique (AH)** : L'AH est reconstitué avec 2,5mL de milieu complet la veille de l'isolement. Après isolement, les îlots sont répartis dans le gel avec 500 μ L de milieu complet (volume final =3mL).
- **Condition alginate-RGD** : l'alginate-RGD en poudre (Novamatrix) est reconstitué dans du PBS stérile à une concentration de 1,5% contenant 120 μ M de RGD. Les îlots sont mélangés à l'alginate et l'ensemble déposé sous forme de film au fond d'une boîte de Pétri. L'alginate est solidifié par ajout de CaCl₂ (Sigma) à 120mM. Le gel ainsi obtenu est ensuite rincé avec du PBS et recouvert de milieu complet.
- **Condition HPMC plasma** : l'HPMC est reconstitué avec 2,5mL de plasma de rat la veille de l'isolement. Après isolement, les îlots sont répartis dans le gel avec 500 μ L de plasma (volume final =3mL).
- **Condition gel de plasma** : les îlots sont inclus dans un gel de plasma de rat réticulé grâce à l'ajout de thrombine (0,5U Sigma). Les gels obtenus sont recouverts avec du milieu complet
- **Condition gel de plasma + ePFD** : les îlots sont inclus dans un gel de plasma de rat contenant 10% de PFD émulsionnés, réticulé grâce à l'ajout de thrombine (0,5U). Les gels obtenus sont recouverts avec du milieu complet.
- **Condition dextran-PEG RGD** : les îlots sont mélangés au dextran et aux peptides RGD (0,5 mmol/L) (Cellendes) puis le PEG est ajouté pour effectuer la polymérisation. Le gel obtenu est alors recouvert de milieu complet.

3.10 Viabilité des îlots pancréatiques

La viabilité des îlots est évaluée en utilisant un marquage fluorescéine diacétate (FDA 5,0 mg/mL dans l'acétone, Sigma) et iodure de propidium (PI; 0,1 mg/mL, Sigma). La FDA est métabolisée par les cellules vivantes et clivée en fluorescéine qui va émettre dans le vert. Le PI, intercalant de l'ADN, marque les cellules nécrotiques en passant par la membrane endommagée de celles-ci et émet dans le rouge. Après 24h de culture, une solution de FDA/PI est appliquée sur un échantillon représentatif des conditions à tester. La viabilité est évaluée visuellement, la présence d'une fluorescence verte (FDA) et l'absence ou quasi absence de fluorescence rouge (PI) indique une bonne viabilité. De la fluorescence verte associée à une fluorescence rouge indique une viabilité moyenne, lorsque la fluorescence rouge est plus importante que la verte, la viabilité est mauvaise et l'absence de fluorescence verte indique une viabilité quasi nulle. La viabilité est une estimation empirique exprimée en % indiquant la proportion de cellules viables par rapport à la totalité de l'îlot. Les îlots étant des amas cellulaires en trois dimensions, la quantification de la fluorimétrie ou le test classique au MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5- diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl blue) ne sont pas des techniques fiables. De plus, les préparations d'îlots contiennent toujours de l'exocrine résiduel et le test au MTT ne permettra donc pas de différencier l'activité mitochondriale des îlots de celle du tissu exocrine.

3.11 Fonctionnalité des îlots pancréatiques

La fonctionnalité des îlots de Langerhans est évaluée en utilisant un test de stimulation au glucose, ou GSIS (Glucose Stimulated Insulin Secretion). Après culture, les îlots sont rincés puis synchronisés durant 30 min dans une solution de Krebs-SVF basale (NaCl 110mM, Kcl 4,7mM, CaCl₂ 3,4mM, KH₂PO₄ 1,2mM, MgSO₄-7H₂O 1,2mM, NaHCO₃ 20mM, HEPES 16mM, glucose 4,4mM (Sigma, Fisher). Ils sont ensuite placés pendant 1h30 dans un nouveau bain de Krebs-SVF basal (B1), suivi d'une incubation d'1h30 dans un bain de Krebs-SVF stimulé (S) (Krebs + glucose 22,6mM) et à nouveau 1h30 dans bain de Krebs-SVF basal (B2). Les îlots sont ensuite récupérés et les protéines extraites. L'insuline libérée est quantifiée dans les surnageant B1, S et B2 par un kit ELISA (Mercodia, Upsalla, Suède). Les résultats sont

exprimés en µg/L. La normalisation est faite en fonction du nombre d'îlots présents dans chaque condition. Un index de stimulation peut être calculé par la formule suivante :

$$Index\ de\ stimulation = \frac{S}{moyenne\ (B1 + B2)}$$

3.12 Dosage du VEGF

Le milieu de culture des îlots pancréatiques est récolté après 24h de culture. Le dosage du facteur de croissance vasculaire endothéliale (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) est réalisé à l'aide d'un kit ELISA (Raybiotech, Norcross, États-Unis). Les résultats sont exprimés en pg/mL.

3.13 Extraction protéique

Après culture, les protéines des îlots sont extraites en présence d'anti-protéase et d'anti-phosphatase (Halt™ Phosphatase Inhibitor Cocktail, Fisher) par un kit d'extraction soit fractionnée (NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents, Fischer) soit totale (M-PER™ Mammalian Protein Extraction Reagent, Fisher). Ces kits permettent d'obtenir les protéines de la fraction cytoplasmique et de la fraction nucléaire des îlots. A la fin de l'extraction, les membranes restent dans le culot. Ce dernier est resuspendu dans 50µL d'eau MilliQ et redispersé à l'aide d'ultra-sons pendant 3 secondes à 30% (Sonopuls, Bandeline) afin d'obtenir la fraction membranaire.

3.14 Apoptose des îlots pancréatiques

3.14.1 Mesure de la caspase 3 effectrice par ELISA

La caspase 3 est mesurée dans les extraits protéiques cytoplasmiques grâce à un kit ELISA (R&D, Minneapolis, Etats-unis). Les valeurs sont exprimées en ng/mL.

3.14.2 Mesure de l'ADN clivé par technique TUNEL

L'apoptose est mesurée par une technique TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labelling). L'ADN des cellules apoptotiques est clivé par les nucléases, cette dégradation génère des extrémités 3'OH libres auxquelles la transférase ajoute des UTPs marqués avec un fluorochrome. Le marquage est réalisé sur des coupes d'îlots de 5µm inclus en cryocolle (Sakura, Villeneuve d'Ascq, France) et visualisé en microscopie à fluorescence.

3.15 Western blot

La technique du western blot permet l'étude de l'expression d'une protéine d'intérêt. Les extraits protéiques (cytoplasmiques, nucléaires ou membranaires) sont dosés par la méthode de Bradford de sorte à déposer la même quantité de protéines par puits pour le western blot. Après dépôt sur le gel polyacrylamide (Criterion™ XT 4-10% Bis Tris ou Tris-acetate, Biorad) des échantillons d'intérêt ainsi que des marqueurs de taille (Seeblue® Plus 2 Prestained, MagicMark™ WP, Life technology) ; la migration dure 40 min à 200V dans un tampon de migration (XT MES, Biorad, Schiltigheim). Les protéines présentes dans le gel sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose et ou polyvinyl (PVDF), grâce à un appareil de transfert semi-sec (iBlot™ Invitrogen). La membrane est bloquée pendant 1h avec une solution de blocage (Tampon + 5% de BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma)). L'anticorps primaire est incubé sur la nuit à 4°C, l'anticorps secondaire couplé à la HRP est ensuite incubé durant 1h à température ambiante. La solution de révélation (Immun-Star™ WesternC™ Kit, Biorad) est appliquée pendant 1 min, puis l'acquisition est réalisée à l'aide d'un Chemidoc (Biorad) et du logiciel Quantity one®.

Les anticorps utilisés sont les suivants :

Nom	Provenance	Dilution	Conjugué	Fournisseur	Référence
Anticorps primaires					
Anti-intégrine β1	Lapin	1/200 ^{ème}	/	Santa-Cruz	Sc-8978
Anti FAK	Lapin	1/1000 ^{ème}	/	Cell-signaling	#3285
Anti p-FAK (Tyr 397)	Lapin	1/200 ^{ème}	/	Santa-cruz	Sc-11765-R
Anti Akt	Lapin	1/500 ^{ème}	/	Cell-Signaling	#9272
Anti p-Akt (Ser 473)	Souris	1/500 ^{ème}	/	Cell-Signaling	#4051
Anti ERK	Lapin	1/1000 ^{ème}	/	Cell-Signaling	#4695
Anti p-ERK	Lapin	1/1000 ^{ème}	/	Cell-Signaling	#4370
Anti β-actine	Souris	1/10000 ^{ème}	/	Abcam	Ab6276
Anti β-actine	Lapin	1/10000 ^{ème}	/	Abcam	Ab8227
Anti HIF-1α	Souris	1/500 ^{ème}	/	Santa-Cruz	SC-10790
Anti FOXO-1	Lapin	1/1000 ^{ème}	/	Cell-signaling	#2880
Anti TBP	Lapin	1/1000 ^{ème}	/	Cell-signaling	#8515
Anticorps secondaires					
Anti-Lapin	Chèvre	1/5000 ^{ème}	HRP	Sigma	A0545
Anti-souris	Lapin	1/5000 ^{ème}	HRP	Sigma	A9044

Tableau 4 : Liste des anticorps utilisés en western blotting

La quantification est réalisée grâce au logiciel ImageJ®. Les quantifications sont normalisées par rapport à la quantité de β-actine présente dans les échantillons protéiques.

3.16 Mesure du stress oxydant

Le stress oxydant, plus exactement les espèces réactives de l'oxygène (ROS, reactive oxygen species) sont évaluées ici par le marquage à la dihydro-éthidine (DHE, Sigma). Cette sonde réagit avec les ROS et produit de l'ethidine fluorescente (115-117). Pour se faire, les îlots

sont inclus en cryocolle. Des sections de 10 μ m d'épaisseur sont obtenues à l'aide d'un cryostat (Leica, Wetzlar, Allemagne) et placées sur des lames traitées (Superfrost, Fisher). Les lames sont placées à température ambiante durant 5-10min, puis la sonde ($2,5 \cdot 10^{-6}$ M) est incubée durant 30min à 37°C sur les coupes. La réaction est stoppée dans un bain de PBS et les lames observées à l'aide d'un microscope à fluorescence (Nikon Eclipse 50i) et du logiciel Nis-Element Br.

3.17 Chimiotactisme macrophagique

L'étude du chimiotactisme est réalisée sur le principe de la chambre de Boyden. Celui-ci repose sur la migration cellulaire induite par la présence d'un gradient chimiotactique entre deux compartiments séparés par une membrane poreuse. Le test suivant va permettre d'évaluer le pouvoir chimio-attractant de surnageant d'îlots pancréatiques cultivés dans différentes conditions. Les cellules utilisées sont des macrophages péritonéaux.

Les macrophages sont isolés à partir de rats Wistar mâles d'environ 500 g (Elevage Janvier Lab, Le Genes St-Isle, France). Une péritonite chimique est induite avant le prélèvement par injection intra-péritonéale de 10 ml d'une solution de thioglycolate (Sigma-Aldrich) à 3%. Soixante-douze heures après l'induction, l'animal est anesthésié par inhalation d'isoflurane (3% dans de l'oxygène), puis décapité pour une exsanguination totale. Une légère incision est réalisée sur la partie basse de la face ventrale puis les cellules péritonéales sont prélevées, grâce à des lavages successifs avec 50 ml de « Phosphate Buffered Saline » (PBS ; Sigma-Aldrich) contenant 1% d'AB/AM (antibiotique/ antimycotique). Après recueil des cellules péritonéales, ces dernières sont centrifugées 5 minutes à 1500 rpm et reprises dans le volume requis de milieu M199 supplémenté (Fisher) avec 10% de SVF et 1% d'AB/AM.

Le dispositif est ici composé d'une plaque 96 trous et d'inserts de porosité 5 μ m (HTS Transwell®-96 Well Plate, Sigma). Dans le compartiment du bas, 100 μ L de solutions chimiotactiques à tester (surnageant d'îlots pancréatiques, contrôle négatif et positif) sont déposés. Le formyl-Met-Leu-Phe (fMLP, Sigma), reconnu pour son fort pouvoir chimioattractant, est utilisé comme contrôle positif de migration. Le fMLP est un tripeptide

de synthèse, analogue de produits du métabolisme bactérien. Le milieu M199 complet est utilisé comme contrôle négatif. Les macrophages précédemment isolés sont ensuite ensemencés à raison de 75 000 cellules par inserts dans un volume de 100µL de M199 complet.

Après 4 heures d'incubation à 37°C en atmosphère humide enrichie de 5% de CO₂, le chimiotactisme est évalué après fixation et coloration (Diff-Quick®, Dade Behring, Courbevoie, France) des macrophages ayant traversé la membrane de l'insert. Après séchage à température ambiante, une décoloration est réalisée grâce à de l'acide chlorhydrique (VWR, Strasbourg, France) à 0,1 mol.l⁻¹. La lecture se fait par spectrophotométrie à 605 nm. Le chimiotactisme est évalué par le calcul de l'index de migration selon la formule suivante :

$$\text{Index de migration} = \frac{\text{Abs. macrophages attirés par le surnageant testé}}{\text{Abs. macrophages attiré par le contrôle négatif}}$$

3.18 Test de coagulation *in vitro*: TCA

Le test de coagulation TCA, pour Temps de Céphaline Activée, reflète la capacité d'un plasma recalcifié à coaguler en présence d'un substitut plaquettaire (la céphaline) et d'un activateur (le kaolin). Le TCA est utilisé en clinique (combiné à d'autres tests) pour déterminer notamment un trouble de la coagulation sanguine (ou hémostase) et/ou pour la surveillance d'un traitement anti-coagulant par héparine. Il est réalisé sur tube citraté, de préférence dans les 4h suivant le prélèvement, si le temps s'avère plus long, le plasma peut sans problème être congelé. Le plasma utilisé pour faire ce test est prélevé via une ponction aortique sur des rats sains. Il est ensuite centrifugé 2 fois à 5000g avec décantation intermédiaire, aliquoté puis conservé à -80°C jusqu'au test.

Afin de tester les propriétés pro-coagulantes des îlots cultivés dans les gels de plasma ceux-ci sont libérés du gel avant le test à l'aide d'une enzyme : la plasmine (Plasmin from human plasma, Sigma). En parallèle, des îlots contrôles sont aussi testés. Cent îlots (contrôles ou

précédemment cultivés dans les gels de plasma) sont ensuite incubés dans 100 μ L de plasma de rat sain dans des tubes à hémolyse. Le test est réalisé à t0, t1 et t2 heures à l'aide d'un kit TCA (APTT-TCA, Ablianice, Compiègne, France).

L'ensemble du test se déroule à 37°C dans une étuve thermostatée. De petits index métalliques sont ajoutés au mélange îlots-plasma et le tube placé au-dessus d'une plaque agitatrice. Le substituant des plaquettes est ajouté au plasma contenant les îlots et l'ensemble incubé durant 3min. L'activateur particulaire est ensuite ajouté et le chronomètre est déclenché. L'arrêt de la rotation de l'index métallique indique la formation d'un caillot et donc le temps de coagulation.

3.19 Mesure de diffusion de l'oxygène dans les biomatériaux

La mesure de l'oxygène est réalisée à l'aide d'un oxymètre à fibre optique (OXI-4, Presens, Allemagne) et de capteurs d' O_2 non invasifs (pastilles) (Presens). Les éléments optoélectroniques intégrés dans l'unité de commande (OXY-4) excitent la surface polymère sensible à l' O_2 des capteurs par une diode électroluminescente bleue puis cette surface émet de la lumière rouge. Le temps écoulé entre l'excitation et l'émission est proportionnelle à la concentration en oxygène dissous.

Les pastilles sont collées au fond de boîte de Pétri et les boîtes disposés sur un support PVC auquel sont reliées les fibres optiques. A intervalle programmable, l'oxymètre effectue une mesure du taux d' O_2 au niveau de la pastille et transmet les données sur un ordinateur. Cet appareillage permet donc la mesure cinétique d' O_2 de 1 à 4 conditions.

Pour tester la diffusion de l' O_2 dans les biomatériaux (gel de plasma et HPMC) ceux-ci sont disposés sur les pastilles, le contrôle étant du milieu de culture liquide. Les 3 boîtes sont alors placées en hypoxie (2% O_2) grâce à une chambre à hypoxie (StemCell Technologies, Canada) et un mélange de gaz (2% O_2 , 5% CO_2 et 93% N_2 , Linde, France) durant une nuit. Le lendemain, une mesure du taux d' O_2 au niveau des 3 pastilles est effectuée avant l'ouverture de la chambre à hypoxie, elle doit être de 2±1%. Les boîtes sont ensuite disposées sur les supports PVC dans un incubateur (37°C, 5% CO_2 , 20% O_2) et la cinétique est lancée, la

mesure est arrêtée lorsque le taux d'oxygène dans la matrice est égal à celui de l'incubateur (20%).

3.20 Transplantation d'îlots pancréatiques

3.20.1 Induction du diabète

Le diabète expérimental de type 1 est induit sur des rats Lewis (180-200g), rats syngéniques nous permettant de nous affranchir des réactions immunitaires de rejet. Pour ce faire, 75mg/kg de streptozotocine (Santa Cruz, Texas, Etats-Unis) dans du tampon citrate (pH 4,7) (Sigma) sont injectés en intra-péritonéal aux rats. Après deux jours, la glycémie capillaire est contrôlée au niveau de la queue à l'aide d'un glucomètre (Accu-Chek ® Go test, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Si la glycémie est supérieure à 5g/L, une prise de sang est réalisée afin de vérifier la glycémie par un dosage colorimétrique (Glucose RTU®, Biomérieux, France) ainsi que le niveau de peptide C par un kit ELISA (Mercodia, Uppsala, Suède). Dans le cadre de cette étude, le modèle diabétique inclus des rats ayant une glycémie >5g/L et le taux de peptide C <200pM.

3.20.2 Préparation des receveurs

Un travail annexe réalisé pendant cette thèse (Cf. Annexe B) (118) a permis de mettre en lumière la nécessité de réguler correctement la glycémie avant une transplantation d'îlots pancréatiques. D'une part de par la réduction du stress oxydant au sein du site receveur, et d'autre part d'un point de vue métabolique par la condition de santé du receveur (poids notamment). Cette régulation est effectuée grâce à des pompes à insuline (LinPlant, Linshin, Canada) placées en sous-cutanée et qui délivrent 3UI d'insuline rapide par jour. Ce travail ayant été réalisé au cours de cette thèse, certaines cohortes d'animaux réalisés avant, n'ont pas pu disposer de ces pompes, elles ont alors été traitées avec 6UI/jour d'insuline lente administrée par injection sous-cutanée.

3.20.3 Pose des pompes à insuline

La pose des pompes est réalisée sous anesthésie gazeuse dès lors que le diabète est confirmé. L'anesthésique utilisé est l'isoflurane (Baxter, Maurepas, France). L'induction est réalisée à une concentration d'isoflurane de 3% avec un débit en oxygène de 500 mL/min et le maintien à une concentration d'isoflurane de 1,5%. Le rat est placé en décubitus ventral et la peau du coup est percée à l'aide d'un trocart de 16G, puis le guide (fig. 47C) est inséré dans l'ouverture réalisée. Les pompes (1 et 1/2, pour la dose de 3UI) sont d'abord désinfectés grâce à une solution de povidone iodé (diluée au 1/2, Bétadine dermique 10%, Meda Pharma, Paris, France), puis insérée dans le guide et poussée sous la peau grâce à un stylet. Le guide et le stylet sont retirés et la peau refermée par un point de suture. L'intervention dure environ 2min. Le rat est ensuite retiré de l'appareil à anesthésie et le bon fonctionnement de la pompe suivi par des mesures de glycémie capillaire sur la journée suivant l'intervention.



Figure 47 : Dispositif de pose de pompes à insuline

Pompes à insuline stériles (par 5, (1)), ensemble guide, stylet (2) et aiguille de 18G (3).

3.20.4 Transplantation intra-hépatique

La transplantation a été réalisée sur des rats Lewis (180-200g) diabétiques induits par une unique injection intra-péritonéale de 75 mg/kg de streptozotocine (Sigma). Des rats ne recevant pas d'îlots servent de contrôles négatifs (sham-operated, sham). Le nombre d'îlots permettant de réverser un diabète chez le rat est de 2400IEQ. Si l'on veut voir des différences entre plusieurs conditions, le nombre d'îlots doit être diminué de sorte que seule la meilleure des conditions permette d'observer un effet (1000IEQ, utilisée dans la première partie).

La transplantation intra-hépatique nécessite l'injection d'îlots libres. Les îlots cultivés en biomatériaux sont donc libérés avant transplantation. Pour se faire, les gels de plasma sont placés dans des petites cupules de plaque 24 trous (Greiner) avec 200µL de plasmine (enzyme permettant le clivage de la fibrine en produit dérivé de la fibrine (PDF) et la libération des îlots du gel) (Plasmin from Human Plasma, Sigma). Les plaques sont placées à 37°C sous agitation jusqu'à totale dissolution du gel. Les îlots sont alors rincés avec du milieu de culture, chargés dans une seringue et placés sur glace.

La chirurgie est réalisée sous hotte stérile. Avant l'acte chirurgical, les rats sont anesthésiés au gaz (Base standard d'anesthésie FG1014B, TEM, Lormon, France) avec de l'isoflurane (Baxter, Maurepas, France) dans de l'oxygène. L'induction est réalisée à une concentration d'isoflurane de 3% avec un débit en oxygène de 500 mL/min et le maintien à une concentration d'isoflurane de 1,5% (l'intervention dure environ 10 minutes). Avant la laparotomie, une anesthésie locale est réalisée. Pour cela, du Xylavet® ND 2% (Centravet, Velaine-en-Haye, France) est utilisé en injection sous cutanée au niveau du site de l'incision (200µL en 4 injections). Un tapis chauffant est placé sous les animaux pour éviter tout risque d'hypothermie. Après vérification du stade d'endormissement, les animaux sont rasés au niveau du péritoine à l'aide d'une lame de scalpel, un champ opératoire stérile est placé et une incision est réalisée (sur environ 1 cm) au niveau de la région abdominale. Après dégagement de la veine porte, une préparation stérile de 400µL de milieu CMRL sans sérum ni antibiotique contenant les îlots pancréatiques est injectée dans le foie via le système

porte à l'aide d'une aiguille de 26G. Au moment du retrait de l'aiguille, une compresse stérile est appliquée au point de piqûre pour empêcher tout saignement de l'animal. Une fois le saignement stoppé, 2mL de sérum physiologique pré-chauffé sont injecté dans le prétoine. L'animal est ensuite suturé sur les plans musculaires et cutanés et retiré de l'appareil à anesthésie (Fig. 48).

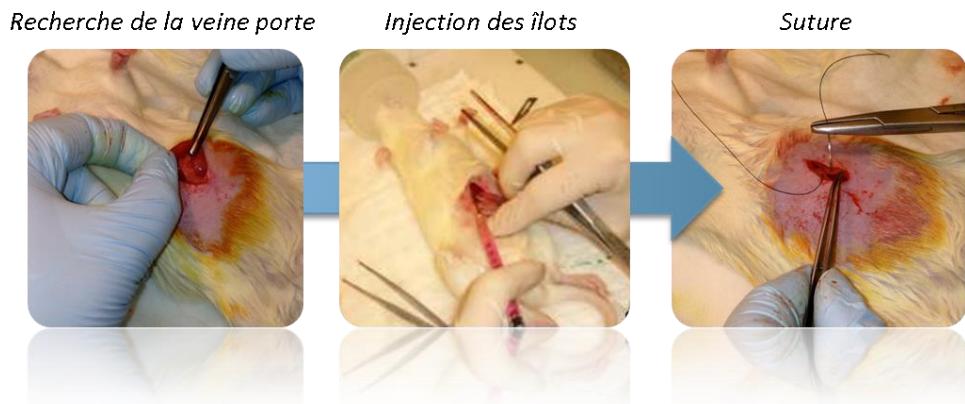


Figure 48 : Implantation intra-portale d'ilots pancréatiques

3.20.5 Transplantation intra-omentale

3.20.5.1 Sous forme de pochon

Les gels de plasma ne sont ici pas dissociés, ils sont rincés avec du milieu de culture sans SVF et placés sur glace jusqu'à l'implantation. Pour la transplantation dans l'omentum sous forme de pochon, la procédure est la même jusqu'à la laparotomie. L'estomac est repéré, l'omentum qui est la couche graisseuse située en contre bas est alors sorti et étendu sur des compresses stériles. La matrice contenant ou non des îlots est placée sur cet omentum et ce dernier est replié pour englober tout le gel. La construction est maintenue par 3 points de sutures et l'omentum replacé à l'intérieur de la cavité péritonéale. Après avoir suturé la couche musculaire et la couche cutanée, l'animal est retiré de l'appareil à anesthésie (Fig. 49).

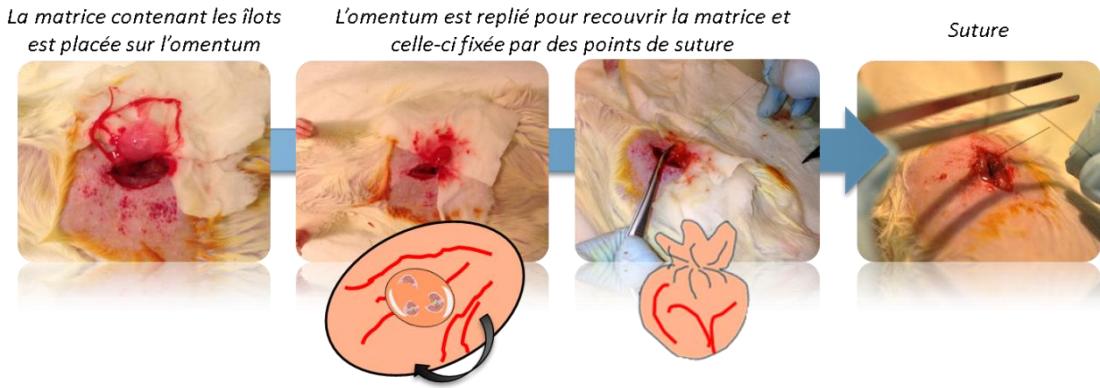


Figure 49 : Implantation intra-omentale d'ilots pancréatiques, technique du pochon

3.20.5.2 En intra-tissulaire

Le dispositif de transplantation est composé d'un seringue et d'une aiguille atraumatique. Les îlots répartis dans les matrices de type hydrogel sont chargés dans ce dispositif à raison de 200 μ L maximum. La procédure intra-tissulaire conserve la même base que les 2 types de transplantations précédentes jusqu'à la laparotomie. Après avoir sorti l'omentum de la cavité péritonéale, les îlots et leur matrice sont injectés dans l'omentum en différents points d'entrée. Une matrice sans îlot est utilisée pour rincer le dispositif (environ 100 μ L). L'omentum est ensuite replacé dans la cavité péritonéale la couche musculaire et la couche cutanée suturées et l'animal est retiré de l'appareil à anesthésie (Fig. 50).

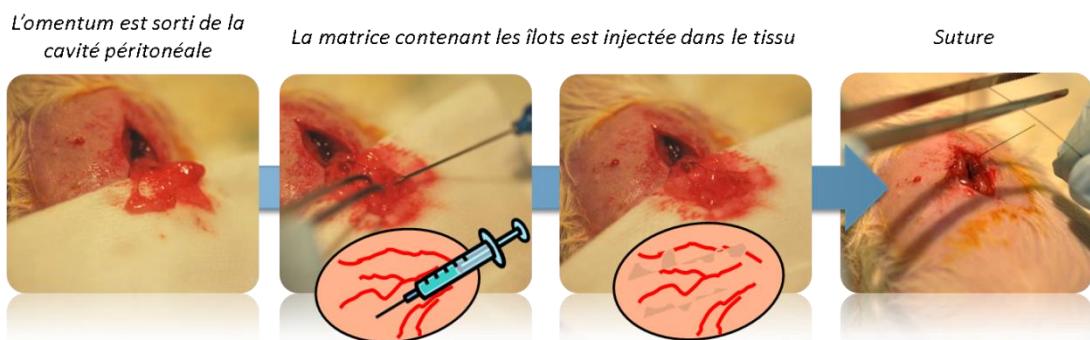


Figure 50 : Implantation intra-omentale d'ilots pancréatiques, injection intra-tissulaire

3.20.6 Procédures post-chirurgicales

A la suite de l'acte chirurgical, l'animal recevra chaque jour une injection sous cutanée d'un antibiotique (Baytril® 5%, 10mg/kg, Bayer, France) et d'un anti-inflammatoire (Metacam®, 1mL/kg, Boehringer, Allemagne) afin d'éviter tout risque d'infection et ceci jusqu'à cicatrisation. Enfin, les pompes à insuline sous-cutanées seront retirées chez les animaux diabétiques au moment de la transplantation, et le traitement se poursuivra par des injections sous-cutanées quotidiennes de 6UI/200g de poids corporel d'insuline lente (Umuline®, Lilly, France) tant que leur glycémie sera $\geq 2\text{g/L}$ afin de pallier aux complications liées au diabète.

3.20.7 Suivi métabolique à court terme

Après transplantation intra-portale, un suivi de 8h est réalisé sur 3 groupes de rats ($n=4$): un groupe sham (pas d'îlots), un groupe contrôle (îlots contrôle) et un groupe plasma (îlots cultivé dans un gel de plasma puis libérés et greffés). Le sang des rats transplantés est prélevé à t-15min, t+15min, t+2h, t+4h et t+8h après transplantation. La glycémie, le peptide C et le complexe thrombine anti-thrombine (TAT, kit ELISA (Cusabio, College Park, Etats-Unis) sont mesurés. En parallèle, une étude histologique a été réalisée avec les 3 mêmes groupes.

3.20.8 Suivi métabolique à long terme

Les suivis métaboliques se composent de glycémies, prise de sang et mesure du poids régulières pendant la période d'expérimentation (Jours : 0 ; 3 ; 7 ; 10 ; 14 ; 21 ; 28 ; 42 ; 60 ; et 70). La glycémie capillaire est contrôlée au niveau de la queue à l'aide d'un glucomètre (Accu-Chek® Go test, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), les prises de sang servent notamment à mesurer le niveau de peptide C via l'utilisation d'un kit ELISA (Mercodia, Uppsala, Suède) ou encore le taux de fructosamine à l'aide d'un kit enzymatique (Spinreact, Sant esteve de bas, Espagne).

3.20.9 Tests de tolérance au glucose

Afin de mesurer la capacité de la greffe à répondre à un stimulus glucidique, un test de tolérance au glucose est réalisé. Une injection intra-péritonéale de 2g de glucose par 100g de poids corporel est réalisée sur les rats transplantés. La glycémie est mesurée à 0, 15, 30, 60 et 120 minute après injection. L'aire sous la courbe obtenue est alors calculée et analysée.

3.20.10 Explantation des greffes intra-omentale

Après 2 mois, les greffes intra-omentales sont retirées. Les animaux sont anesthésiés comme précédemment et une laparotomie est réalisée. L'omentum est alors sorti de la cavité péritonéale et disposé sur des compresses stériles. Ce dernier est ensuite réséqué à l'aide de ciseaux. Après vérification du retrait complet de l'omentum et arrêt de tout saignement, l'animal est refermé comme précédemment. Les omentums ainsi retirés sont pesés puis placés dans du paraformaldéhyde à 4% (PFA, Sigma) pour être fixés, s'en suit la procédure d'inclusion d'organe, de coupe et d'immunomarquage.

3.20.11 Sacrifices

A la fin des suivis métaboliques, les animaux sont sacrifiés par exanguination. Pour se faire, ils sont endormis au pentobarbital sodique® (CEVA, Libourne, France) à raison de 100µL/100g de poids corporel. Lorsque l'absence de réflexe est constatée, l'animal est ouvert par laparotomie étendue et le sang prélevé par ponction dans l'aorte thoracique jusqu'à arrêt cardio-respiratoire. Le sang est alors transféré dans des tubes secs (sans-anti-coagulant) et avec héparine et servira à l'étude de paramètres divers comme par exemple l'équilibre glycémique (dosage de fructosamine). Les organes d'intérêts des animaux non explanté (foie et omentum du groupe foie) sont ensuite récupérés, pesés et placés dans du PFA 4% pour être fixés et inclus en paraffine selon le protocole détaillé précédemment.

3.21 Immunomarquages

Les immunomarquages sont réalisés sur des sections d'organes de 4µm d'épaisseur, obtenues grâce à un microtome. La première étape consiste en un déparaffinage : les sections d'organes sur lame sont placées pendant 30min à 60°C, puis passées 3x5min dans du toluène. Les sections sont réhydratées par passage successifs dans des bains d'éthanol (100%, 90% et 70%) de 2min chacun et un passage dans l'eau distillée. Pour les organes inclus en paraffine une étape de démasquage des sites antigéniques est obligatoire. Elle se fait par chauffage des lames à 750W au micro-onde dans du tampon citrate 10mM. Après avoir fait refroidir les lames, le marquage peut commencer. La première étape est le blocage des sites antigéniques dit aspécifiques, réalisée avec du PBS-T (PBS-Triton 0.1%) additionné de 5% de sérum normal de chèvre (normal goat serum, Sigma) pendant 1h. Le ou les anticorps primaires sont ensuite appliqués à la dilution souhaitée durant la nuit à 4°C (dilués dans du PBS-T 5% sérum). Le lendemain, après rinçage, le ou les anticorps secondaires sont appliqués à la dilution souhaitée (dans le PBS-T 5% sérum) durant 1h à température ambiante. Après rinçage, les lames sont montées (dans l'obscurité) à l'aide d'un milieu de montage comprenant du DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole, (VectaShield hard mounting media with DAPI, Vector Laboratories, Burlingame, États-Unis) et observées au microscope à fluorescence.

La liste des anticorps utilisés est répertoriée dans le tableau 5.

Nom	Provenance	Dilution	Conjugué	Fournisseur	Référence
Anticorps Primaires					
Anti-CD31	Souris	1/200 ^{ème}	/	BD Pharmingen	550300
Anti-insuline	Cochon d'Inde	1/30 ^{ème}	/	Abcam	Ab7842
Anti-macrophages	Souris	1/100 ^{ème}	/	Abcam	Ab31630
Anti-granulocytes	Souris	1/20 ^{ème}	/	AbD serotec	MCA967
Anticorps secondaires					
Anti-cochon d'inde	Chèvre	1/100 ^{ème}	Texas-Red	Vector Laboratories	TI-7000
Anti-souris	Chèvre	1/100 ^{ème}	Alexa-488	Invitrogen	A-11034

Tableau 5 : Liste des anticorps utilisés en immuno-marquage

3.22 Statistiques

Toutes les données sont exprimées par leur moyenne \pm erreur standard à la moyenne (Standard Mean Error, SEM). Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Statistica® (Maison Alfort, France). Les données de distribution normales sont analysées avec des tests paramétriques : soit un test-t (Student), soit une ANOVA à un facteur, soit une ANOVA mesures répétées et représentées sous forme d'histogrammes et courbes. Si les données ne présentent pas une distribution normale, elles sont analysées avec un test non paramétrique de Mann-Whitney et représentées sous forme de graphiques à points. Les résultats sont considérés comme significatifs lorsque la p-valeur est inférieure à 0,05. Les significativités sont définies comme : ####/***/\$\$\$ p<0,001 ; ##/**/\$\$ p<0,01 ; #/*/\$ p<0,05.

4 Résultats

4.1 Biomatériaux de référence : le plasma gel

La première étape avait pour objectif de vérifier la viabilité et la fonction des îlots cultivés dans du plasma sous forme de gel. Cette étude est basée sur des travaux antérieurs réalisés par Maillard *et al.* qui avaient rapporté que l'apport d'une matrice de fibrine était bénéfique mais limité par une augmentation de l'hypoxie (84). Nous avons donc utilisé des gels de plasma seuls ou enrichis avec de la perfluorodécaline émulsionnée (ePFD).

4.1.1 Viabilité et fonctionnalité des îlots

Le marquage FDA/PI montre une viabilité cellulaire comparable pour les îlots libres ou cultivés en présence de plasma (Fig. 51A et B). La stimulation au glucose ne diffère pas entre les différentes conditions de culture. La sécrétion d'insuline par les îlots, suite à un test de stimulation au glucose est préservée (index de stimulation ≈5). En revanche, lors d'un retour à une concentration basale de glucose, le niveau de sécrétion d'insuline des îlots cultivés dans les matrices est plus haut que dans les conditions contrôle (B2 : contrôle : $0,55 \pm 0,20 \mu\text{g/L}$; plasma : $2,66 \pm 0,50 \mu\text{g/L}$; Plasma + ePFD : $1,58 \pm 0,25 \mu\text{g/L}$) (Fig. 51C).

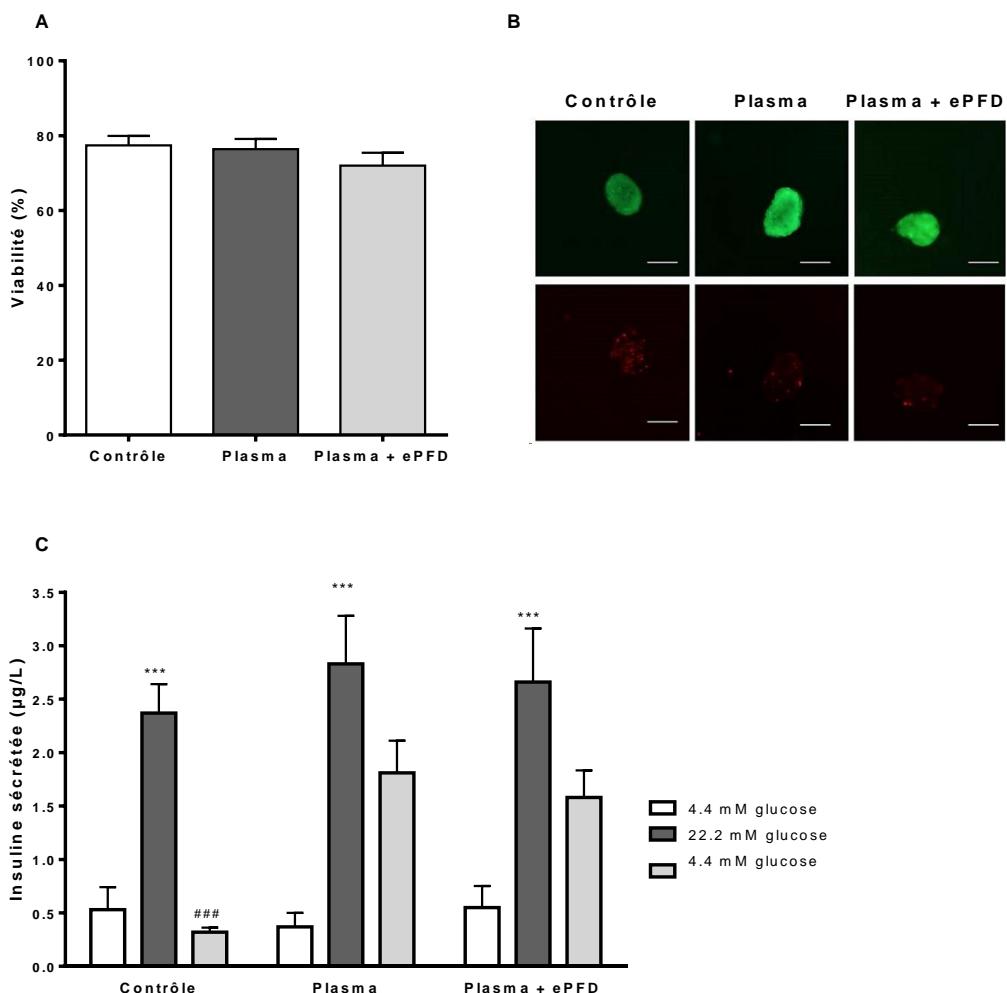


Figure 51 : Viabilité et fonction des îlots cultivés dans un gel de plasma

Viabilité des îlots après 24h de culture (A) et photos représentatives (B). Le FDA, marquage vert représente les cellules vivantes et le PI, marquage rouge indique les cellules nécrotiques. Fonctionnalité des îlots après 24h de culture (C). Les îlots répondent à une augmentation de concentration en glucose par une sécrétion d'insuline. Les données sont issues de 6 expériences indépendantes. *** $p<0,001$ vs. 4,4mM glucose ; ### $p<0,001$ vs. 22,2mM glucose.

4.1.2 Interaction avec la matrice et voies de signalisations

Dans le but d'explorer les effets du plasma gel sur les îlots, les interactions avec ce dernier ont été étudiées par western blotting. Le fibrinogène, contenu dans le plasma est connu pour interagir avec les intégrines composées notamment de la sous-unité $\beta 1$. Les intégrines $\beta 1$ sont surexprimées dans les conditions plasma par rapport au contrôle (contrôle : $0,76 \pm 0,19$; plasma : $2,23 \pm 0,19$; $p < 0,01$). L'ajout d'ePFD accentue la surexpression des intégrines (plasma + ePFD : $3,81 \pm 0,37$, $p < 0,001$ vs. plasma) (Fig. 52A). L'activation des intégrines est corrélée avec l'activation des protéines en aval que sont FAK et Akt (p-FAK/FAK : contrôle : $0,11 \pm 0,02$; plasma : $0,93 \pm 0,06$; plasma + ePFD : $0,45 \pm 0,01$; $p < 0,001$ plasma vs. contrôle et plasma + ePFD vs. contrôle) (Fig. 52B) (p-Akt/Akt : contrôle : $0,57 \pm 0,07$; plasma : $45,47 \pm 6,76$; plasma + ePFD : $18,42 \pm 2,19$; $p < 0,001$ plasma vs. contrôle et plasma + ePFD vs. contrôle) (Fig. 52C).

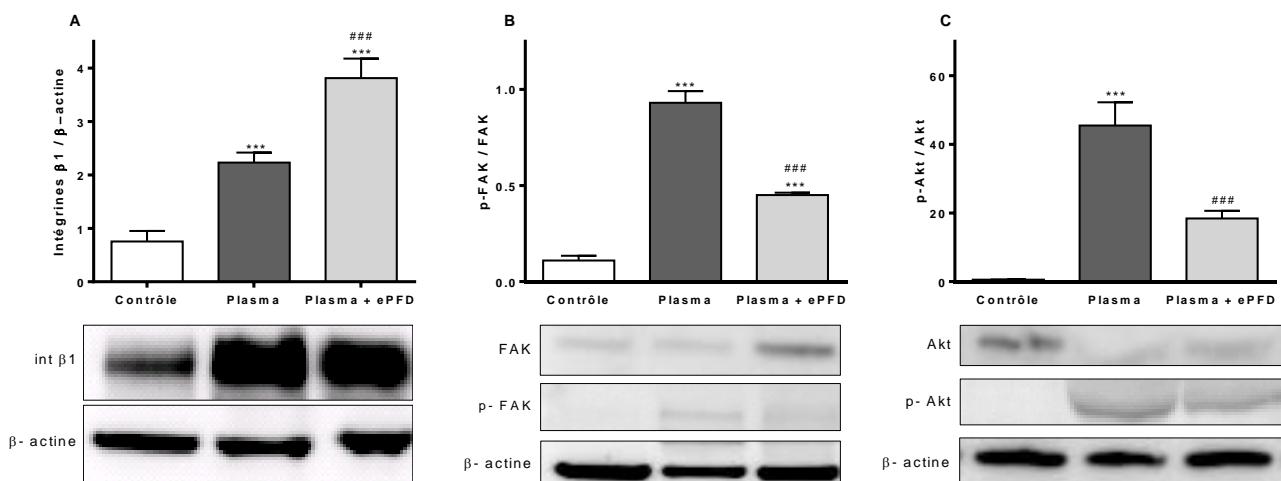


Figure 52 : Interactions îlots-plasma gel

Quantification de l'expression des sous-unités $\beta 1$ des intégrines (A), du ratio p-FAK/FAK (B) et du ratio p-Akt/Akt (C) ($n=6$). *** $p < 0,001$ vs. Contrôle et ### $p < 0,001$ vs. Plasma.

4.1.3 Apoptose des îlots

Le niveau de la caspase 3 activée est 4 fois plus élevé dans les conditions contrôle que dans les matrices de plasma, indépendamment de la présence d'ePFD (contrôle : $3,97 \pm 0,25$ ng/mL ; plasma : $0,76 \pm 0,05$ ng/mL ; plasma + ePFD : $1,33 \pm 0,22$ ng/mL ; $p < 0,001$ plasma vs. contrôle et plasma + ePFD vs. contrôle) (Fig. 53A). Le marquage des cellules apoptotiques est en corrélation avec les niveaux de caspase, puisque le marquage TUNEL est réduit dans les conditions plasma et plasma + ePFD en comparaison avec le contrôle (Fig. 53B).

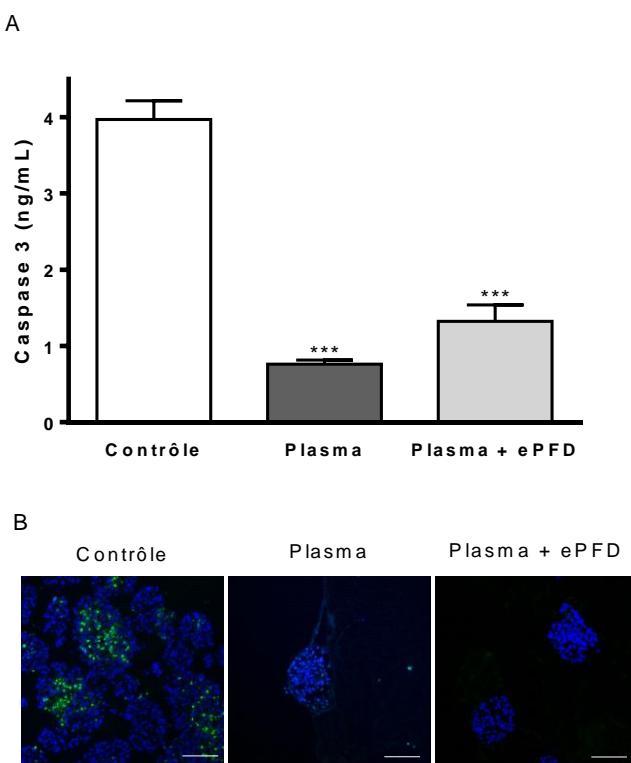


Figure 53 : Apoptose des îlots cultivés dans un gel de plasma

L'apoptose est évaluée après 24h de culture par un dosage de la caspase 3 activée dans les extraits cytoplasmiques d'îlots (A) et confirmée par un marquage TUNEL sur des coupes d'îlots (B) ($n=7$). *** $p < 0,001$ vs. Contrôle.

ERK est une MAPK fréquemment associée à la survie et à la prolifération cellulaire. Dans les conditions testées, le ratio p-ERK/ERK n'est pas statistiquement différent dans les conditions plasma et plasma + ePFD par rapport au contrôle (contrôle : $2,53 \pm 0,51$; plasma : $3,49 \pm 0,95$ plasma + ePFD : $3,40 \pm 0,68$) (Fig. 54). Il semblerait donc que la diminution d'apoptose observée dans ces conditions de culture ne soit pas reliée à une activation d'ERK.

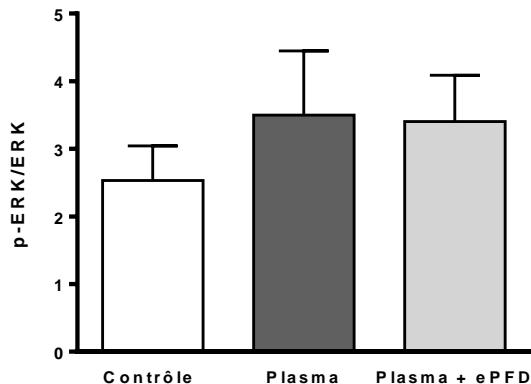


Figure 54 : Ratio p-ERK/ERK

L'activation de ERK n'est pas différente dans les conditions testées. La diminution d'apoptose des îlots ne semble pas être liée à une modulation de cette MAPK ($n=6$).

4.1.4 Hypoxie des îlots

L'encapsulation d'îlots dans une matrice est probablement génératrice d'hypoxie, puisque sa présence augmente le temps de diffusion de l'oxygène jusqu'aux îlots. Pour vérifier cette hypothèse, la translocation d'HIF-1 α a été étudiée dans les extraits nucléaires d'îlots. Lors de la culture en matrice de plasma, la translocation d'HIF-1 α dans le noyau est plus importante que dans les conditions contrôle (contrôle : $0,05 \pm 0,02$; plasma : $0,22 \pm 0,04$; $p < 0,05$). L'ajout d'ePFD permet de réduire ce niveau à celui du contrôle (plasma + ePFD : $0,09 \pm 0,02$; non-significatif vs. contrôle) (Fig. 55A). Liée à cette hypoxie, la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) suit le même profil ; le stress oxydant est augmenté dans les conditions plasma alors qu'il est comparable à celui du contrôle quand l'ePFD est ajoutée (Fig. 55B).

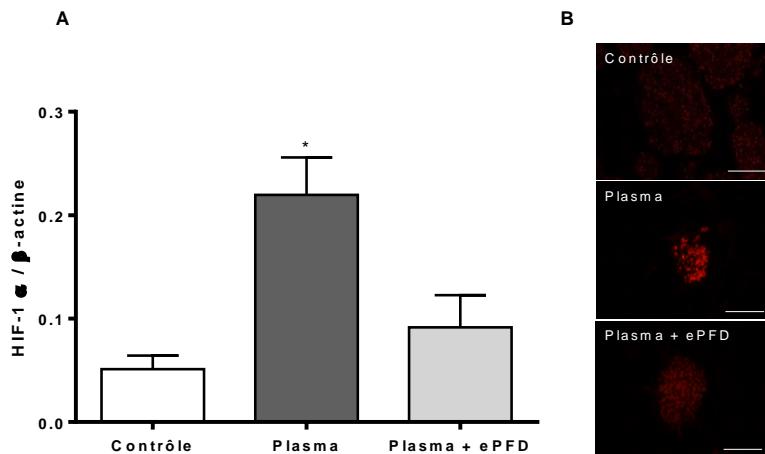
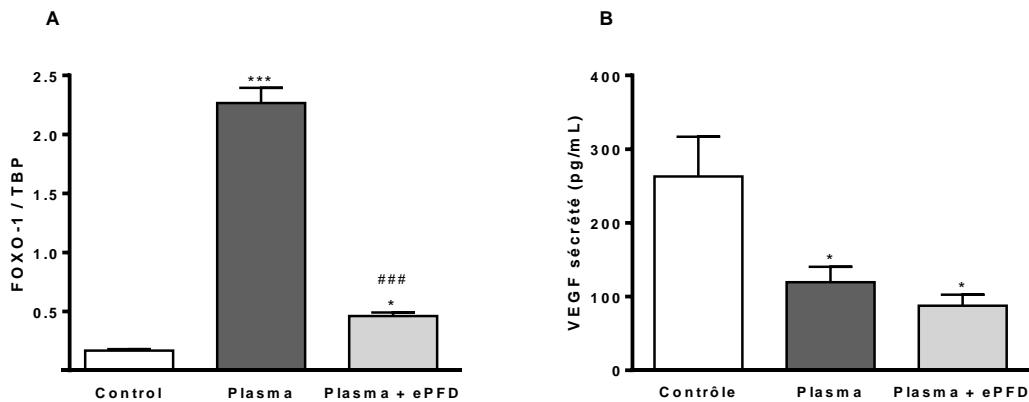


Figure 55 : Hypoxie des îlots cultivés dans un gel de plasma

La quantification d'HIF-1 α dans les extraits nucléaires révèle une hypoxie augmentée en présence de plasma mais contrecarrée par l'ajout d'ePFD (A). Le marquage des ROS est concomitant avec les résultats obtenus pour HIF-1 α (B) ($n=4$). * $p<0,05$ vs. Contrôle.

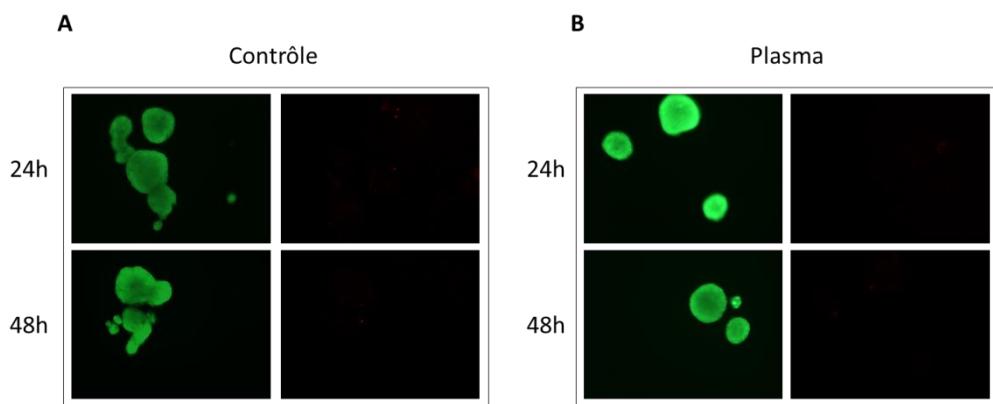
Reliée à l'hypoxie et au stress oxydant, l'expression du facteur de transcription FOXO-1 est augmentée dans les conditions plasma et plasma ePFD par rapport au contrôle (contrôle : $0,168\pm0,01$; plasma : $2,27\pm0,13$; plasma + ePFD : $0,46\pm0,03$), mais le taux observé avec le plasma + ePFD est significativement moins élevé que pour le plasma seul ($p<0,001$) (Fig. 56A). De façon surprenante, le taux de VEGF sécrété est statistiquement plus bas dans les conditions plasma et plasma + ePFD que dans les conditions contrôle (contrôle : $262,83\pm53,93$ pg/L ; plasma : $119,55\pm20,85$ pg/L ; plasma + ePFD : $87,53\pm14,99$ pg/L) (Fig. 56B).



Quantification de l'expression de FOXO-1 dans les fractions nucléaires des îlots (western blotting, normalisation par rapport à la TPB, TATA-binding protein) (A) ($n=6$) et sécrétion de VEGF (vascular endothelial growth factor) (B) ($n=8$). * $p<0,05$; *** $p<0,001$ vs. Contrôle ; ### $p<0,001$ vs. Plasma.

4.1.5 Transplantation intra-portale des îlots cultivés dans le plasma gel

Avant transplantation, les îlots sont libérés du gel de plasma par la plasmine. Cette dissolution enzymatique ne porte aucune atteinte à la survie des îlots (Fig. 57).



Les îlots ont été libérés du gel par la plasmine et rincés comme pour la transplantation. La viabilité des îlots est conservée après 24 et 48h. La plasmine n'est donc pas toxique.

4.1.5.1 Etude à court terme

Dans les premières heures post-transplantation, une lyse précoce des îlots est mise en évidence par un relargage massif de peptide C. Les valeurs de Peptide C/ glycémie mesurées sont significativement plus basses dans le groupe plasma que dans le contrôle (Sham :

$0,00 \pm 0,00$ pM ; contrôle : $95,9575 \pm 27,31$ pM ; plasma : $17,51 \pm 8,06$ pM ; p<0,001 contrôle vs. plasma) (Fig. 58A). Les aires sous la courbe sont également significativement plus élevées pour la condition contrôle que pour la condition plasma (contrôle : $258,51 \pm 122,16$ et plasma : $61,10 \pm 24,72$; p<0,001) (Fig. 58B). Ces données semblent indiquer une meilleure résistance mécanique des îlots à l'infusion lorsque ceux-ci ont été cultivés dans le plasma. Après cette validation à court terme des bénéfices du plasma gel sur la résistance des îlots, le suivi a été réalisé sur un mois.

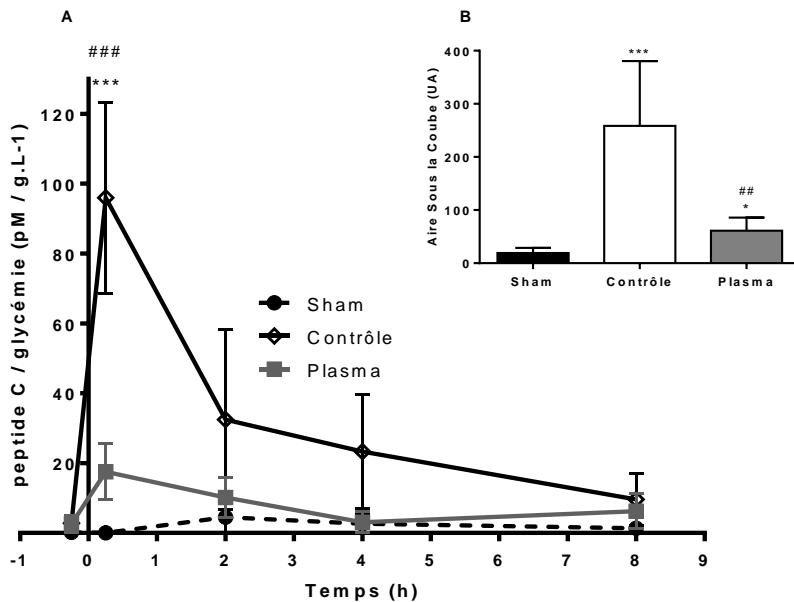


Figure 58 : Suivi de greffe à court terme

Suivi sur 8h des niveaux de peptide C/glycémie à jeun chez des rats Lewis transplantés (A) et aires sous la courbe (B). Avec une greffe d'îlots contrôle, les receveurs présentent une augmentation significative du taux de peptide C / glycémie 15min après greffe comparé au groupe sham ou plasma. L'aire sous la courbe est significativement plus élevée dans le groupe contrôle que dans le groupe plasma (n=4). ***p<0,001 vs. Sham; ## p<0,01 et ###p<0,001 vs. Plasma.

4.1.5.2 Etude à long terme

Après transplantation, une élévation du ratio peptide C / glycémie est observée chez les rats contrôle. Ce groupe maintient le ratio peptide C / glycémie aux alentours de 120pM/g/L tout au long de l'étude alors que les trois autres groupes (îlots préalablement cultivés dans le plasma gel ± ePFD et sham) ne présentent aucune fonction de greffe (J14 : Sham :

$77,19 \pm 4,73$ pM/g.L⁻¹, contrôle : $128,1 \pm 6,25$ pM/g.L⁻¹; plasma : $83,21 \pm 6,41$ pM/g.L⁻¹; plasma + ePFD : $85,36 \pm 2,82$ pM/g.L⁻¹) (Fig. 59A). Tous les rats transplantés prennent et/ou stabilisent leur poids de façon continue, contrairement aux shams dont le poids chute à partir du 14^{ème} jour (J31 : Sham : $5,03 \pm 8,55$ g ; contrôle : $23,00 \pm 10,12$ g ; plasma : $17,69 \pm 6,92$ g ; plasma + ePFD : $11,25 \pm 8,51$ g) (Fig. 59B). Les variations observées sur le poids ne sont pas statistiquement différentes.

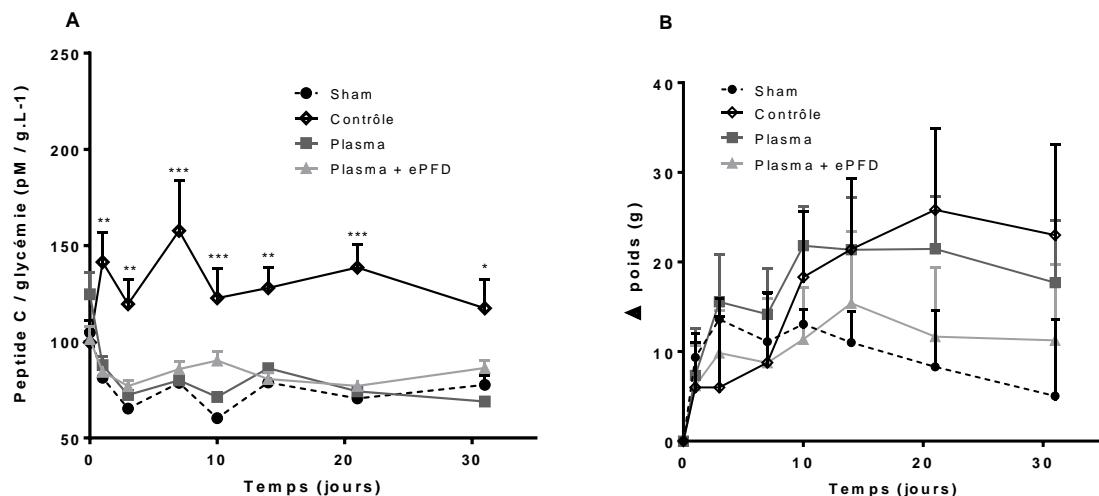


Figure 59 : Suivi métabolique de la greffe à long terme

Suivi sur un mois des niveaux de peptide C / glycémie à jeun chez des rats Lewis transplantés (A) et gain de poids des receveurs de greffe (B) ($n=8$). * $p<0,05$; ** $p<0,01$ et *** $p<0,001$ vs. Sham.

4.1.5.3 Statut inflammatoire post-greffe

Afin de comprendre les raisons de l'absence de fonction du greffon dans le groupe plasma alors que les résultats à court terme semblaient démontrer l'avantage de cette matrice sur la survie et la résistance des îlots, nous nous sommes intéressés aux phénomènes inflammatoires déclenchés lors d'une greffe intra-portale d'îlots (IBMIR). La formation du complexe thrombine/anti-thrombin (TAT) a été mesurée dans le sang au cours des 8 premières heures post-greffe. Un état inflammatoire général a été observé, avec des niveaux de TAT augmentés dans toutes les conditions, y compris pour le groupe sham. Toutefois, l'aire sous la courbe est significativement plus élevée pour le groupe plasma

($74863,25 \pm 10592,62$) que pour le groupe contrôle ($42842,50 \pm 73,78$) ($\#\#p < 0,01$) ou sham ($26582,50 \pm 2189,97$) ($***p < 0,001$) (Fig. 60).

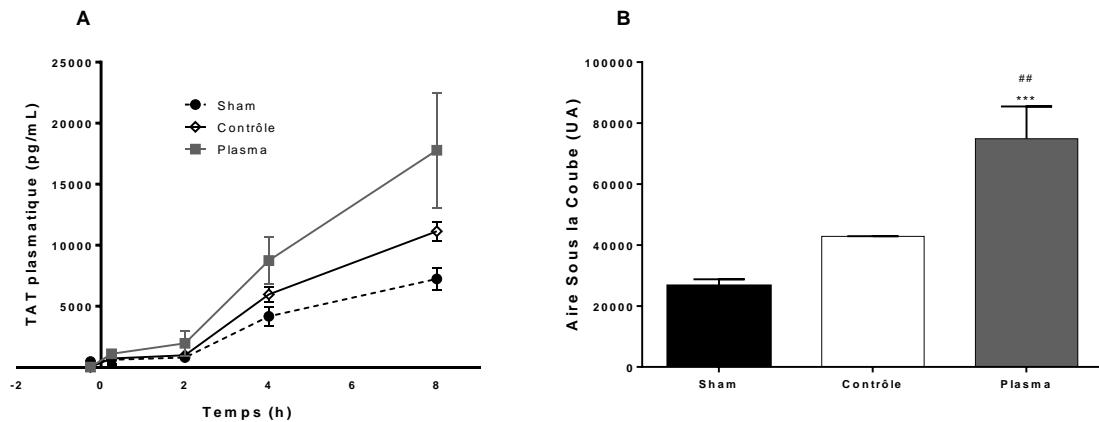
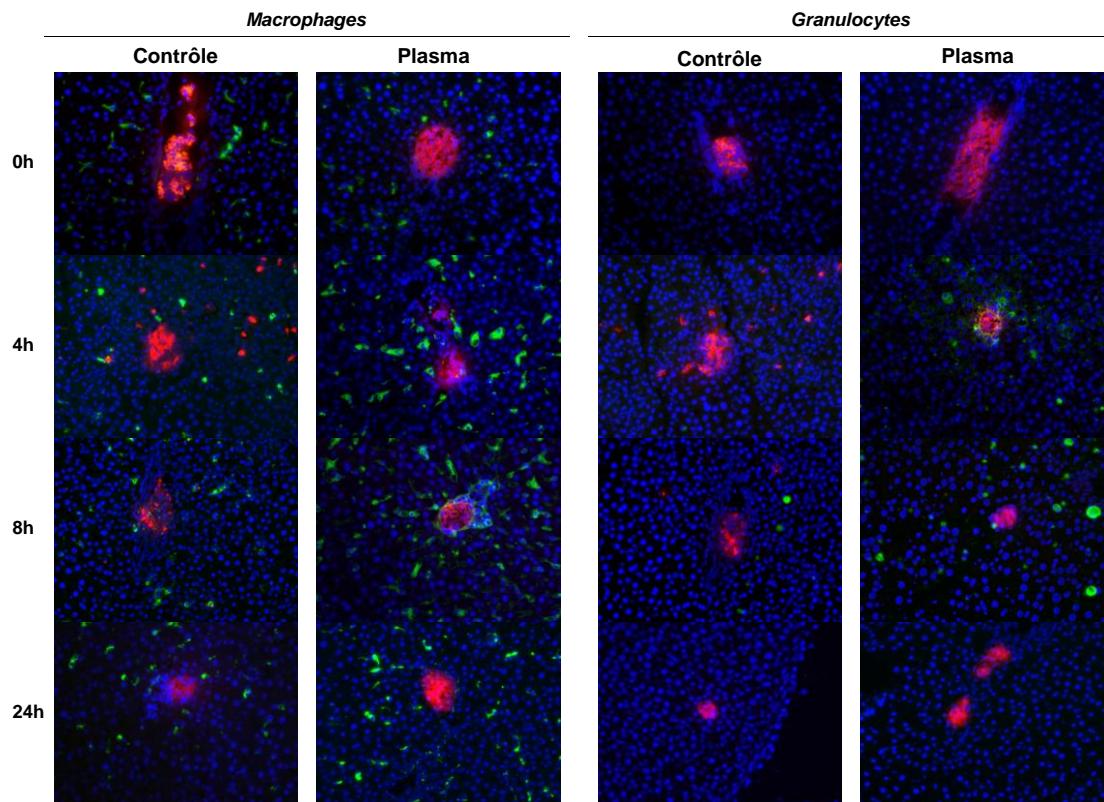
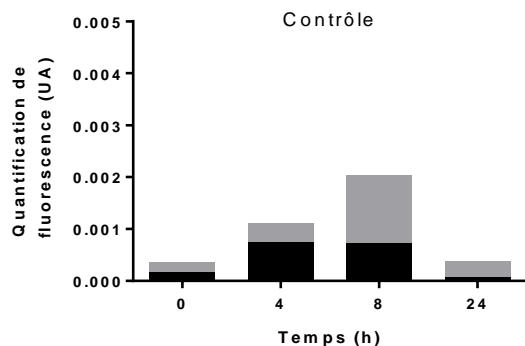
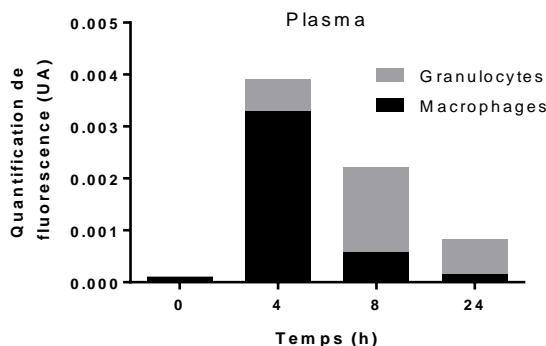


Figure 60 : Dosage sanguin de TAT après transplantation

Taux de TAT plasmatique détecté chez les rats transplantés (A) et aires sous la courbe (B) ($n=4$). $***p < 0,001$ vs. Sham et $\#\#p < 0,01$ vs. Contrôle.

4.1.5.4 Analyses histologiques

Les analyses histologiques des foies prélevés dans les premières heures post-greffe montrent que la structure ronde de l'îlot est préservée dans le groupe plasma gel. En effet, aucune cellule positive à l'insuline n'est retrouvée seule contrairement à la condition contrôle (Fig. 61). Immédiatement après greffe, les îlots sont retrouvés dans les veinules hépatiques entourées de macrophages résidents du foie. Après 4h, de nombreux macrophages sont observés à proximité des îlots et les granulocytes commencent à infiltrer les îlots du groupe plasma. Dans le groupe contrôle, l'infiltration macrophagique et granulocytaire commence 8h post-infusion. Après 24h, des îlots intacts sont retrouvés dans les deux groupes (Fig. 61). La quantification de fluorescence des cellules immunitaires révèle un niveau plus important dans les foies des rats du groupe plasma que dans les foies contrôles (Fig. 61B et C). Trente jours après greffe, des îlots sont retrouvés dans les foies des rats greffés avec des îlots contrôles mais aucun n'a pu être retrouvé dans les foies des rats ayant été greffés avec des îlots cultivés dans le plasma.

A**B****C****Figure 61 : Migration des cellules immunitaires après greffe**

Immuno-marquage des cellules de l'immunité (macrophage et granulocytes) en vert, et de l'insuline en rouge dans les foies de rats transplantés (A). Quantification cumulative de l'intensité de la fluorescence verte à la périphérie des îlots greffés pour le groupe contrôle (B) ou plasma (C) ($n=4$).

Cette étude a été publiée en 2015 dans Biomaterials (Facteur d'impact : 8,978) (119) (Cf. Annexe A).

4.2 IBMIR, responsable de cette perte ?

Dans le but de confirmer le déclenchement d'IBMIR, des tests *in vitro* ont été réalisés.

Le test de chimiotactisme démontre que le surnageant d'îlots cultivés dans le plasma induit une migration des macrophages plus importante que pour les îlots contrôles (Contrôle négatif : $1\pm N/A$; Contrôle positif : $1,67\pm 0,13$; surnageant d'îlots contrôle : $1,04\pm 0,09$; surnageant d'îlots plasma : $2,77\pm 0,12$) (Fig. 62A). Le test de coagulation *in vitro* démontre également que les îlots cultivés dans le plasma puis libérés, provoquent une coagulation bien plus rapide que les îlots contrôles (Fig. 62B) (Après 1h d'incubation : contrôle : $16,21\pm 1,37$ sec ; plasma : $9,13\pm 0,75$ sec). Ces résultats confirment bien les observations effectuées *in vivo* dans les foies de rats transplantés à savoir, un déclenchement plus intense et plus précoce de l'IBMIR.

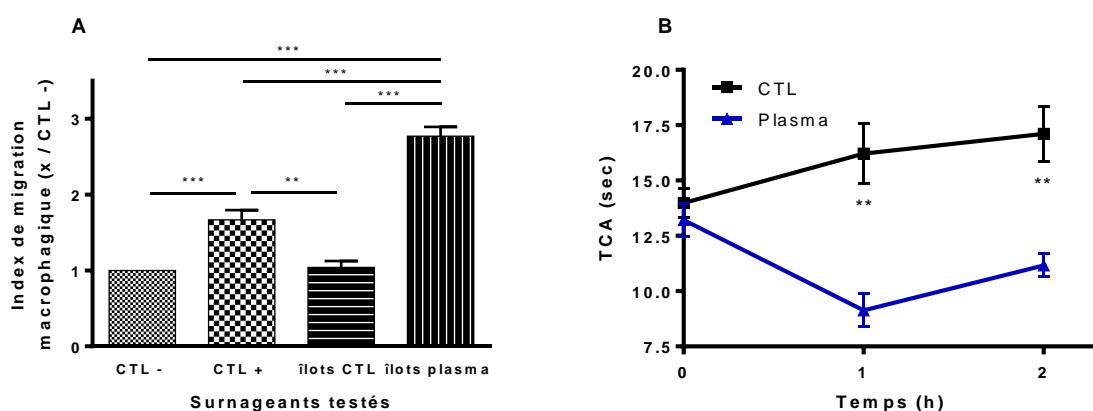


Figure 62 : Confirmation du déclenchement d'IBMIR

Chimiotactisme macrophagique (A) ($n=4$) ($***p<0,001$; $**p<0,01$) et temps de céphaline activée (n=5) (B) des îlots cultivés en condition contrôle et plasma ($**p<0,01$).

En conclusion, les gels de plasma présentent un intérêt pour la préservation des îlots en culture mais ne peuvent pas être utilisés *in vivo* car ils potentialisent les réactions inflammatoires. Dans l'optique de prodiguer aux îlots l'environnement idéal mais sans déclencher de réactions inflammatoires lors de la transplantation intra-portale, d'autres biomatériaux ont donc été évalués.

4.3 Screening des biomatériaux candidats

Afin de trouver le biomatériaux le plus adapté *in vitro* et *in vivo*, des tests de viabilité et de fonctionnalité ont été réalisés en première intention avec des îlots pancréatiques de rat. En parallèle, ces mêmes biomatériaux ont été implantés chez des rats sains pour évaluer leur biocompatibilité. L'utilisation de ces biomatériaux nous permettra également de comprendre ce qui dans le plasma est important pour l'îlot en utilisant plusieurs modèles de biomatériaux. Ceux-ci sont catégorisés comme suit : apport d'un support 3D (agarose, alginate, HPMC, PEG-DA, Dextran-PEG), apport d'interactions de type MEC (Dcr, Dcp, RGD), ou apport d'un support 3D et d'interactions de type MEC (acide hyaluronique, alginate-RGD, HPMC-Plasma, plasma gel, Dextran-PEG-RGD). Les îlots libres sont utilisés comme contrôle négatif et le plasma gel est utilisé comme contrôle positif.

4.3.1 Biocompatibilité des différents biomatériaux

Des tests de biocompatibilité ont été réalisés avec les bases des différents biomatériaux (agarose, alginate, PEG, HPMC, Dcr et Dcp). Après 30 jours d'implantation en sous-cutané ou dans l'omentum, les tissus sont marqués au trichrome de Masson. La référence en termes de biocompatibilité est le plasma gel : provenant du receveur, il doit être parfaitement biocompatible. En effet, le tissu implanté ne possède après 30j plus aucune trace du biomatériaux, aucune infiltration cellulaire anormale ou fibrose n'est à déplorer, que ce soit en sous-cutané ou dans l'omentum (Fig. 63A).

Pour les autres biomatériaux (Fig. 63B), l'HPMC est comme la fibrine parfaitement biocompatible puisqu'elle a complètement été assimilée par l'organisme du receveur. L'agarose et l'alginate sont retrouvés après 30 jours (plages vide et bleutées), une légère fibrose est observée mais elle n'est pas accompagnée d'infiltration cellulaire. En revanche, pour le PEG, la fibrose est plus importante et accompagnée d'une importante infiltration cellulaire. Pour le Dcp ou le Dcr, on observe une légère fibrose, avec une importante colonisation cellulaire.

Les différents biomatériaux semblent donc avoir une bonne biocompatibilité l'avantage étant donné au plasma gel et l'HPMC, complètement assimilés par l'organisme du receveur. Le PEG et les Dc(r ou p) semblent être les moins bio-assimilables.

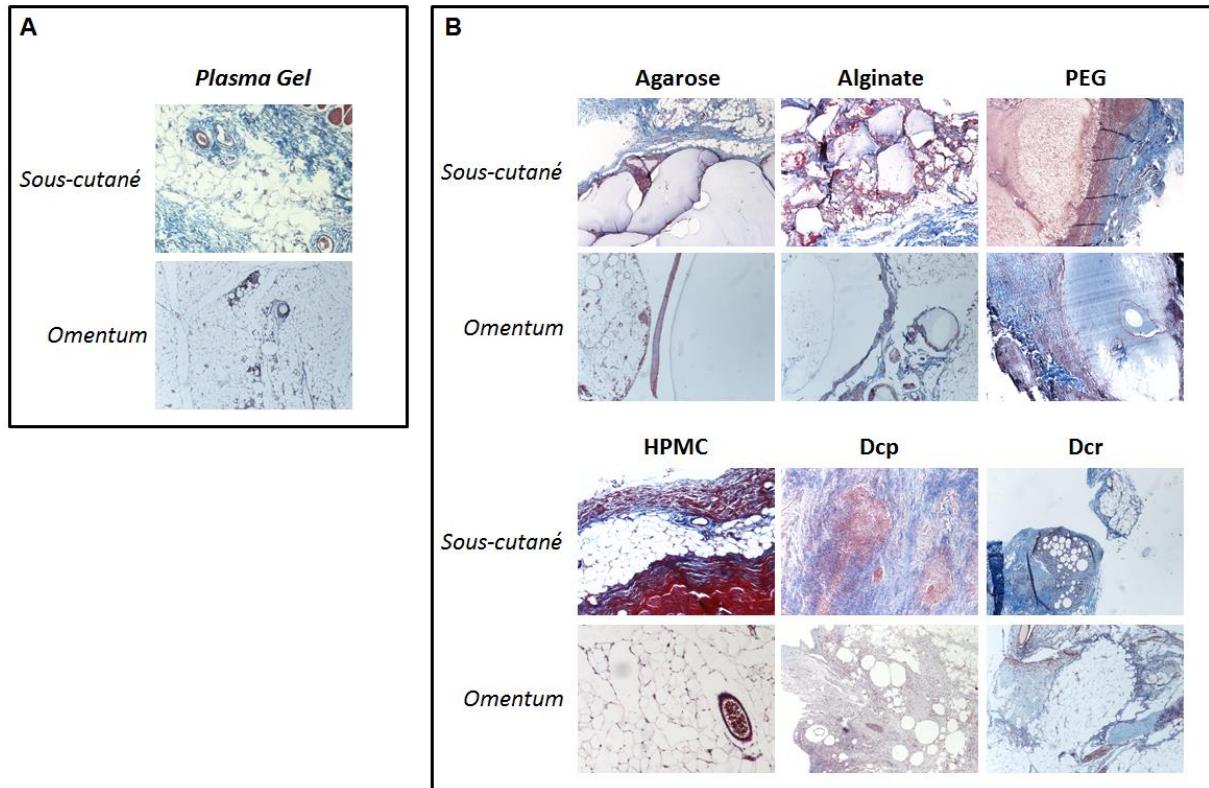


Figure 63 : Coloration au trichrome de Masson des zones d'implantation des biomatériaux

La référence utilisée ici est le plasma gel (A). Biocompatibilité des autres biomatériaux (ou bases utilisées par la suite) (B).

4.3.2 Viabilité et fonction des îlots cultivés en présence des différents biomatériaux

Il s'agit ici d'évaluer l'effet des biomatériaux sur la viabilité et la fonction des îlots pancréatiques de rat *in vitro*.

4.3.2.1 Groupe biomatériaux support

La viabilité et la fonction sont comparées au contrôle négatif (îlots libres, contrôle) et au contrôle positif (plasma gel). Une viabilité comparable est observée pour les conditions contrôle, plasma gel, agarose, alginate et HPMC. Une viabilité plus faible est observée pour

le Dex-PEG, Dex-PEG-RGD, alors qu'une forte perte de viabilité est obtenue pour le PEG-DA (Fig. 64A). La fonctionnalité est préservée dans toutes les conditions testées (index de stimulation supérieur à 1 ; contrôle : $4,74 \pm 1,50$; plasma : $3,61 \pm 0,41$; agarose : $2,36 \pm 0,70$; alginate : $4,28 \pm 1,71$; HPMC : $1,85 \pm 0,25$; dextran-PEG : $7,19 \pm 3,85$) sauf avec le PEG-DA, pour lequel la libération d'insuline après stimulation est significativement plus faible que le contrôle ($p < 0,05$) et l'index de stimulation est inférieur à 1 ($0,17 \pm 0,05$) (Fig. 64B), confirmant les résultats obtenus lors du test de viabilité.

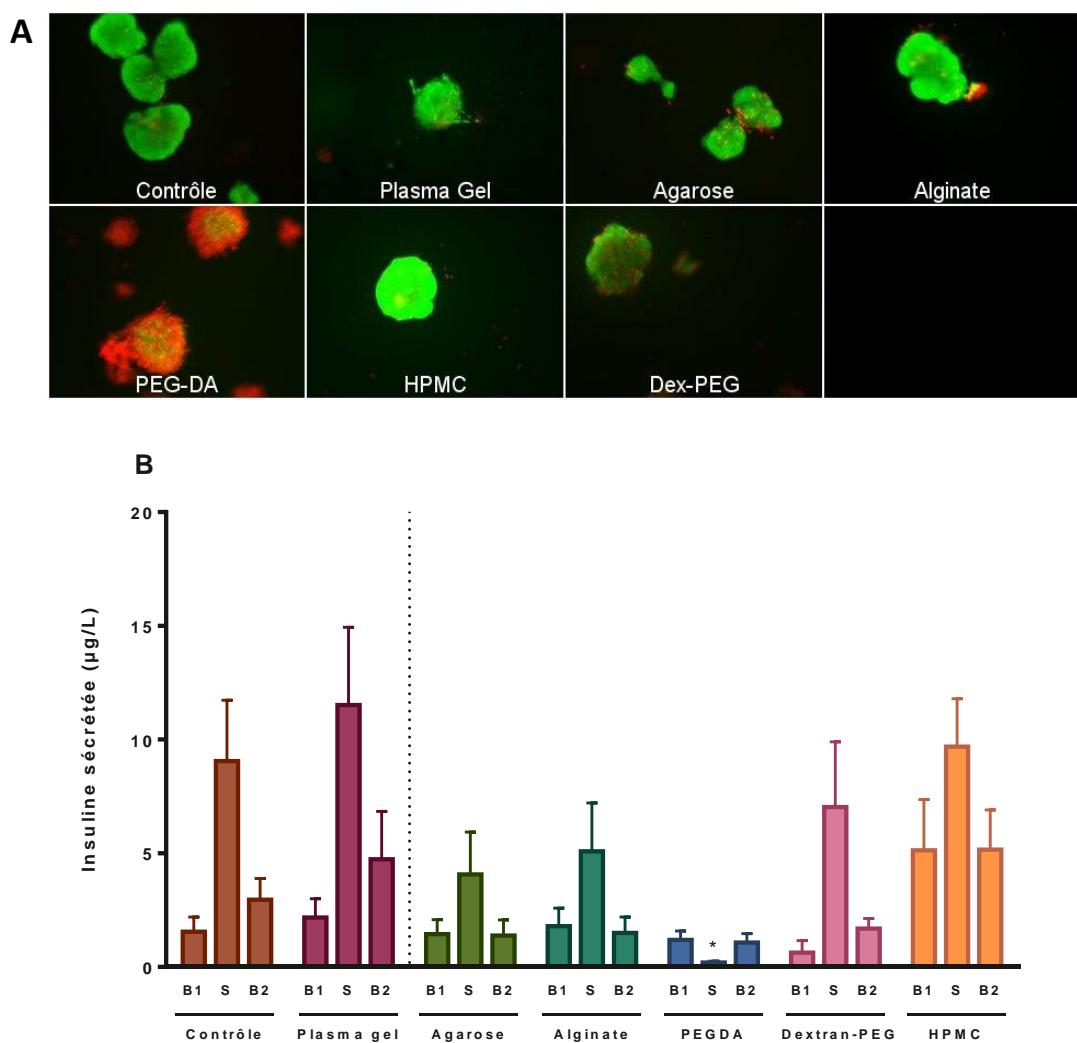


Figure 64 : Viabilité et fonction des îlots en présence des différents biomatériaux du groupe support 3D

La viabilité des îlots pancréatiques est appréciée visuellement (A), chaque photo est représentative d'une expérience effectuée au moins trois fois. Grossissement $\times 100$. La fonctionnalité des îlots est conservée dans toutes les conditions sauf avec le PEG-DA (B) ($n=3$ minimum). * $p < 0,05$ biomatériau stimulé vs. Contrôle stimulé.

4.3.2.2 Groupe biomatériaux interactions

La viabilité et la fonction sont toujours comparées au contrôle négatif et positif. La viabilité observée pour les conditions plasma gel et RGD est comparable au contrôle. Par contre, la viabilité est diminuée pour le Dcr et est nulle pour le Dcp (Fig. 65A). La fonctionnalité est comparable au contrôle pour toutes les conditions testées (index de stimulation supérieur à 1 ; contrôle : $4,74 \pm 1,50$; plasma : $3,61 \pm 0,41$; RGD : $7,16 \pm 2,58$; Dcr : $3,22 \pm 0,72$) sauf pour le Dcp avec une sécrétion d'insuline après stimulation significativement plus faible que le contrôle ($p < 0,05$) et un index de stimulation inférieur à 1 ($0,21 \pm 0,06$) (Fig. 65B), confirmant les résultats obtenus lors du test de viabilité.

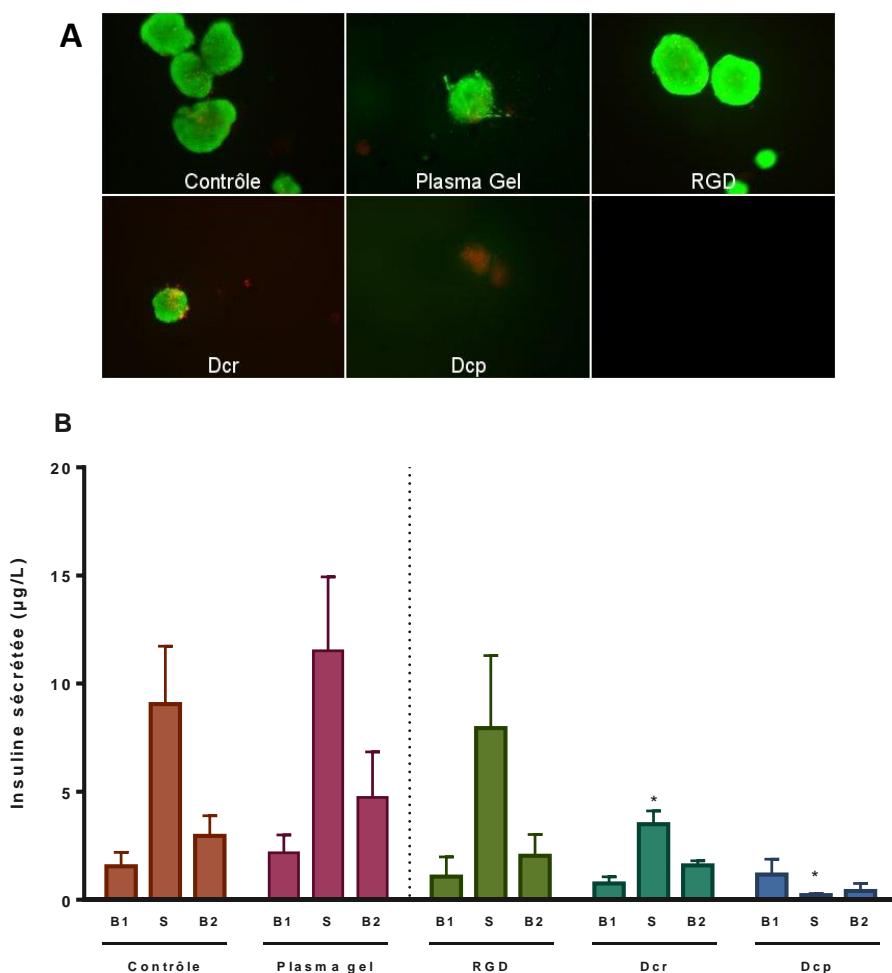


Figure 65 : Viabilité et fonction des îlots en présence des différents biomatériaux du groupe interactions

La viabilité des îlots pancréatiques est appréciée visuellement (A), chaque photo est représentative d'une expérience effectuée au moins trois fois. Grossissement $\times 100$. La fonctionnalité des îlots est conservée dans toutes les conditions sauf avec le Dcp (B). La réponse des îlots avec le Dcr ou Dcp est significativement plus basse (condition S) que dans les conditions contrôle ($n=5$). * $p < 0,05$ biomatériau stimulé vs. Contrôle stimulé.

4.3.2.3 Groupe biomatériaux support et interactions

La viabilité et la fonction sont comparées au contrôle négatif (îlots libre, contrôle) et au contrôle positif (plasma gel). Une viabilité comparable aux conditions contrôle est observée pour les conditions plasma gel, alginate-RGD, HPMC plasma et AH alors que la viabilité est diminuée pour le Dex-PEG-RGD (Fig. 66A). Une fonctionnalité correcte est observée pour toutes les conditions testées (index de stimulation supérieur à 1 ; contrôle : $4,74 \pm 1,50$; plasma : $3,61 \pm 0,41$; alginate-RGD : $15,09 \pm 7,69$; dextran-PEG RGD : $4,44 \pm 2,44$; HPMC plasma : $2,46 \pm 0,35$; acide hyaluronique : $5,42 \pm 1,98$) (Fig. 66B), confirmant les résultats obtenus lors du test de viabilité.

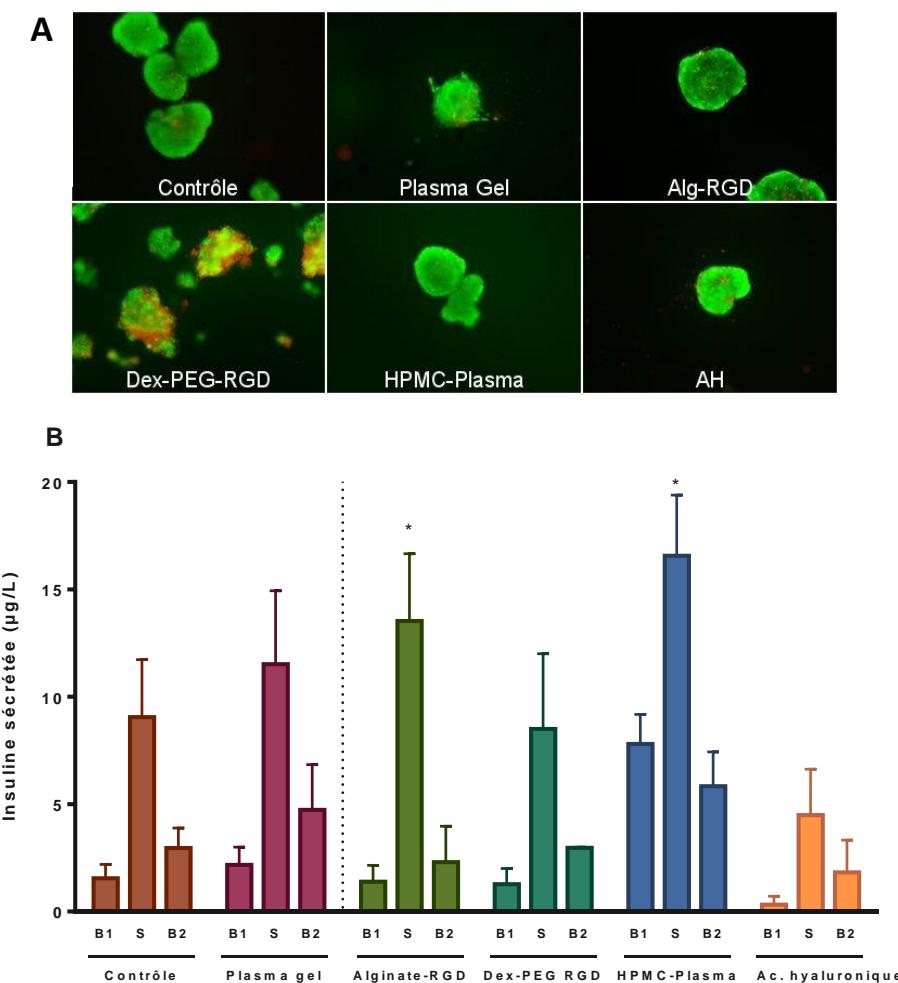


Figure 66 : Viabilité et fonction des îlots en présence des différents biomatériaux du groupe support 3D et interactions

La viabilité des îlots pancréatiques est appréciée visuellement (A), chaque photo est représentative d'une expérience effectuée au moins trois fois. Grossissement x100. La fonctionnalité des îlots est conservée dans toutes les conditions (B). La réponse des îlots dans l'alginate-RGD ou l'HPMC plasma est significativement plus élevée (condition S) que dans les conditions contrôle ($n=5$). * $p<0,05$ biomatériau stimulé vs. Contrôle stimulé.

4.3.2.4 Etablissement d'un classement des biomatériaux

Les résultats obtenus en termes de viabilité et fonction permettent déjà l'élimination des biomatériaux suivants dont l'efficacité n'a pas été démontrée : PEG-DA et Dcp.

D'autres biomatériaux ont été éliminés compte tenu des impacts limités démontrés ou de leur utilisation difficilement transférable en clinique. Ainsi, la viabilité diminuée à 24h dans le Dex-PEG ne permet pas une projection fiable à plus long terme. Pour l'agarose, qui nécessite un chauffage, on ne peut envisager une utilisation sécurisée de ce matériel en couplage avec des cellules vivantes. Pour le Dcr, la sécrétion d'insuline après stimulation est statistiquement diminuée par rapport au contrôle. De plus, le processus générant des particules, sa transposition lors d'une greffe intra-portale semble difficilement réalisable. Enfin, l'acide hyaluronique, bien qu'intéressant en terme de viabilité et fonction, a été écarté car la répartition de l'hydrogel après reconstitution n'étant pas toujours homogène, des ajustements doivent encore être réalisés lors de sa préparation (réalisé par le Centre de Transfert de Technologie du Mans, CTTM).

Compte-tenu de ces données, les biomatériaux sélectionnés sont pour le groupe support : l'alginate et l'HPMC ; pour le groupe interactions : les RGD ; pour le groupe support et interactions : l'alginate-RGD, et l'HPMC plasma.

4.3.3 Quantification de l'hypoxie dans les biomatériaux sélectionnés.

L'étude de HIF-1 α a été réalisée dans les biomatériaux sélectionnés. L'hypoxie est augmentée avec le plasma gel par rapport au contrôle ($p<0,05$). Une tendance est également observée lors de l'ajout de motifs RGD ($p=0,064$). Par contre, aucun des autres biomatériaux n'entraîne une augmentation de l'expression de HIF-1 α (CTL : $100\pm N/A\%$; plasma gel : $587,15\pm 293,14\%$; RGD : $152,45\pm 29,62\%$; alginate : $85,36\pm 20,19\%$; alginate-RGD : $80,90\pm 13,48\%$; HPMC : $143,70\pm 24,92\%$; HPMC plasma : $120,76\pm 21,97\%$) (Fig. 67). Ainsi, l'hypoxie ne semble pas être accentuée dans les matrices sélectionnées.

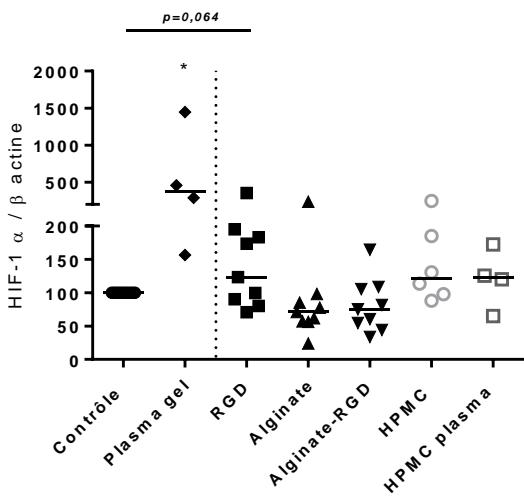


Figure 67 : Etude de l'hypoxie : expression d'HIF-1 α

Niveau d'expression de la sous-unité α 1 de HIF. Les barres représentent les médianes de chaque condition. ($n=4$ minimum). * $p<0,05$ vs. Contrôle.

4.3.4 Etudes des voies de survie dans les biomatériaux sélectionnés

L'étude réalisée sur le plasma a permis la sélection de plusieurs marqueurs intéressants pour la survie des îlots pancréatiques et les interactions avec la matrice. Ainsi, les intégrines, le ratio p-FAK/FAK, p-Akt/Akt et la caspase ont été étudiés.

L'expression des intégrines β 1 est augmentée dans le plasma gel par rapport au contrôle ($p<0,001$). Les autres biomatériaux testés ne permettent pas une augmentation significative de cette expression par rapport au contrôle (contrôle : $100\pm N/A\%$; plasma : $725,05\pm 324,13\%$; RGD : $139,94\pm 16,27\%$; alginate : $84,15\pm 30,84\%$; alginate-RGD : $122,64\pm 22,84\%$; HPMC : $105,24\pm 13,18\%$; HPMC plasma : $59,85\pm 12,38\%$) (Fig. 68A).

Le ratio p-FAK/FAK est augmenté dans le plasma gel par rapport au contrôle ($p<0,001$). Les autres biomatériaux testés ne permettent pas une augmentation significative de cette expression par rapport au contrôle (contrôle : $100\pm N/A\%$; plasma : $1915,06\pm 676,70\%$; RGD : $130,06\pm 13,74\%$; alginate: $163,85\pm 10,55\%$; alginate-RGD : $137,67\pm 13,80\%$; HPMC: $93,25\pm 7,30\%$; HPMC plasma : $91,92\pm 5,42\%$) (Fig. 68B).

Le ratio p-Akt/Akt est augmenté dans le plasma gel par rapport au contrôle ($p<0,001$). Les autres biomatériaux testés ne permettent pas une augmentation significative de cette

expression par rapport au contrôle (contrôle : $100 \pm N/A\%$; plasma : $8243,23 \pm 2055,76\%$; RGD : $182,57 \pm 35,70\%$; alginate : $174,13 \pm 28,57\%$; alginate-RGD : $245,00 \pm 70,87\%$; HPMC : $159,96 \pm 41,10\%$; HPMC plasma : $198,79 \pm 71,83\%$) (Fig. 68C).

Le niveau de caspase 3 activée est diminué dans le plasma gel, et l'HPMC-plasma par rapport au contrôle ($p < 0,001$). Les autres biomatériaux testés ne permettent pas une diminution significative de cette expression par rapport au contrôle (contrôle : $100 \pm N/A\%$; plasma : $19,48 \pm 1,57\%$; RGD : $106,27 \pm 4,30\%$; alginate : $89,09 \pm 4,00\%$; alginate-RGD : $77,44 \pm 8,31\%$; HPMC : $86,11 \pm 4,58\%$; HPMC plasma : $45,07 \pm 10,51\%$) (Fig. 68D).

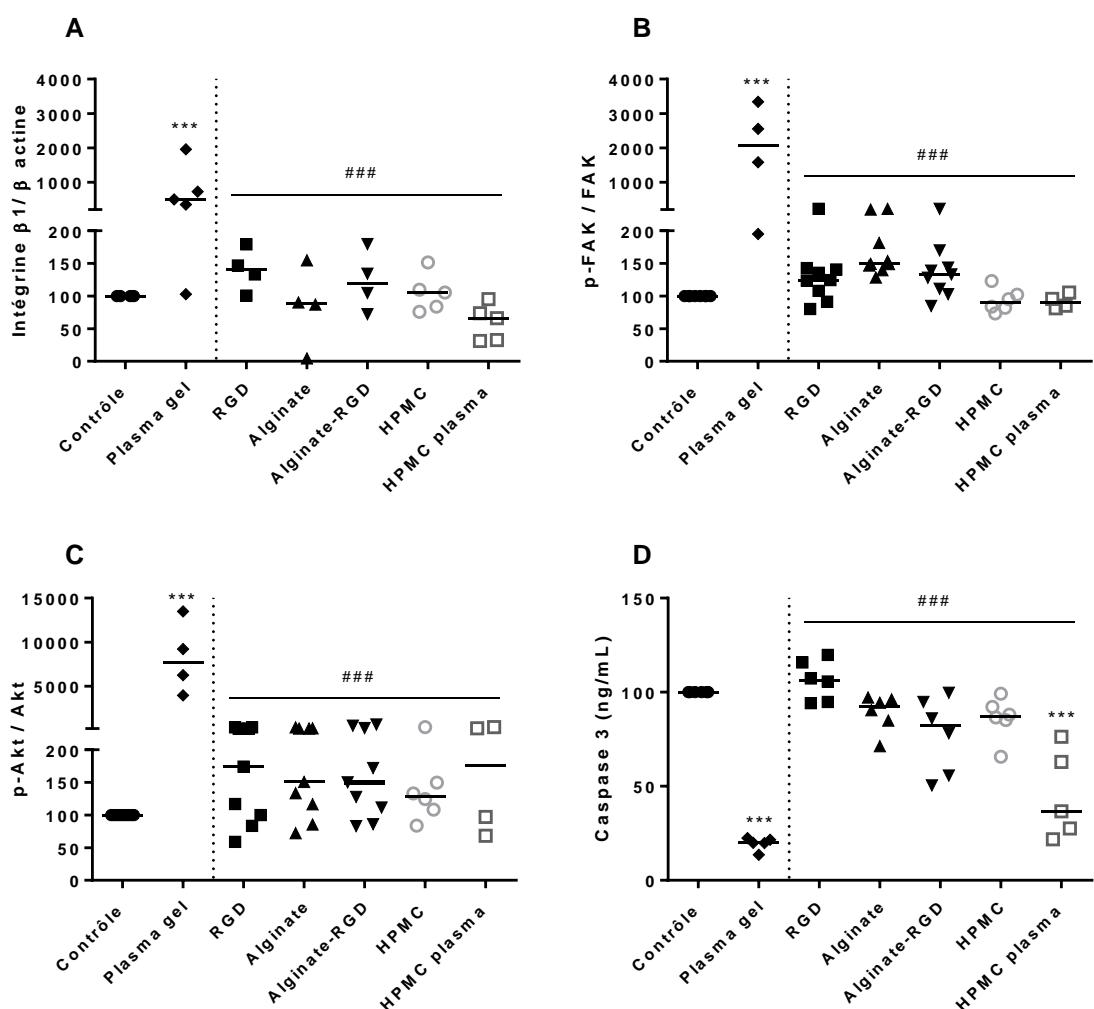


Figure 68 : Comparaison des biomatériaux sélectionnés : voie des intégrines

Niveau d'expression de la sous-unité $\beta 1$ des intégrines (A), du ratio p-FAK/FAK (B), du ratio p-Akt/Akt (C) et de la caspase 3 activée (D). Les barres représentent les médianes respectives de chaque condition. ($n=4$ minimum). *** $p < 0,001$ vs. Contrôle, ### $p < 0,001$ vs. Plasma gel.

Après les tests réalisés sur les biomatériaux sélectionnés, il s'avère que seuls les biomatériaux composés tout (plasma gel) ou en partie (HPMC plasma) de plasma permettent la diminution de l'apoptose dans les îlots. Le plasma gel reste le meilleur biomatériaux que nous ayons à disposition.

Pour mettre en évidence le composant du plasma permettant l'activation des intégrines nous avons comparé les résultats à ceux obtenus lors de l'utilisation d'un fibrinogène commercial polymérisé, comme le plasma gel, à la concentration de 10mg/mL. Les RGD permettent une augmentation d'expression des intégrines de $150\pm36\%$ (non significatif vs. contrôle); le fibrinogène commercial de $571\pm306\%$ ($p<0,01$ vs. contrôle) et le plasma gel de $725\pm324\%$ ($p<0,001$ vs. contrôle) (Fig. 69).

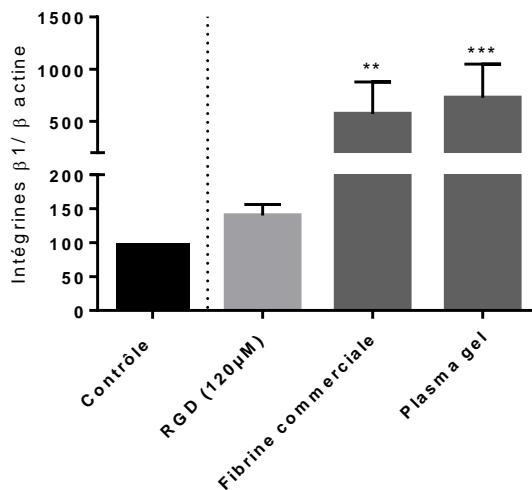


Figure 69 : Identification du composant permettant l'activation des intégrines

*Lorsque les îlots sont cultivés avec des RGD seuls, le niveau d'expression des intégrines est augmenté jusqu'à 150% mais de façon non significative. En revanche, l'utilisation de fibrinogène commercial permet une augmentation significative de l'expression des intégrines β1 (** $p<0,01$ vs. contrôle), cette différence est encore plus marquée avec le plasma gel ($n=6$). *** $p<0,001$ vs. Contrôle.*

Ainsi, que ce soit par l'apport d'interactions à l'aide des RGD, ou par l'apport d'un support 3D et d'interactions semblables au plasma grâce au fibrinogène polymérisé, aucune des conditions ne permet d'égalier totalement le niveau obtenu avec le plasma gel. Il faut cependant noter que ces deux composantes font partie intégrante des effets observés avec

le plasma gel (effet croissant) et que l'effet du fibrinogène semble majoritairement être à l'origine de la surexpression des intégrines $\beta 1$.

Afin de transposer les effets bénéfiques du plasma gel *in vivo*, il a fallu tester un autre site receveur pour la greffe d'îlots. Celui paraissant le plus adapté à la transplantation d'îlots avec leur matrice est l'omentum. Il permet notamment la conservation du gel de plasma et évite donc l'étape de libération des îlots du gel avec la plasmine.

4.3.5 Transplantation intra-omentale : technique du pochon

Les îlots cultivés dans le plasma ont été implantés sous la forme d'un pochon en intra-omental. Le suivi métabolique est réalisé sur 1 mois. Les résultats démontrent une fonction de greffe légèrement supérieure au groupe sham durant les 21 premiers jours avec un déclin progressif (J3 : sham : $83,17 \pm 7,13 \text{ pM/g.L}^{-1}$; plasma : $107,76 \pm 20,37 \text{ pM/g.L}^{-1}$; plasma + ePFD : $88,20 \pm 3,86 \text{ pM/g.L}^{-1}$; J21 : $75,69 \pm 2,18 \text{ pM/g.L}^{-1}$; plasma : $74,60 \pm 2,94 \text{ pM/g.L}^{-1}$; plasma + ePFD : $67,05 \pm 2,75 \text{ pM/g.L}^{-1}$) (Fig. 70A). La différence point par point n'est pas significative. En revanche, l'efficacité moyenne (moyenne des valeurs sur les 21 premiers jours) est significativement supérieure dans le groupe plasma et plasma + ePFD ($p < 0,01$) (Fig. 70B).

Les résultats semblent corrélés avec le gain de poids des rats, qui est stable pour le groupe plasma (J3 : $3,29 \pm 1,89 \text{ g}$; J31 : $3,44 \pm 1,16 \text{ g}$) et plasma \pm ePFD (J3 : $1,87 \pm 1,38 \text{ g}$; J31 : $5,11 \pm 1,79 \text{ g}$) mais qui diminue pour le groupe sham (J3 : $3,23 \pm 0,98 \text{ g}$; J31 : $-0,64 \pm 2,12 \text{ g}$) (Fig. 70C).

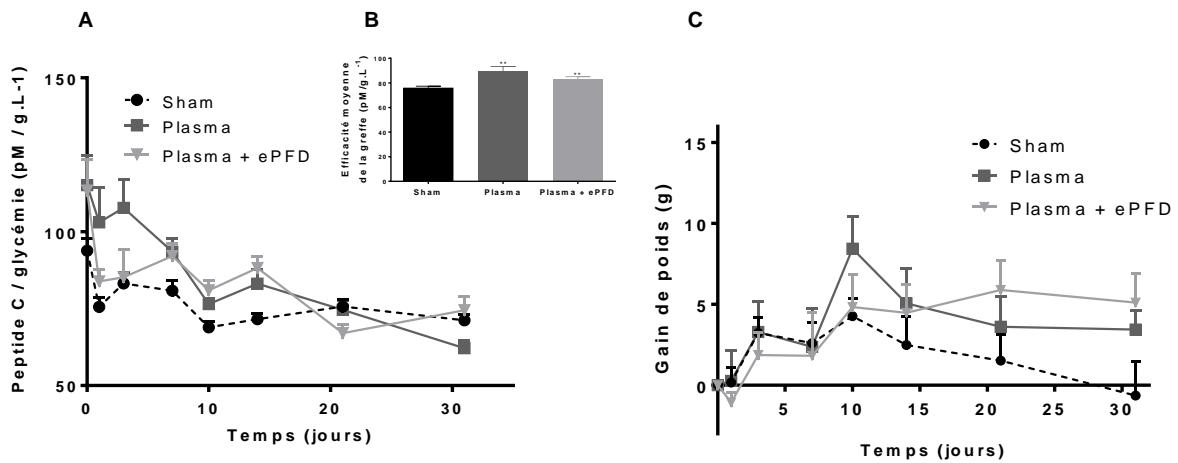


Figure 70 : Suivi métabolique après transplantation intra-omentale sous forme de pochon

Suivi sur un mois des niveaux de peptide C / glycémie à jeun chez des rats Lewis transplantés dans l'omentum (A), moyenne des efficacités sur 21 jours (B) et gain de poids des receveurs de greffe (C) ($n=7$). ** $p<0,01$ vs. Sham.

Malgré le réel bénéfice des matrices de plasma sur les îlots *in vitro*, leur efficacité *in vivo* reste à prouver. La technique en pochon ne semble pas adéquate à la fonction de la greffe. Considérant nos résultats *in vitro*, il est très probable qu'il y ait une diffusion insuffisante d'oxygène et/ou de nutriments au travers du gel expliquant la faible fonction de la greffe. En effet, l'épaisseur du gel (3-5mm), la diffusion plus lente de certaines protéines (VEGF, insuline) et une potentielle diminution de la diffusion d'oxygène pourraient expliquer la mort précoce des îlots *in vivo*.

4.3.6 Mesure de la diffusion de l'O₂ dans les matrices plasma gel et HPMC

Dans le but de vérifier que l'épaisseur du gel de plasma ne permettait pas un échange optimal entre le tissu receveur et les îlots greffés, nous avons testé la diffusion d'O₂ dans deux différents biomatériaux (plasma gel et HPMC). Les résultats obtenus (Fig. 71) en comparaison à un contrôle (diffusion de l'O₂ dans du milieu de culture liquide) permettent de mettre en avant la différence de temps d'équilibration de l'O₂ dans le plasma sous forme de gel. En effet, le temps de rééquilibrage (de 2 à 20% d'O₂) est de 20 min pour le contrôle, 31 min pour l'HPMC et 6h pour le plasma gel.

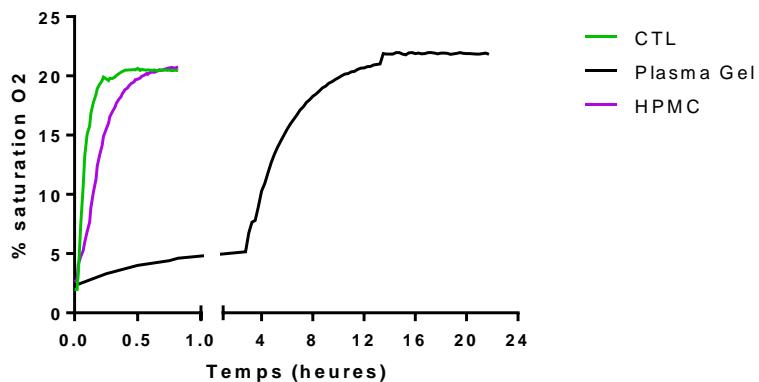


Figure 71 : Test de diffusion d'O₂ dans les biomatériaux

Après une nuit en hypoxie (2% O₂), la diffusion de l'oxygène est mesurée dans les différents biomatériaux en remettant les biomatériaux en normoxie. Le temps d'équilibration est comparé à un contrôle (milieu liquide).

La diffusion de l'oxygène, mais aussi des nutriments doit donc être perturbée lors de la greffe d'îlots sous forme de pochon. Dans le but de permettre aux îlots de disposer des bénéfices du plasma sans souffrir du manque de diffusion, un nouveau protocole chirurgical combiné aux matrices d'HPMC a été utilisé. En effet, les matrices d'HPMC additionnées ou non de plasma sont d'un point de vue technique parfaitement utilisables pour cette transplantation. De plus, l'HPMC plasma a permis de diminuer l'apoptose *in vitro*. L'HPMC seul, lui, servira de contrôle biomatériaux.

4.3.7 Transplantation intra-omentale : greffe intra-tissulaire

4.3.7.1 Suivi métabolique

La transplantation intra-tissulaire a été réalisée soit avec de l'HPMC seule (contrôle biomatériaux (n=7), soit de l'HPMC-Plasma (n=7). En guise de contrôle de la fonction des îlots, une transplantation intra-portale a été réalisée (n=5). Avant transplantation, quelques îlots (20 environ) sont conservés pour les analyses de viabilité et fonctionnalité pré-greffe. La viabilité est estimée >95% et l'index de fonctionnalité est de 8,67 (Fig. 72).

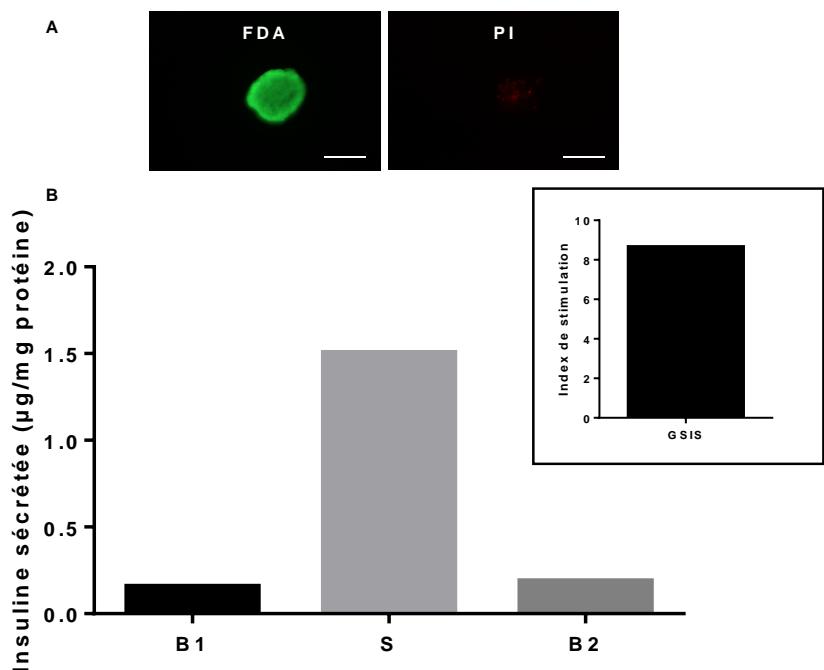


Figure 72 : Viabilité et fonctionnalité des îlots transplantés

La transplantation des îlots pancréatiques permet la réversion du diabète dans les trois groupes avec une diminution significative de la glycémie (J0 : Foie : $5,58 \pm 0,09$ g/L ; HPMC : $5,41 \pm 0,19$ g/L et HPMC-Plasma : $5,22 \pm 0,14$ g/L et J7 : Foie : $1,84 \pm 0,10$ g/L ; HPMC : $2,04 \pm 0,31$ g/L et HPMC-Plasma : $1,77 \pm 0,264$ g/L) ($p < 0,001$) (Fig. 73A) et une augmentation significative du taux de peptide C (J0 : Foie : $53,66 \pm 21,48$ pM ; HPMC : $60,00 \pm 18,76$ pM et HPMC-Plasma : $60,75 \pm 20,25$ pM et J7 : Foie : $999,46 \pm 112,59$ pM ; HPMC : $868,85 \pm 113,36$ pM et HPMC-Plasma : $1192,13 \pm 130,57$ pM) ($p < 0,001$) (Fig. 73B) par rapport au peptide C pré-greffe.

La greffe intra-omentale avec l'HPMC-Plasma démontre la même efficacité que la greffe intra-portale. En revanche, l'efficacité de la greffe intra-omentale est minorée lorsque l'HPMC est utilisée seule comme véhicule de transplantation : la glycémie est plus élevée et le peptide C plus bas (J42, glycémie ; Foie : $1,504 \pm 0,12$ g/L ; HPMC : $2,25 \pm 0,27$ g/L ; HPMC-Plasma : $1,49 \pm 0,16$ g/L et c-peptidémie ; Foie : $1366,05 \pm 117,31$ pM ; HPMC : $922,22 \pm 97,5$ pM ; HPMC-Plasma : $1523,53 \pm 159,46$ pM ; $p < 0,001$ HPMC vs. Foie et HPMC vs. HPMC-Plasma) ($p < 0,05$ J42-J62 HPMC vs. HPMC-Plasma).

Lorsque la greffe omentale est explantée (matérialisée sur les graphiques par Om. Expl.), la glycémie remonte à un niveau comparable à celui observé pré-greffe (J0 : HPMC : $5,41 \pm 0,19$ g/L et HPMC-Plasma : $5,22 \pm 0,14$ g/L ; J+11 : HPMC : $4,18 \pm 0,13$ g/L ; HPMC-Plasma : $4,63 \pm 0,35$ g/L). Il en est de même pour la c-peptidémie, qui rediminue après explantation (J0 : HPMC : $184,23 \pm 60,09$; HPMC-plasma : $155,15 \pm 26,10$; J+11 : HPMC : $363,10 \pm 38,00$; HPMC-Plasma : $367,20 \pm 70,66$).

Concernant le poids des animaux, tous les groupes montrent une prise de poids régulière et similaire tout au long de l'étude. Le groupe HPMC seule présente un gain de poids légèrement inférieur, mais les différences entre les groupes ne sont pas significatives sur la période J0-J62. Lorsque la greffe omentale est explantée, le gain de poids diminue dans les groupes HPMC et HPMC-Plasma et est significativement plus bas que dans le groupe foie ($p < 0,05$). (Foie : $379,67 \pm 5,06$ g ; HPMC : $345,54 \pm 9,45$ g ; HPMC-Plasma : $352,07 \pm 4,65$ g) (Fig. 73C).

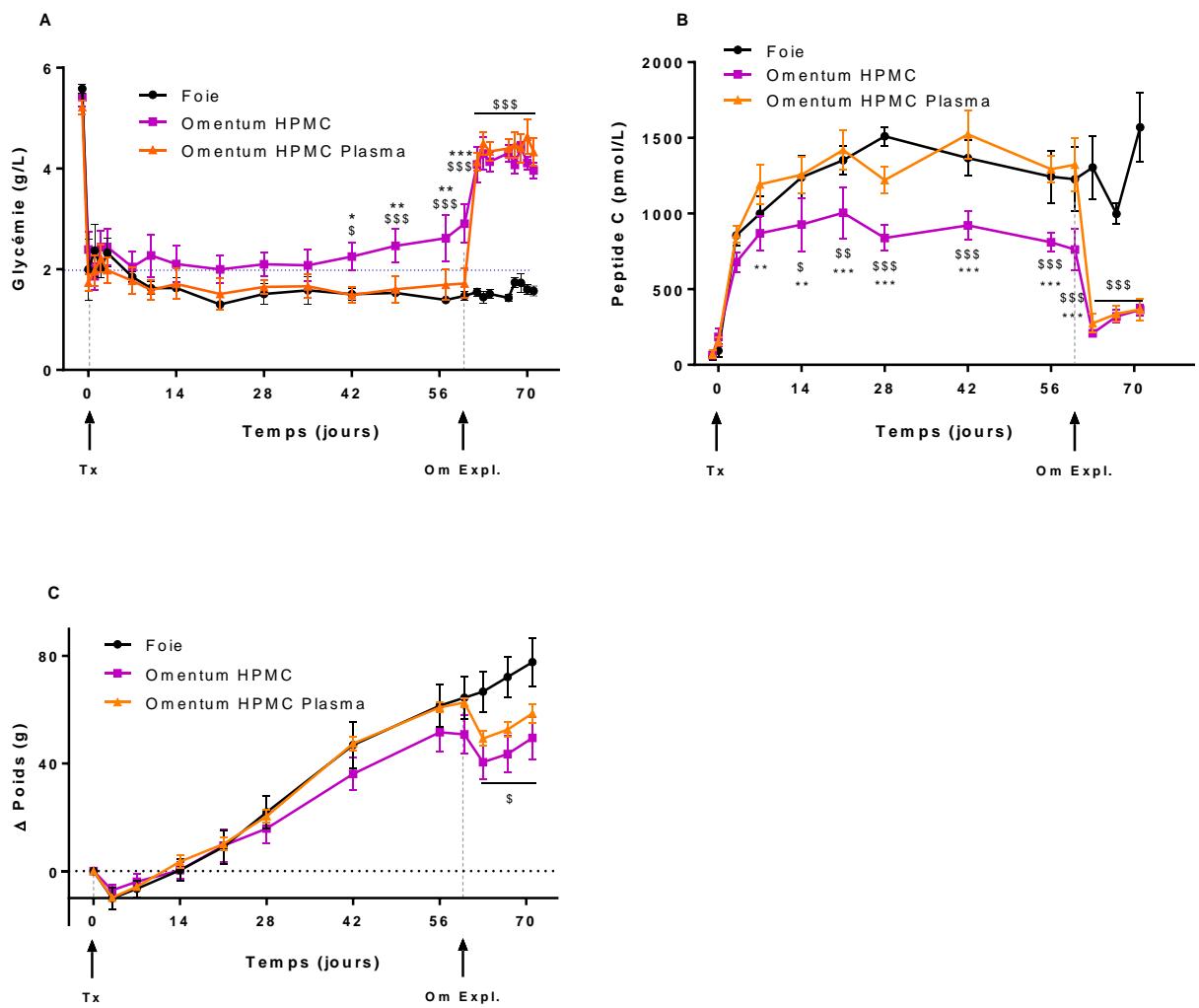


Figure 73 : Suivi métabolique des rats transplantés en intra-omental, injection intra-tissulaire

Glycémie (A), c-peptidémie (B) et gain de poids (C) des rats transplantés en intra-omental. La glycémie des rats baisse significativement après transplantation (Tx) ($p<0,001$ vs. J0 dans tous les groupes). Lorsque la greffe omentale est explantée (Om. Expl.), la glycémie des rats augmente à nouveau de manière significative par rapport à avant l'explantation ($p<0,01$) (A). Le même schéma est observé pour la c-peptidémie, avec une augmentation significative ($p<0,01$) après transplantation et une diminution dans les groupes omentum après explantation (B). Le gain de poids est régulier pour tous les groupes de la transplantation à l'explantation. Après explantation, le gain de poids des groupes omentum est significativement différent du groupe foie ($p<0,05$) (C) ($n=7$, HPMC et HPMC plasma ; $n=5$ foie). * $p<0,05$; ** $p<0,01$ et *** $p<0,001$ vs. omentum HPMC-Plasma ; \$ $p<0,05$; \$\$ $p<0,01$; \$\$\$ $p<0,001$ vs. Foie.

4.3.7.2 Tests de tolérance au glucose

Afin de vérifier la capacité des rats à réguler leur glycémie, des tests de tolérance au glucose (IpGTT) sont réalisés. Les IpGTT ont été réalisés aux temps 7, 14, 21, 28, 42 et 60 jours. Les profils représentent une fonction de la greffe normale pour tous les rats. En effet, un pic d'augmentation rapide de la glycémie est observé (15 min) suivi d'une diminution progressive de celle-ci jusqu'à un retour à des valeurs normales inférieures à <2g/L après 120 minutes. A 7j post-greffe (Fig. 74A), les rats des trois groupes présentent un profil normal (t_0 : Foie : $1,43 \pm 0,16$ g/L ; HPMC : $1,04 \pm 0,09$ g/L ; HPMC Plasma : $0,93 \pm 0,01$ g/L; $t_{15\text{min}}$: Foie : $3,98 \pm 0,43$ g/L; HPMC : $2,92 \pm 0,40$ g/L; HPMC Plasma : $3,23 \pm 0,06$ g/L et $t_{120\text{min}}$: Foie : $1,29 \pm 0,04$ g/L, HPMC : $1,13 \pm 0,05$ g/L ; HPMC Plasma : $0,97 \pm 0,06$ g/L). Les profils restent normaux jusqu'au 21^{ème} jour post-greffe (Fig. 74B-C). Au 28^{ème} jour post-greffe, les rats du groupe HPMC présentent une glycémie après 120min >2g/L (120min : Foie : $1,88 \pm 0,40$ g/L ; HPMC : $2,11 \pm 0,44$ g/L ; HPMC plasma : $1,61 \pm 0,35$) (Fig. 74D). La différence reste présente au 42^{ème} jour (Fig. 74E) mais est réellement marquée 60 jours après greffe. Les rats du groupe foie présentent une glycémie >2g/L après les 120min de test (Foie : $2,15 \pm 0,47$; HPMC : $3,22 \pm 0,67$; HPMC plasma : $1,86 \pm 0,31$) (Fig. 74F). Les aires sous la courbe (AUC) nous renseignent sur la capacité de la greffe à répondre rapidement et efficacement à une stimulation via un test d'IpGTT. Ainsi plus l'AUC est basse, plus la greffe est fonctionnelle. A 21j post greffe, l'AUC du groupe HPMC plasma est statistiquement différente des deux autres groupes (foie : $294,60 \pm 10,97$; HPMC : $313,17 \pm 22,26$ et HPMC plasma : $232,66 \pm 11,78$). Les autres temps ne sont pas statistiquement différents bien que le groupe HPMC plasma soit quasi systématiquement plus bas que les deux autres groupes, excepté pour le temps 42j (Fig 74G).

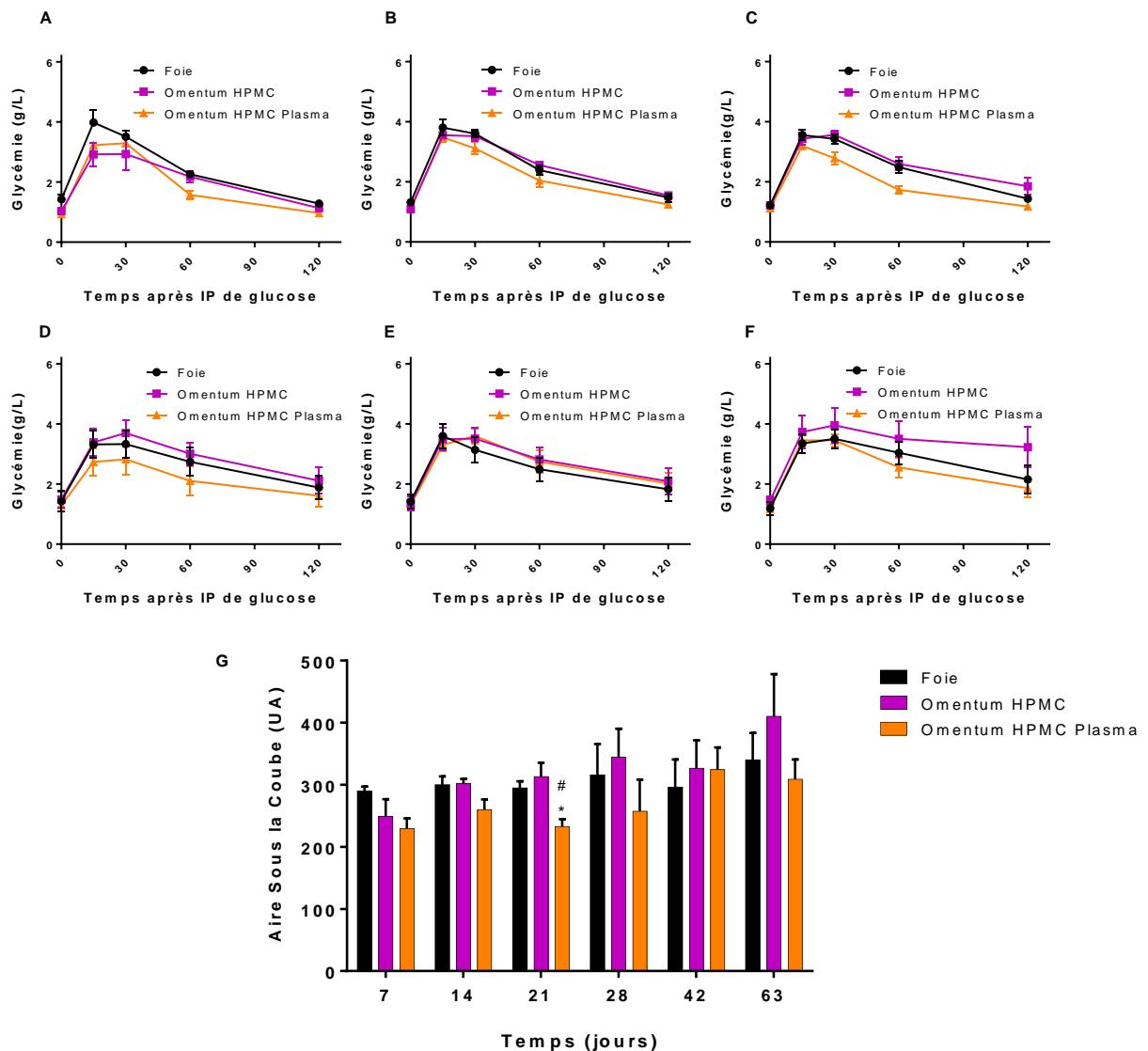


Figure 74 : Tests de tolérance au glucose des rats transplantés

Les tests de tolérance au glucose sont réalisés pour les trois groupes aux temps 7j (A) ; 14j (B) ; 21j (C) ; 28j (D) ; 42j (E) ; et 63j (F). Les aires sous la courbe sont représentées en G ($n=7$, HPMC et HPMC plasma ; $n=5$ foie).

* $p<0,05$ vs. Foie et # $p<0,05$ vs. HPMC.

4.3.7.3 Fructosamine

La fructosamine reflète l'équilibre glycémique d'un sujet. Plus celle-ci est élevée, plus sa glycémie et principalement ses fluctuations glycémiques sont importantes. Les rats diabétiques présentent un haut niveau de fructosamine (J0, avant transplantation ; Foie : $283,25 \pm 30,25 \mu\text{M}$; HPMC : $296,52 \pm 19,61 \mu\text{M}$ et HPMC plasma : $302,02 \pm 19,49 \mu\text{M}$). Après greffe, les niveaux sont significativement diminués (J63, deux mois après greffe ; Foie : $206,56 \pm 11,41 \mu\text{M}$; HPMC : $196,29 \pm 10,35 \mu\text{M}$; HPMC plasma : $179,49 \pm 17,25 \mu\text{M}$; ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$ vs. J0), indiquant l'établissement d'une greffe fonctionnelle avec un bon contrôle des fluctuations glycémiques. Après 70j pour les rats greffés en intra-portal et 7j après l'explantation pour les rat greffés en intra-omental, les niveaux sont respectivement conservés (t70j : Foie : $197,17 \pm 18,02 \mu\text{M}$, ** $p < 0,01$ vs. J0) ou ré-augmentés (t+7j : HPMC : $267,23 \pm 25,22 \mu\text{M}$; HPMC plasma : $267,01 \pm 28,79 \mu\text{M}$; # $p < 0,05$ vs. J63) (Fig. 75).

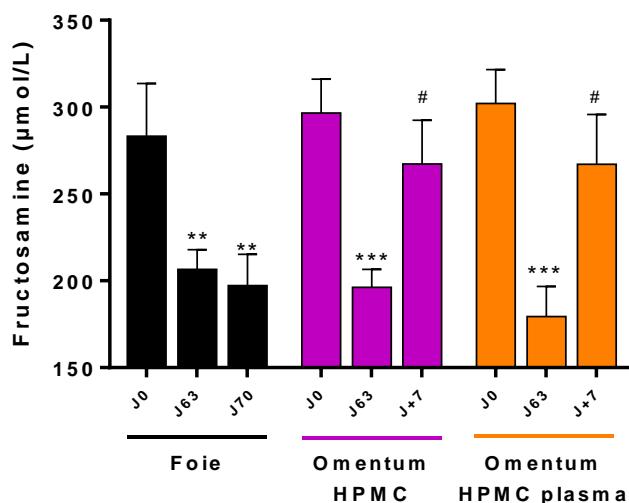


Figure 75 : Fructosamine plasmatique des rats transplantés

Taux de fructosamine plasmatique des rats avant transplantation, après 2 mois de greffe puis soit après 70j (groupe foie) ou 7j post-explantation (groupes omentum). Les taux basaux de fructosamine sont élevés, diminuent après transplantation et ré-augmentent au niveau de base après explantation (groupes omentum). Si la greffe n'est pas explantée, les niveaux restent bas (groupe foie) ($n=7$, HPMC et HPMC plasma ; $n=5$ foie). ** $p < 0,01$ vs. J0 ; *** $p < 0,001$ vs. J0 ; # $p < 0,05$ vs. J63.

4.3.7.4 Poids des omentums

Lors de l'explantation (groupes HPMC et HPMC-Plasma) ou au sacrifice (groupe foie), les omentums ont été pesés. Une différence significative est observée entre les groupes, le groupe HPMC-Plasma ayant un omentum d'un poids de $2,10 \pm 0,13\text{g}$; HPMC $1,57 \pm 0,15\text{g}$ et Foie $0,93 \pm 0,04\text{g}$ ($**p < 0,01$ HPMC-Plasma vs. HPMC ; $***p < 0,001$ HPMC-Plasma vs. Foie ; $p < 0,001$ HPMC vs. Foie) (Fig. 76).

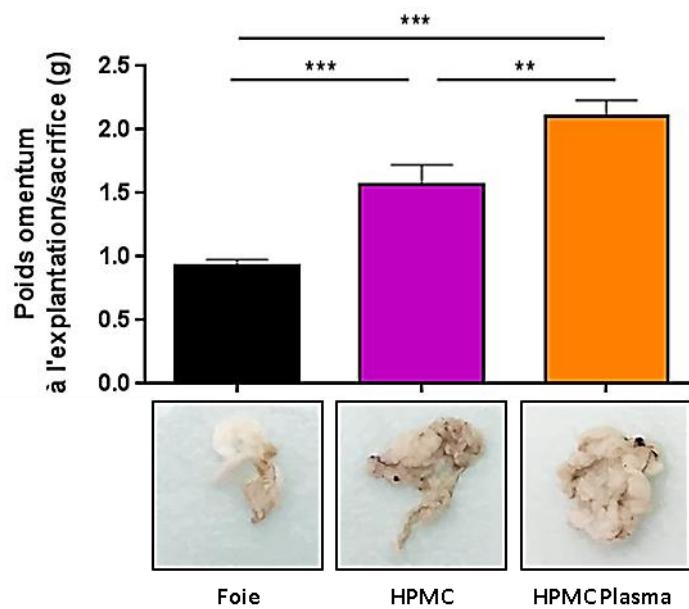


Figure 76 : Omentums au sacrifice : poids et aspect macroscopique

Les rats du groupe HPMC-Plasma ont un omentum plus lourd que les rats des deux autres groupes. Ceux du groupe HPMC ont un omentum plus lourd que le groupe foie. $**p < 0,01$; $***p < 0,001$.

4.3.7.5 Histologie

Les omentums et foies ont été inclus en paraffine. Des coupes d'organes ont été immuno-marquées pour visualiser l'insuline et les vaisseaux sanguins. Des îlots sont retrouvés dans toutes les conditions de greffe. La densité vasculaire à l'intérieur de l'îlot a été quantifiée, nous avons ainsi pu démontrer que les îlots greffés dans l'omentum avec l'HPMC plasma possèdent une vascularisation plus dense que les îlots des deux autres conditions (Foie : $1,14 \pm 0,27$ UA ; HPMC : $1,00 \pm 0,44$ UA ; HPMC plasma : $4,55 \pm 2,08$ UA) (Fig. 77).

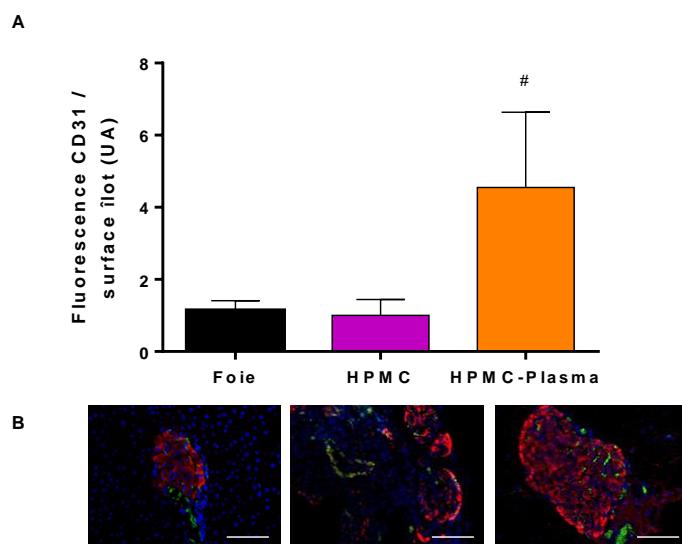


Figure 77 : Etude histologique et quantification de la densité vasculaire dans l'îlot transplanté

Quantification de la densité vasculaire par îlot (A) ; photos représentatives d'îlots transplantés : marquage insuline (rouge) et CD31 (vaisseaux, vert), de gauche à droite : foie, omentum HPMC et omentum HPMC plasma (B), $\#p < 0,05$ vs. HPMC. Echelle : $100\mu\text{m}$.

5 Discussion

Ce travail avait pour but de trouver un matériau biomimétique pour optimiser la transplantation d'îlots pancréatiques. Il nous a permis de démontrer la nécessité d'utiliser un support de culture pour les îlots, ainsi que l'importance de la nature et la composition du support. En effet celui-ci permet la préservation des îlots pour la greffe par la lutte contre l'anoïkis/apoptose. Ce travail nous a également permis de mettre en place un nouveau mode de transplantation dans un site alternatif grâce à une technique innovante : une greffe intra-tissulaire dans l'omentum.

La première étape de ce travail était de trouver un biomatériau capable de lutter contre l'anoïkis en culture. Nous avons montré qu'un système de culture basé sur un gel de plasma augmentait la survie des îlots *in vitro* et permettait de leur conférer une meilleure résistance à l'embolisation lorsque ceux-ci étaient implantés dans le foie. Cependant, l'utilisation des îlots cultivés dans cette matrice *in vivo* nous a confronté à un problème de taille. La transplantation intra-portale de ces îlots ne permettait en effet pas la restauration d'un bon contrôle métabolique à cause d'une IBMIR exacerbée et donc d'une destruction précoce de la greffe. C'est pourquoi nous avons défini un cahier des charges pour trouver un biomatériau adéquat. Le biomatériau se devait d'être aussi performant que le plasma gel *in vitro*, tout en ne déclenchant pas d'IBMIR *in vivo*. Néanmoins, aucun des biomatériaux testés n'a pu être aussi efficace que le plasma gel. Ne pouvant utiliser le plasma en transplantation intra-portale et pour transposer les bénéfices de la matrice de la phase *in vitro* vers la phase *in vivo*, nous avons opté pour l'utilisation d'un site alternatif : l'omentum. Après s'être confronté à une faible efficacité de la greffe lorsque le gel de plasma était placé sous forme de pochon dans l'omentum, il nous a fallu mettre au point la technique chirurgicale adaptée pour une transplantation intra-omentale. Celle-ci comprenant également la modification du gel de plasma afin de le rendre injectable, en utilisant de l'HPMC supplémentée en plasma. Les résultats obtenus sont équivalents à une greffe intra-portale sans les effets préjudiciables d'IBMIR, permettant de placer la greffe intra-omentale comme alternative potentielle à l'actuelle référence clinique.

5.1 Effets *in vitro* d'une matrice de référence : le plasma

Le maintien des contacts avec la matrice et donc l'activation des intégrines est essentiel pour la survie des îlots *in vivo* et *in vitro* (120). Nous avons montré qu'un support de plasma sanguin réticulé permettait le maintien de la morphologie des îlots et une diminution de la mort cellulaire. Ce plasma contient du fibrinogène qui est clivé par la thrombine permettant la formation de fibrine par polymérisation (121). Or, la fibrine n'étant pas un composant naturel de la MEC des îlots, nous avons vérifié dans un premier temps qu'il y avait une réelle connexion entre les îlots et leur nouvel environnement de plasma. En effet, la fibrine contient des séquences RGD (122) reconnues par la majorité des intégrines (123-125), notamment celles composées de la sous-unité $\beta 1$ (126). Ces interactions ont été décrites dans le processus de cicatrisation (127) et permettent l'adhésion des plaquettes (128). Ce travail nous a permis de démontrer que les cellules situées en périphérie des îlots sont en capacité d'interagir avec ces motifs contenus dans le plasma réticulé. La diminution de l'anoïkis grâce à l'activation de la voie des intégrines, à l'image de ce qu'il se passe dans le matrigel (125) ou le collagène (129), prouve que la relation îlots/matrice de plasma ou plus particulièrement îlots/fibrine existe.

La résultante de cette interaction est une activation de la voie des intégrines comme en témoigne l'augmentation significative de l'expression des ratios p-FAK/FAK et p-Akt/Akt. Cette voie de signalisation a été identifiée comme voie de survie par repression de l'apoptose (130, 131) grâce à l'inactivation des membres pro-apoptiques de la famille des Bcl-2 (132, 133). Dans notre étude, il en découle une réduction de l'anoïkis de 75% comme le démontre la diminution de l'activation de la caspase 3 initiatrice dans les îlots cultivés dans ces matrices de gel de plasma.

La structure particulière des îlots, composée de cellules organisées en amas, les rend également très susceptibles à l'hypoxie après isolement. En effet, l'oxygénation des cellules situées les plus au centre de l'îlot ne peut se faire que par diffusion passive, les vaisseaux natifs ayant été détruits au cours du processus d'isolement. Or, lorsque les îlots sont placés dans une matrice réticulée et donc dense, la diffusion de l'oxygène est ralentie. Les mesures

de diffusion réalisées montrent que par rapport à du milieu de culture classique, la disponibilité de l'oxygène pour les îlots dans une telle matrice est plus faible. Les conséquences sont, à court terme, l'activation des voies de l'hypoxie et à plus long terme, celles de l'apoptose comme le prouve l'augmentation du taux de ROS cellulaires, de HIF-1 α , et de FOXO-1.

Les ROS sont produites par une fuite au niveau de la chaîne de transport des électrons. En conditions d'hypoxie et donc lorsque l'oxygène est manquant, le défaut d'accepteur final provoque l'accumulation des ROS qui augmentent la cytotoxicité (134). Les défenses anti oxydantes des cellules β sont connues pour être les plus faibles de l'organisme (135). De ce fait, une exposition prolongée augmente l'apoptose (136) (137). Le CO₂ est également connu pour générer des ROS (138, 139). Piégé par la matrice, le CO₂, déchet métabolique produit par les îlots pourrait aussi expliquer l'augmentation des ROS dans les conditions plasma seul. Une partie de l'arsenal des défenses de l'îlot contre l'hypoxie consiste en la promotion de la vascularisation afin d'apporter l'oxygène manquant et dont l'acteur majeur est le facteur de transcription HIF.

La sous unité HIF-1 α du facteur de transcription est stabilisée par l'hypoxie et est ainsi transloquée dans le noyau. Il y active la transcription des éléments de réponse à l'hypoxie, dont le VEGF, un des acteurs principaux de l'angiogenèse. Dans nos conditions, l'augmentation d'HIF-1 α observée lors de la culture en gel de plasma n'est pas reliée à une augmentation de sécrétion de VEGF dans le milieu de culture. Il est probable que le temps d'étude soit trop court ou que les gels de plasma retiennent le VEGF, à la manière de la cinétique observée lors du test de fonctionnalité (rétention supposée de glucose augmentant la sécrétion d'insuline en phase basale 2). Une autre explication pourrait impliquer l'influence de la matrice sur le recyclage des récepteurs aux facteurs de croissance. En effet, il a été précédemment décrit que lors de l'activation des intégrines par la fibronectine (et donc possiblement par la fibrine), le recrutement à la membrane du récepteur au VEGF (VEGFR) est potentialisé (140). Le récepteur étant plus présent, le taux de VEGF circulant dans le milieu de culture pourrait être moins important car capté par ce dernier. Il serait intéressant de vérifier cette hypothèse par la quantification du récepteur au

VEGFR par western blotting par exemple. L'augmentation d'HIF-1 α , reste néanmoins préoccupante puisqu'elle peut aussi être à l'origine de l'activation de l'apoptose notamment lorsque FOXO est activé (141-143).

FOXO-1, a été décrit comme un facteur de transcription multipotent (144) qui pouvait être activé et transloqué dans le noyau en cas de stress oxydant et permettre l'activation de ses cibles (pro-apoptotiques notamment). Nous avons montré que le niveau de FOXO-1 était augmenté dans le noyau des cellules des îlots ce qui était corrélé avec l'augmentation des ROS et de la translocation de HIF, mais pas celle de l'apoptose. Par conséquent, le rôle et les voies de signalisation associées à FOXO-1, mériteraient d'être investiguées pour comprendre son rôle lors de la culture en plasma.

Ainsi, pour pallier aux problèmes d'hypoxie, nous avons supplémenté les gels de plasma avec 10% de perfluorodécaline émulsionnée (ePFD). La PFD peut solubiliser de grandes quantités de gaz : 35,5 mmol/L d' O_2 (vs. 2,2 mmol/L dans l'eau) et de 125,0 mmol/L de CO_2 (vs. 57,0 mmol/L dans l'eau) (114). Ainsi, son effet peut être double : apporter de l'oxygène aux cellules mais aussi piéger les déchets métaboliques comme le CO_2 par exemple (84, 145). Ainsi, l'ajout d'ePFD permet de contrecarrer les phénomènes d'hypoxie et de stress oxydant comme le montre la restauration d'HIF-1 α , des ROS et de FOXO-1 à des niveaux comparables au contrôle.

Pour conclure sur cette première étape, nous avons montré que pour permettre un réel bénéfice de ces matrices sur l'anoïkis, il fallait s'affranchir des potentiels effets néfastes pouvant être déclenchés à plus long terme par l'hypoxie avec l'utilisation de l'ePFD comme transporteur d'oxygène. D'autres alternatives peuvent être envisagées pour permettre la lutte contre l'hypoxie, ainsi des molécules telle qu'HEMO2life® développée par la société Hemarina (Morlaix, France) pourraient être utilisées. Cette molécule est une hémoglobine provenant d'*Arenicola marin*, un invertébré marin. Elles disposent d'une très grande affinité pour l'oxygène, elles peuvent en effet transporter 156 molécules d' O_2 , contre 4 pour l'hémoglobine humaine. La pression partielle de l'oxygène nécessaire pour saturer 50% des sites en oxygène de l'HEMO2life® est de 7mmHg, soit 3,2 fois plus faible que celle de

l'hémoglobine humaine (23mmHg). Elle présente aussi l'avantage de libérer l'oxygène selon un gradient fournissant à l'environnement la juste quantité d'oxygène nécessaire sans créer d'hyperoxie et possède des propriétés anti-oxydantes pouvant être intéressantes (146). Cette molécule a déjà fait ses preuves tant en conservation d'organe (147) qu'en utilisation sous forme liquide avec des îlots de rats (148). Il serait intéressant de combiner l'utilisation de cette molécule à l'approche matricielle pour permettre une diminution de l'hypoxie plus physiologique à long terme.

5.2 Transplantation intra-hépatique des îlots cultivés dans le plasma

Dans la littérature, les études réalisées sur l'optimisation de la viabilité des îlots grâce à des matrices ne comportent jamais de validation sur un modèle de transplantation hépatique alors qu'il représente à l'heure actuelle, le site de référence en clinique. La voie intra-portale ne permet pas la co-transplantation des îlots et de leurs matrices. Les études réalisées jusqu'à présent ont utilisé des matrices soit non dissolvables, ou dissolvables par des agents toxiques pour les îlots. L'application clinique devient alors impossible. Par exemple, le collagène ou le matrigel, matériaux ayant prouvé leur efficacité sur le maintien de l'îlot en culture (129, 149), ne peuvent pas être utilisés en vue d'une greffe car leur dissolution nécessite l'utilisation d'une collagénase, délétère pour les îlots. C'est une des raisons qui a motivé le choix du plasma. Les gels de plasma présentent l'avantage d'être dissolvables par la plasmine, dont nous avons montré l'innocuité sur les îlots. Grâce au gel de plasma, il devient donc possible de valider l'impact de la diminution de l'anoïkis pendant la culture des îlots sur la survie du greffon dans un modèle de transplantation hépatique

Dans notre étude, lorsque les îlots avaient été cultivés préalablement en matrice, nous avons montré une absence de lyse massive au moment de l'infusion dans la veine porte. Ce bénéfice est probablement dû à une meilleure résistance mécanique obtenue grâce à la préservation de la structure via la matrice (150), des contacts internes cellules/cellules et cellules/membrane basale (151) ou encore par la création de contacts cellule/matrice (56, 152).

En revanche, l'étude métabolique à long terme n'a pas permis de mettre en avant le réel effet bénéfique de la culture en matrice, à cause d'un phénomène concomitant générant la perte rapide de la greffe. Cette perte est causée par une potentialisation d'IBMIR engendrée par les îlots cultivés en plasma, comme le montre l'activation du complexe thrombine antithrombine, associée à une infiltration plus rapide des cellules de l'immunité au sein de l'îlot. En effet, la fibrine est un acteur majeur de l'IBMIR, réaction largement décrite dans la transplantation d'îlots (68, 153, 154) qui engendre l'activation plaquettaire et donc la destruction de la greffe. En plus de la nécessité d'obtenir des îlots libres, la nature pro-inflammatoire de la matrice nécessitait sa dissolution. Cependant, malgré cette dissolution enzymatique du plasma, permettant théoriquement d'éliminer la fibrine, des résidus peuvent rester attachés aux intégrines (85), ce qui accélère et augmente l'IBMIR et détruit donc les îlots.

En conclusion, l'utilisation du plasma gel ne peut pas être envisagée lors d'une transplantation intra-portale. Ainsi, d'autres biomatériaux dissolvables ont été testés.

5.3 Recherche d'un biomatériau de substitution

La première phase a consisté à tester la biocompatibilité et l'innocuité des différents biomatériaux sur les îlots. Ceci a permis d'éliminer d'emblée certains candidats comme le PEG-DA, le Dcp, le Dcr et le dextran-PEG. D'autres, comme l'agarose ou l'acide hyaluronique par exemple ont été mis de côté pour raisons techniques.

Le PEG-DA s'est révélé être réellement toxique pour les îlots puisqu'il diminuait drastiquement leur viabilité et inhibait leur fonction. De plus lors de l'implantation de ce biomatériau chez des rats sains, une fibrose accompagnée d'une infiltration cellulaire a été constatée. Ces résultats sont d'autant plus surprenants que la majorité des études utilisant le PEG-DA prouve son efficacité sur la survie des îlots en culture et transplantés (155). La concentration en PEG-DA peut être critique. Le PEG-DA devient toxique sur des fibroblastes pour des concentrations de 15% (156). Or, il est utilisé ici à 5%, donc il semble peu probable que le PEG-DA soit à l'origine de la mort cellulaire. Les concentrations en igracure, le photo-

initiateur UV, sont en revanche 10 fois plus élevées que dans la littérature (157). Le choix de cette concentration a été dicté par la volonté de diminuer le temps d'exposition aux UV, puisque qu'une exposition prolongée montre des effets délétères sur les cellules (158). Ainsi le temps d'exposition est réduit de 10 minutes à 3 minutes. Malheureusement, l'igracure en excès va être transformé en radicaux libres par les UV, provoquant non seulement la polymérisation du gel mais aussi la diminution du pH. Les radicaux générés sont hautement instables et vont apporter des modifications lipidiques, protéiques et nucléiques (déstabilisation de la membrane et alkylation de l'ADN) aux cellules (159). Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait réaliser une gamme de concentrations croissantes en igracure, et tester la viabilité des îlots. Pour pousser plus en détails les causes de la toxicité, des marquages des ROS, l'expression des enzymes pro- et anti-oxydantes comme la catalase, la super-oxyde dismutase ou encore la glutathionne peroxydase (160) pourraient être étudiées.

Les pancréas décellularisés, bien que prometteurs, se sont révélés inefficace (sécrétion d'insuline diminuée avec le Dcr) ou毒ique (Dcp) vis-à-vis des îlots. La toxicité observée pourrait être due à des résidus de SDS contenus dans les mailles de la MEC décellularisée (86). Il conviendrait donc d'ajouter une étape de rinçage plus longue et/ou plus efficace dans le procédé afin de vérifier cette hypothèse. Le protocole de décellularisation pour le pancréas de porc et de rat est identique alors que le tissu lui-même est très différent. Ainsi, il est possible que le protocole soit plus efficace sur le rat que sur le porc. De plus, il a été montré que certains épitopes de la matrice de porc sont très réactifs et sont résistants à la décellularisation pouvant ainsi provoquer des réactions croisées néfastes entre MEC décellularisée et îlots (89). Aussi, leur utilisation comme simples particules apportant des interactions n'est sans doute pas la bonne approche. Des essais ont été initiés au laboratoire avec en perspective la réalisation d'un hydrogel à base de pancréas décellularisés. Pour le moment, les essais réalisés en interne ont été infructueux. Par contre, une collaboration avec un institut spécialisé dans la réalisation d'hydrogel a été entreprise (Institut Fraunhofer, Munich, Allemagne).

L'agarose est, quant à lui, mis de côté car sa préparation nécessite un chauffage à haute température pour sa dissolution (température de fusion : 90°C) pouvant, si son utilisation est mal maîtrisée, endommager les îlots. Le type d'agarose joue également un rôle, les températures de fusion et de gélification pouvant être différentes. Ainsi, certains agaroses (low melting agarose) ont une température de fusion plus basse (<60°C), mais malheureusement leur température de gélification est également basse (<20°C). À 37°C, la température de culture, le gel sera donc toujours sous forme liquide et ne peut donc pas être utilisé comme support 3D.

L'acide hyaluronique, bien qu'intéressant, a également été écarté pour cette étude. Des ajustements techniques sont à prévoir avec le fournisseur pour obtenir un gel homogène après reconstitution. En attendant, d'autres alternatives peuvent être testées. L'acide hyaluronique est effectivement un biomatériau très utilisé dans la chirurgie esthétique de comblement ou encore dans la lubrification des articulations en remplacement de la synovie. Des produits déjà commercialisés comme par exemple le Juvéderm® (Allergan™, Pringy, France), utilisé en comblement, ou le Synoz® (Kyeron, Enschede, Pays-Bas) utilisé comme lubrifiant articulaire, pourraient être testés avec les îlots. Concernant Juvéderm®, des tests ont été initiés au laboratoire mais la texture des matrices ne semble pas assez homogène et donc inadaptée pour la culture d'îlots.

Les biomatériaux présentant les meilleurs résultats en termes de préservation de la fonction des îlots étaient les RGD, l'alginate, l'alginate-RGD, l'HPMC et l'HPMC-plasma. De plus, la sélection de ces matrices avait pour objectif de déterminer les éléments essentiels au maintien des îlots en culture. Si le maintien de la structure est suffisant pour préserver les îlots, alors l'utilisation d'un support inerte, tel que l'alginate peut être envisagée. Si les motifs RGD de la fibrine sont nécessaires et suffisants pour apporter les effets bénéfiques, alors leur utilisation dans un milieu de culture pourrait être une option. Enfin, si les motifs RGD doivent être combinés à un soutien mécanique pour fournir un effet significatif, alors leur utilisation en combinaison avec une matrice inerte devrait être équivalente au plasma.

L'utilisation d'alginate n'a pas montré de bénéfice sur la survie des îlots, même si en termes de rhéologie, le gel d'alginate est très proche du plasma. La fonction support permettant la préservation de la structure ne semble donc pas suffisante pour limiter les pertes dues à l'anoïkis. L'alginate fonctionnalisé avec des motifs RGD, réunissant les fonctions support et interaction, ne permet pas non plus d'activer la voie des intégrines. La concentration utilisée ici et recommandée par le fournisseur, soit 120µM, avait déjà permis d'observer des effets sur des cellules comme les myoblastes (161), les chondrocytes (162), les osteoblastes (163), ou encore les cellules β (140). Malgré tout, il est possible que pour obtenir un effet sur l'îlot, amas de cellules, la concentration en RGD ne soit pas suffisante pour permettre l'établissement d'un réel contact avec l'alginate-RGD. Cette hypothèse semble confirmée par le fait que les RGD libres à la même concentration n'activaient pas non plus la voie de survie. Dans le but de vérifier cette hypothèse, une concentration plus élevée de RGD devra être testée (300µM). De plus, physiologiquement, la MEC sert de réservoir pour les facteurs de croissance (140), le plasma gel contient également ces facteurs, permettant donc une situation très proche de l'environnement initial. Les biomatériaux comme l'alginate-RGD eux, ne contiennent pas ces éléments. Ainsi, l'utilisation d'alginate, de RGD libres ou d'alginate-RGD ne permet pas d'obtenir une diminution de l'anoïkis à l'image des effets du gel de plasma. L'établissement d'une matrice biomimétique n'est donc pas simple et nécessite de comprendre de nombreux paramètres qu'il sera indispensable de maîtriser pour établir la matrice idéale. Ainsi, l'apport d'une fonction de support tridimensionnel et des motifs de la MEC en quantité suffisante semble devoir être combinés à d'autres composants. Pour se faire, la consistance et la composition doivent être parfaitement maîtrisées ce qui nécessite un travail de bio-ingénierie complexe ne pouvant être réalisé qu'avec des spécialistes du domaine.

L'HPMC est un biomatériau développé par l'un de nos partenaires industriels (CTTM), et permettant l'obtention d'un gel pour la culture des îlots. L'HPMC seul ne contient pas de motifs de la MEC ; il ne permet pas, en théorie, d'activer la voie des intégrines. Pour pouvoir apporter tous les composants bénéfiques du plasma, les hydrogels ont été supplémentés avec ce dernier. Malgré tout, aucune surexpression des intégrines n'était visible.

Les intégrines sont des récepteurs à stimuli pharmacologiques (comme les RGD), mais également mécaniques. L'activation de la FAK et de la voie de survie est potentialisée quand les deux stimuli sont réunis (140). Ainsi lors de la culture sur un support rigide contenant des ligands des intégrines comme par exemple le plasma gel, le stimulus mécanique combiné à la présence de motif RGD en concentration suffisante active fortement la voie des intégrines. De plus, il est décrit que lors d'une culture en support rigide, l'interaction intégrine-MEC est forte et permet une activation continue de la voie. En conséquence, lorsque la culture est réalisée sur un support mou présentant une force mécanique moindre, le stimulus mécanique est absent et la liaison intégrine-ligand est plus faible. Une rigidité d'au moins 20kPa.s^{-1} semble être importante pour le maintien d'une mécano-réponse suffisante (164). L'HPMC utilisée possède une viscosité de $7,5\text{Pa.s}^{-1}$ à 1,5% et ne permet donc pas le déclenchement de ces stimulus mécaniques. Il est connu que la rigidité de la matrice affecte l'activité et le recyclage des intégrines (165). De plus, lors d'une liaison faible et en présence de motifs Fibronectine-like (comme les RGD contenus dans le fibrinogène du plasma), il est décrit qu'en interaction avec les syndecan-4, les intégrines sont facilement endocytées et envoyées vers les endosomes de recyclage (166), ce qui pourrait expliquer la diminution d'expression des intégrines $\beta 1$ observée avec l'HPMC plasma.

Compte tenu de sa viscosité, l'HPMC plasma ne permet donc pas la potentialisation de l'expression des intégrines $\beta 1$ contrairement au plasma gel. De plus, une autre différence majeure existe entre le plasma gel et l'HPMC plasma ; la polymérisation ou non du fibrinogène en fibrine. Il se peut que l'exposition et la disponibilité des motifs RGD, substrats des intégrines, contenus dans le plasma soient plus accessibles lorsque la fibrine est polymérisée (forme fibrine) contrairement à sa forme non polymérisée (fibrinogène). Si l'on considère l'exemple de la fibronectine, les formes simples produites par le foie ou les fibroblastes sont initialement dans une conformation fermée qui se fixe assez mal aux intégrines car la séquence RGD n'est pas facilement accessible. Il a notamment été démontré que l'adsorption de cette fibronectine à des matrices de collagène par exemple provoque un changement conformationnel qui accroît sa capacité de liaison aux cellules (167). Il est donc vraisemblable qu'un phénomène similaire puisse se produire avec la fibrine sous forme de fibrinogène ou de polymère de fibrine (168). L'analyse des intégrines extraites

d'îlots cultivés avec de la fibrine commerciale polymérisée ou du fibrinogène liquide permettrait d'obtenir la réponse.

Ainsi, les voies de signalisation activées lorsque les îlots sont cultivés en plasma gel ou HPMC plasma semblent différentes. Le plasma gel permet une diminution effective de l'anoïkis via l'activation de la voie des intégrines, alors que l'HPMC plasma lui permet une diminution de l'apoptose qui ne semble à première vue pas reliée aux intégrines. Les facteurs de croissance et hormones présents dans le plasma sont connus pour activer des voies de survie (169, 170) et expliquerait la diminution de l'apoptose observée avec l'HPMC plasma. La signalisation croisée existante entre les intégrines et les récepteurs aux facteurs de croissance (EGF, VEGF), peut également appuyer les différences observées entre plasma gel et HPMC-plasma. La structure rigide du gel de plasma permettrait potentiellement d'activer plus de voies de survie via l'augmentation du nombre de récepteur aux facteurs de croissance présents au niveau de la membrane (recrutement à la membrane) (140). La structure rigide permettrait donc, en plus de l'effet anti-anoïkis, la potentialisation de l'effet anti-apoptotique observée avec l'HPMC plasma. Il reste néanmoins probable que le plasma dans l'HPMC module la voie de l'anoïkis mais que ses effets ne soit pas détectables au sein de la voie de signalisation à cause de la faible liaison intégrine/matrice.

Ainsi, avec l'HPMC plasma, la voie des intégrines ne semblait pas activée, mais la caspase 3 et donc l'apoptose est diminuée. Cet aspect représente donc un avantage indépendant de la diminution de l'anoïkis, ce qui amène à penser que si l'on combine le plasma à une structure plus rigide apportant les stimuli mécaniques, les îlots seront alors dans des conditions idéales, permettant encore la diminution de la perte observée en culture.

Ces deux biomatériaux que sont le plasma gel et l'HPMC plasma sont donc ceux ayant le plus de potentiel pour lutter contre la perte d'îlots en culture. Il semblerait toutefois que seule la combinaison structure 3D rigide et interactions puisse lutter efficacement contre l'anoïkis (-75%). Le plasma non polymérisé lui, permet tout de même de limiter la perte d'îlots en culture par la diminution de l'apoptose (-50%) via une voie indépendante de celle des intégrines.

5.4 Transposition à un site alternatif : l'omentum

Les deux biomatériaux sélectionnés sont composés tout ou en partie de plasma. De ce fait, leur utilisation en transplantation intra-portale est infaisable et il est nécessaire pour les utiliser de trouver un site de greffe alternatif. L'omentum est un candidat idéal, en effet, c'est un site respectant au même titre que le foie la diffusion physiologique de l'insuline (premier passage hépatique) et permettant également une approche de greffe percutanée grâce à la technologie de microchirurgie. De plus, sa configuration anatomique ainsi que sa grande taille permettent de réaliser un pochon dans lequel sont placés les îlots inclus dans le gel de plasma. L'avantage de cette technique étant de perpétuer les bénéfices observés *in vitro* en transplantant conjointement les îlots et leur support de culture enrichi. Ce dernier, en plus de diminuer l'anoïkis (94, 171, 172), permet lorsqu'il est utilisé pour la greffe, de déclencher l'angiogenèse. Ceci permet d'obtenir une rapide vascularisation fonctionnelle des îlots et par conséquent une meilleure fonction de la greffe à long terme (120, 173, 174).

Après greffe dans l'omentum de l'ensemble plasma gel-îlots sous forme de pochon, une très légère fonction est observée, malgré une absence de réversion du diabète. Conjointement, une stabilisation du poids et un meilleur état général des rats greffés (poil brillant et non hirsute) par rapport aux rats shams, confirment la possibilité d'obtenir une greffe fonctionnelle après quelques ajustements, notamment en termes d'oxygénation.

En effet, le gel de plasma est une masse gélifiée de quelques millimètres d'épaisseur (3-5 mm), formée d'un réseau de fibrilles de fibrine. La diffusion de l'oxygène dans ce type de biomatériau n'étant pas réellement connu, nous avons mesuré le temps de rééquilibration de l'oxygène dans le plasma gel en comparaison à une condition contrôle ne contenant que du milieu de culture liquide. Il s'avère que la diffusion de l'O₂ est très ralentie dans le plasma gel par rapport au contrôle, ce qui est confirmé par une augmentation de la translocation de HIF-1 α dans les îlots. Ceci peut expliquer la faible efficacité observée *in vivo*. En effet, si la diffusion de l'oxygène est si lente, il est fort probable que celle des nutriments y soit ralentie. Les îlots, bien que placés dans un environnement richement vascularisé qu'est l'omentum, ne sont exposés qu'à une pression partielle en O₂ de 33mmHg (capillaires

sanguins de l'omentum), (95) contre 40mmHg dans le pancréas natif (62). Cette légère diminution de PO₂, combinée à la diffusion ralentie de l'oxygène dans le gel de plasma réticulé, expose les îlots à un mauvais approvisionnement en oxygène et nutriments *in vivo*.

In vitro par contre, les îlots, sont exposés à une pression partielle en oxygène de 20% (soit environ 150mmHg), soit 3,75 fois plus que la PO₂ du pancréas natif. La forte PO₂ appliquée *in vitro* combinée au temps d'étude court (24h), n'a pas permis pas de mettre en avant les effets néfastes d'une matrice gélifiée sur les îlots. Effectivement, même si les résultats obtenus *in vitro* ont montré une augmentation de l'hypoxie lorsque les îlots sont cultivés dans un gel de plasma, aucun parallèle n'a été établi avec la survie des îlots après 24h. Cependant, l'activation de FOXO-1 laissait présager une activation des voies de l'apoptose sur le long terme, notamment en situation d'hypoxie prolongée (175, 176). Ce manque d'oxygène étant présent lors de l'implantation intra-omentale sous forme de pochon, la PFD (transporteur d'oxygène) a été ajoutée aux gels.

Les gels de plasma supplémentés avec 10% d'ePFD, permettaient la réduction de l'hypoxie et du stress oxydant *in vitro* ce qui devait nous permettre d'obtenir une greffe plus fonctionnelle qu'avec le gel de plasma seul. Cependant les résultats post-greffe étaient comparables au gel de plasma non supplémentés de ePFD indiquant que ces transporteurs d'oxygène ne permettaient pas un maintien à plus long terme de la fonction des îlots. En effet, les transporteurs d'oxygène comme la PFD, ont une durée de demi-vie *in vivo* variant de quelques minutes à quelques heures (177). La néo-vascularisation des îlots se faisant en général en 7jours, cette action est bien trop courte et il semble qu'un rechargement de cette PFD *in vivo* ne soit pas possible. Ces données appuient encore plus la nécessité de l'usage d'un transporteur d'O₂ plus physiologique comme les hémoglobines citées précédemment.

Ainsi la greffe omentale sous-forme de pochon ne permet pas d'obtenir une greffe fonctionnelle, et ceux même en utilisation conjointe avec l'ePFD. Ce site est pourtant déjà utilisé en clinique par une équipe Américaine, testant également la faisabilité de la transplantation d'îlot sous forme de « roll-up », il s'impose donc comme un réel site de

choix. Les premiers résultats précliniques disponibles, par contre, confirment que cette technique de pochon, ne maximise pas les échanges greffon-tissus receveur (102).

Grâce à l'aide et aux conseils de l'équipe de chirurgie reconstructrice du Pr Bruant-Rodier (Hôpital Civil, Strasbourg) nous avons pu mettre en place une nouvelle technique de greffe dérivée de la méthode du « lipofilling ». Cette technique est déjà largement utilisée en chirurgie reconstructrice. Elle consiste en de multiples micro-injections de graisse autologue afin de combler des zones définies (178, 179). Elle est utilisée expérimentalement pour traiter les fistules, les pieds diabétiques ou encore l'arthrose (180-182). En effet, la graisse utilisée dans cette technique peut être soit conservée en l'état soit traitée pour en obtenir la fraction vasculaire stromale (FVS), contenant notamment des cellules souches mésenchymateuses. La FVS est alors mixée à un plasma riche en plaquette (PRP) ou riche en fibrine (PRF), avant d'être micro-injecté aux alentours de la zone d'intérêt.

L'omentum étant lui-même un tissu graisseux connu pour contenir des cellules souches mésenchymateuses (183), pouvant se différencier notamment en cellules endothéliales formant des néo-vaisseaux (184), cette technique semble pouvoir se prêter parfaitement à la greffe d'îlots. De plus, l'utilisation de plasma permet de réaliser un réel parallèle avec notre étude. Le seul inconvénient de cette procédure, mais également son originalité, réside dans le fait que cette injection est réalisée au sein même du tissu. Il est donc nécessaire de pouvoir greffer les îlots avec une matrice assez liquide pour être injectée et suffisamment visqueuse pour éviter les fuites.

Le seul biomatériau adapté à l'injection est L'HPMC. Celui-ci a été testé pour la diffusion de l'oxygène et présente un potentiel de diffusion quasi égal à celui d'un milieu liquide. Cette observation est également confirmée par le taux de HIF-1 α dans les îlots cultivés dans l'HPMC ou HPMC plasma, qui n'est pas différent du contrôle. L'HPMC plasma permet en plus de diminuer la caspase 3. Compte tenu de toutes ces propriétés, ces deux biomatériaux ont été utilisés pour tester la transplantation des îlots en intra-tissulaire.

5.5 Transplantation intra-tissulaire

Les greffes réalisées avec les deux biomatériaux permettent la réversion du diabète ; au même titre que le greffe intra-hépatique. Par contre, l'efficacité semble supérieure quand les îlots sont accompagnés d'HPMC plasma que de d'HPMC seule. La différence observée peut être expliquée par la diminution de l'apoptose provoquée par l'HPMC plasma. De plus, Il est vraisemblable de penser que le plasma pourrait faciliter l'implantation des îlots, via la potentialisation de la vascularisation ou des connexions avec la MEC (56).

Dans le but de se référer à la clinique, les îlots ont été transplantés avec un milieu ne contenant pas de sérum (condition HPMC), alors que l'HPMC plasma contient quant à lui, 100% de plasma. Au vu des résultats précédents, il est fort probable que les effets bénéfiques soient liés aux facteurs de croissances et autre composants du plasma. Il serait intéressant alors de tester des conditions utilisant du sérum de rat (sans fibrine) pour évaluer les effets des autres composants et de comparer les résultats obtenus en termes d'efficacité. Ainsi, il paraît important de déterminer précisément les facteurs essentiels du plasma à l'origine des effets bénéfiques observés sur les îlots afin de pouvoir reproduire ses effets. Les composants majoritaires du plasma étant l'albumine, les globulines et le fibrinogène, il faudrait les tester seuls ou associés sur des îlots en culture. Ceci permettrait de formuler un hydrogel à des fins commerciales de type « good manufacturing practice », permettant d'apporter aux cellules les mêmes bénéfices que le plasma, sans ses contraintes.

Un autre paramètre intéressant est le poids de l'omentum retiré au moment de l'explantation ou du sacrifice. En effet, celui-ci est plus élevé dans les groupes HPMC et HPMC plasma que dans le groupe foie, alors même que la prise de poids globale était la même pour tous les rats. L'hydrogel étant dégradé, cette prise de masse n'est pas imputable à l'HPMC, ceci étant confirmé par l'implantation de l'hydrogel seul, sans îlot, ne montrant aucune augmentation de la taille de l'omentum. Physiologiquement, le tissu gras (dont l'omentum) stocke environ 20% du glucose grâce à la signalisation à l'insuline. Dans le cadre d'une transplantation intra-omentale, l'insuline est directement produite au sein de ce tissu gras, la capture de glucose pourrait y être plus importante, augmentant son stockage sous

forme de graisse et expliquant la différence entre le groupe foie et les groupes omentum. Cette localisation anatomique de la greffe présente en plus un avantage majeur, celui de ne pas créer de phénomène d'insulino-résistance. Contrairement au foie et au muscle squelettique, sensible à l'hyperinsulinosécrétion, les adipocytes possèdent la capacité de stocker de façon « illimitée » le glucose sous forme d'acide gras. L'augmentation localisée d'insuline n'engendrera donc pas d'insulino-resistance (185, 186).

A noter également qu'une nette différence est observée entre les omentums des rats du groupe HPMC seule et ceux du groupe HPMC plasma. Les facteurs de croissance contenus dans le plasma, comme par exemple le Fibroblast Growth Factor (187), pourraient favoriser le développement d'une fibrose, mais ici, aucune infiltration cellulaire massive n'était visible au sein des omentums explantés. La piste de FOXO-1 peut alors être envisagée. Comme ce facteur de transcription est fortement surexprimé lorsque les îlots sont cultivés dans du plasma, il est possible que le plasma exerce ces mêmes effets sur d'autres types cellulaires, comme les adipocytes. En effet, FOXO-1 est un facteur transcription qui joue d'importants rôles dans la régulation de la glucogénogenèse et la glycogénolyse via la signalisation à l'insuline et permet la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes (188). L'omentum contenant de nombreuses cellules souches, leur différenciation pourrait contribuer à augmenter sa masse. En effet, l'augmentation du nombre d'adipocytes, permettrait le décuplement du stockage de graisses.

La revascularisation des îlots est un élément essentiel pour la survie de la greffe. L'augmentation de FOXO au sein de l'îlot pourrait ici être bénéfique. En effet, la réalisation d'un KO pour le gène FOXO-1 est létal au stade embryonnaire à cause d'un défaut de vascularisation (189), impliquant FOXO-1 comme un facteur pro-angiogénique. Cette hypothèse semble confirmée par l'augmentation du nombre de vaisseaux dans l'îlot dans les conditions HPMC plasma par rapport à l'HPMC seul, mais aussi par la fonctionnalité plus élevée de la greffe réalisée avec le plasma. Ces données confirment qu'en implantant une matrice adaptée avec les îlots l'angiogenèse est activée (120, 173, 174), permettant à la greffe d'être rapidement fonctionnelle.

Théoriquement, le plasma du receveur était un candidat idéal : parfaitement biocompatible, apportant la structure et les interactions nécessaires à la diminution de l'anoïkis, autologue, ne déclenchant donc pas de réaction de rejet. L'utilisation d'un modèle de rat consanguin (Lewis) nous a permis de prélever le sang d'un rat sain en vue d'une transplantation autologue chez un receveur diabétique. En revanche, la transposition clinique de cette étude faisant état de l'utilisation d'un plasma autologue implique l'utilisation d'un plasma d'un receveur diabétique instable, contenant potentiellement de nombreux facteurs délétères pour la survie des îlots (inflammation etc...). Il serait alors cohérent de tester la différence entre un plasma de rat sain et un plasma de rat diabétique sur la viabilité, la fonction et l'apoptose des îlots en culture.

Le plasma étant une très bonne MEC de substitution, mais présentant quelques désavantages, d'autres produits déjà commercialisés pourraient être utilisés pour une greffe intra-tissulaire dans l'omentum. Citons par exemple, des produits servant à la reconstruction osseuse comme l'ostéoplant angiostad® (Bioteck, Arcugnago, Italy). Sa consistance injectable serait idéale pour une greffe intra-tissulaire et certains de ces composants pro-angiogéniques, pourraient encore potentialiser la revascularisation des îlots greffés.

Le dispositif utilisé pour la greffe intra-omentale pourrait lui aussi être optimisé, afin d'obtenir le meilleur rendement de transplantation. Ainsi, la présence de volumes morts dans le dispositif d'injection intra-tissulaire combiné à la viscosité de l'HPMC pourrait engendrer une perte d'îlots importante. Pour estimer ces pertes, nous avons utilisé des billes de dextran ayant la même taille que les îlots. Milles billes ont été comptées, placées dans de l'HPMC et chargées dans le dispositif de greffe. Après relargage de la matrice, le nombre de billes est compté à nouveau. Les résultats obtenus permettent d'estimer une perte d'environ 37% des billes de dextran. Cette perte majeure pourrait justifier que malgré les effets anti-apoptotiques du plasma et l'abrogation d'IBMIR, aucune différence en termes de fonction de la greffe n'est observable entre foie et omentum HPMC plasma. Cependant, il ne s'agit là que d'un test préliminaire réalisé *in vitro*. Pour obtenir un résultat fiable et reproductible, il faudra réitérer l'expérience avec des îlots. Si, *in fine* la perte reste aussi conséquente, il faudra envisager l'optimisation du matériel (aiguille, seringue) pour limiter au maximum la

perte engendrée. Si les contraintes matérielles sont abrogées, il y a tout à penser que la greffe omentale avec l'HPMC plasma pourrait être, en termes d'efficacité, largement supérieure à la transplantation hépatique, puisqu'elle permettrait de reverser le diabète avec moins d'îlots.

6 Conclusions

En conclusion, ces travaux ont non seulement permis de mettre en évidence l'importance de l'apport d'un support tridimensionnel enrichi lors de la culture d'îlots, mais aussi de sélectionner un site receveur adapté à la transplantation avec ce support. Nous avons, durant cette thèse, développé et validé *in vitro* et *in vivo* l'utilisation d'un hydrogel de plasma, facilement transférable en clinique ; mais aussi mis en avant les avantages de l'utilisation d'un site alternatif et d'une nouvelle technique de greffe d'îlots pancréatiques : la greffe intra-tissulaire dans l'omentum.

La culture en hydrogel combinée à la greffe intra-tissulaire ayant donné d'excellents résultats, un brevet sur cette application va être déposé. Cet hydrogel de plasma pourra non seulement être utilisé en transplantation insulaire, mais aussi transféré à d'autres pathologies comme par exemple la chirurgie réparatrice (comblement) ou encore la reconstruction tissulaire (foie bio-artificiel, infarctus du myocarde ...).

Nous avons démontré que la greffe intra-omentale avec l'HPMC plasma permet d'obtenir une fonction de greffe aussi bonne que lors d'une transplantation intra-portale, tout en s'abrogeant des complications liées à l'infusion vasculaire. L'acte chirurgical pourra, au même titre que la greffe intra-hépatique, être réalisé par une approche non invasive à l'aide de la microchirurgie. Les résultats obtenus durant cette thèse permettent donc de placer l'omentum comme un site réellement intéressant d'un point de vu clinique, celui-ci méritant d'être considéré au même titre que le foie.

L'objectif suivant est maintenant de pouvoir avec cette technique dépasser les résultats de la greffe intra-portale d'îlots pancréatique, et permettre à un plus grand nombre de diabétiques d'accéder à la transplantation d'îlots. Pour se faire, la combinaison des effets anti-apoptotiques du plasma, des effets anti-anoïkis de la culture 3D et de la greffe intra-omentale semble être réellement prometteuse.

7 Références

1. Gorelick FS. Pancreas cell physiology and pancreatitis cell biology. Summary of a symposium held at the joint meeting of the EPC and the IAP, Heidelberg 2002. *Pancreatology*. 2003;3(3):207-8.
2. Pandol SJ. The Exocrine Pancreas. Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function to Disease. San Rafael (CA)2010.
3. Suckale J, Solimena M. Pancreas islets in metabolic signaling--focus on the beta-cell. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2008;13:7156-71.
4. Langerhans P. Beitrage zur mikroskopischen anatomie der bauchspeichel druse". Inaugural-dissertation Berlin: Gustav Lange. 1869.
5. Ionescu-Tirgoviste C, Gagniuc PA, Gubceac E, Mardare L, Popescu I, Dima S, et al. A 3D map of the islet routes throughout the healthy human pancreas. *Sci Rep*. 2015;5:14634.
6. Wang P, Fiaschi-Taesch NM, Vasavada RC, Scott DK, Garcia-Ocana A, Stewart AF. Diabetes mellitus--advances and challenges in human beta-cell proliferation. *Nature reviews Endocrinology*. 2015;11(4):201-12.
7. Chang X, Jorgensen AM, Bardrum P, Led JJ. Solution structures of the R6 human insulin hexamer. *Biochemistry*. 1997;36(31):9409-22.
8. Owens DR. New horizons--alternative routes for insulin therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2002;1(7):529-40.
9. Gaisano HY, Macdonald PE, Vranic M. Glucagon secretion and signaling in the development of diabetes. *Front Physiol*. 2012;3:349.
10. Tager HS, Patzelt C, Assoian RK, Chan SJ, Duguid JR, Steiner DF. Biosynthesis of islet cell hormones. *Ann N Y Acad Sci*. 1980;343:133-47.
11. Campbell JE, Drucker DJ. Islet alpha cells and glucagon--critical regulators of energy homeostasis. *Nature reviews Endocrinology*. 2015;11(6):329-38.
12. Gromada J, Bokvist K, Ding WG, Barg S, Buschard K, Renstrom E, et al. Adrenaline stimulates glucagon secretion in pancreatic A-cells by increasing the Ca²⁺ current and the number of granules close to the L-type Ca²⁺ channels. *J Gen Physiol*. 1997;110(3):217-28.
13. Quesada I, Tuduri E, Ripoll C, Nadal A. Physiology of the pancreatic alpha-cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. *J Endocrinol*. 2008;199(1):5-19.
14. Siu FY, He M, de Graaf C, Han GW, Yang D, Zhang Z, et al. Structure of the human glucagon class B G-protein-coupled receptor. *Nature*. 2013;499(7459):444-9.
15. Jiang G, Zhang BB. Glucagon and regulation of glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003;284(4):E671-8.
16. Ramnanan CJ, Edgerton DS, Kraft G, Cherrington AD. Physiologic action of glucagon on liver glucose metabolism. *Diabetes Obes Metab*. 2011;13 Suppl 1:118-25.
17. van Belle TL, Coppieters KT, von Herrath MG. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol Rev*. 2011;91(1):79-118.
18. Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988;37(12):1595-607.
19. Cnop M, Landchild MJ, Vidal J, Havel PJ, Knowles NG, Carr DR, et al. The concurrent accumulation of intra-abdominal and subcutaneous fat explains the association between insulin resistance and plasma leptin concentrations : distinct metabolic effects of two fat compartments. *Diabetes*. 2002;51(4):1005-15.

20. Himsworth HP. Diabetes mellitus: its differentiation into insulin-sensitive and insulin-insensitive types. *Diabet Med.* 2011;28(12):1440-4.
21. Perley M, Kipnis DM. Plasma insulin responses to glucose and tolbutamide of normal weight and obese diabetic and nondiabetic subjects. *Diabetes.* 1966;15(12):867-74.
22. Jurgens CA, Toukatly MN, Fligner CL, Udayasankar J, Subramanian SL, Zraika S, et al. beta-cell loss and beta-cell apoptosis in human type 2 diabetes are related to islet amyloid deposition. *The American journal of pathology.* 2011;178(6):2632-40.
23. Poitout V, Robertson RP. Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr Rev.* 2008;29(3):351-66.
24. Barnett AH, Eff C, Leslie RD, Pyke DA. Diabetes in identical twins. A study of 200 pairs. *Diabetologia.* 1981;20(2):87-93.
25. Hu FB, van Dam RM, Liu S. Diet and risk of Type II diabetes: the role of types of fat and carbohydrate. *Diabetologia.* 2001;44(7):805-17.
26. Chen M, Bergman RN, Porte D, Jr. Insulin resistance and beta-cell dysfunction in aging: the importance of dietary carbohydrate. *J Clin Endocrinol Metab.* 1988;67(5):951-7.
27. Guenard F, Deshaies Y, Cianflone K, Kral JG, Marceau P, Vohl MC. Differential methylation in glucoregulatory genes of offspring born before vs. after maternal gastrointestinal bypass surgery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2013;110(28):11439-44.
28. Paulsen EP, Courtney JW, 3rd, Duckworth WC. Insulin resistance caused by massive degradation of subcutaneous insulin. *Diabetes.* 1979;28(7):640-5.
29. Kelly WD, Lillehei RC, Merkel FK, Idezuki Y, Goetz FC. Allotransplantation of the pancreas and duodenum along with the kidney in diabetic nephropathy. *Surgery.* 1967;61(6):827-37.
30. Gruessner AC, Sutherland DE. 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):433-55.
31. Kandaswamy R, Skeans MA, Gustafson SK, Carrico RJ, Tyler KH, Israni AK, et al. OPTN/SRTR 2013 Annual Data Report: pancreas. *Am J Transplant.* 2015;15 Suppl 2:1-20.
32. Gruessner RW, Gruessner AC. The current state of pancreas transplantation. *Nature reviews Endocrinology.* 2013;9(9):555-62.
33. de Kort H, Roufosse C, Bajema IM, Drachenberg CB. Pancreas transplantation, antibodies and rejection: where do we stand? *Curr Opin Organ Transplant.* 2013;18(3):337-44.
34. Gruessner AC. 2011 update on pancreas transplantation: comprehensive trend analysis of 25,000 cases followed up over the course of twenty-four years at the International Pancreas Transplant Registry (IPTR). *Rev Diabet Stud.* 2011;8(1):6-16.
35. Humar A, Ramcharan T, Kandaswamy R, Gruessner RW, Gruessner AC, Sutherland DE. Technical failures after pancreas transplants: why grafts fail and the risk factors--a multivariate analysis. *Transplantation.* 2004;78(8):1188-92.
36. Humar A, Kandaswamy R, Granger D, Gruessner RW, Gruessner AC, Sutherland DE. Decreased surgical risks of pancreas transplantation in the modern era. *Ann Surg.* 2000;231(2):269-75.
37. Stratta RJ. Surgical nuances in pancreas transplantation. *Transplantation proceedings.* 2005;37(2):1291-3.

38. Ballinger WF, Lacy PE. Transplantation of intact pancreatic islets in rats. *Surgery*. 1972;72(2):175-86.
39. Scharp DW, Lacy PE, Santiago JV, McCullough CS, Weide LG, Falqui L, et al. Insulin independence after islet transplantation into type I diabetic patient. *Diabetes*. 1990;39(4):515-8.
40. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbutt 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(4):230-8.
41. Shapiro AM, Ricordi C, Hering BJ, Auchincloss H, Lindblad R, Robertson RP, et al. International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. *N Engl J Med*. 2006;355(13):1318-30.
42. Piemonti L, Pileggi A. Islet Transplantation. In: De Groot LJ, Beck-Peccoz P, Chrousos G, Dungan K, Grossman A, Hershman JM, et al., editors. *Endotext*. South Dartmouth (MA)2000.
43. Merani S, Shapiro AM. Current status of pancreatic islet transplantation. *Clin Sci (Lond)*. 2006;110(6):611-25.
44. Lakey JR, Warnock GL, Rajotte RV, Suarez-Alamazor ME, Ao Z, Shapiro AM, et al. Variables in organ donors that affect the recovery of human islets of Langerhans. *Transplantation*. 1996;61(7):1047-53.
45. Brandhorst H, Brandhorst D, Hering BJ, Federlin K, Bretzel RG. Body mass index of pancreatic donors: a decisive factor for human islet isolation. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 1995;103 Suppl 2:23-6.
46. Lee TC, Barsches NR, Brunicardi FC, Alejandro R, Ricordi C, Nguyen L, et al. Procurement of the human pancreas for pancreatic islet transplantation. *Transplantation*. 2004;78(3):481-3.
47. Ricordi C, Lacy PE, Scharp DW. Automated islet isolation from human pancreas. *Diabetes*. 1989;38 Suppl 1:140-2.
48. McCall M, Shapiro AM. Islet cell transplantation. *Semin Pediatr Surg*. 2014;23(2):83-90.
49. Rheinheimer J, Bauer AC, Silveiro SP, Estivalet AA, Boucas AP, Rosa AR, et al. Human pancreatic islet transplantation: an update and description of the establishment of a pancreatic islet isolation laboratory. *Arch Endocrinol Metab*. 2015;59(2):161-70.
50. Biarnes M, Montolio M, Nacher V, Raurell M, Soler J, Montanya E. Beta-cell death and mass in syngeneically transplanted islets exposed to short- and long-term hyperglycemia. *Diabetes*. 2002;51(1):66-72.
51. 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(7):2060-9.
52. Group CR. 2007 update on allogeneic islet transplantation from the Collaborative Islet Transplant Registry (CITR). *Cell Transplant*. 2009;18(7):753-67.
53. Owen RJ, Ryan EA, O'Kelly K, Lakey JR, McCarthy MC, Paty BW, et al. Percutaneous transhepatic pancreatic islet cell transplantation in type 1 diabetes mellitus: radiologic aspects. *Radiology*. 2003;229(1):165-70.
54. Srinivasan P, Huang GC, Amiel SA, Heaton ND. Islet cell transplantation. *Postgrad Med J*. 2007;83(978):224-9.
55. Kin T. Islet isolation for clinical transplantation. *Adv Exp Med Biol*. 2010;654:683-710.
56. Stendahl JC, Kaufman DB, Stupp SI. Extracellular matrix in pancreatic islets: relevance to scaffold design and transplantation. *Cell Transplant*. 2009;18(1):1-12.

57. Avraamides CJ, Garmy-Susini B, Varner JA. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(8):604-17.
58. Humphries JD, Byron A, Humphries MJ. Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci*. 2006;119(Pt 19):3901-3.
59. Vachon PH. [Cell survival: differences and differentiation]. *Med Sci (Paris)*. 2006;22(4):423-9.
60. Lai Y, Brandhorst H, Hossain H, Bierhaus A, Chen C, Bretzel RG, et al. Activation of NFkappaB dependent apoptotic pathway in pancreatic islet cells by hypoxia. *Islets*. 2009;1(1):19-25.
61. Krohn KA, Link JM, Mason RP. Molecular imaging of hypoxia. *J Nucl Med*. 2008;49 Suppl 2:129S-48S.
62. 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(3):489-95.
63. Bloch K, Vennang J, Lazard D, Vardi P. Different susceptibility of rat pancreatic alpha and beta cells to hypoxia. *Histochem Cell Biol*. 2012;137(6):801-10.
64. Lazard D, Vardi P, Bloch K. Induction of beta-cell resistance to hypoxia and technologies for oxygen delivery to transplanted pancreatic islets. *Diabetes Metab Res Rev*. 2012;28(6):475-84.
65. Cantley J, Grey ST, Maxwell PH, Withers DJ. The hypoxia response pathway and beta-cell function. *Diabetes Obes Metab*. 2010;12 Suppl 2:159-67.
66. Korsgren O, Nilsson B, Berne C, Felldin M, Foss A, Kallen R, et al. Current status of clinical islet transplantation. *Transplantation*. 2005;79(10):1289-93.
67. H. de Groot AL, T. Noll. Oxygen Sensing in Tissues, Metabolic and Pathological Aspects of Hypoxia in Liver Cells1988.
68. Nilsson B. The instant blood-mediated inflammatory reaction in xenogeneic islet transplantation. *Xenotransplantation*. 2008;15(2):96-8.
69. Srinivas TR, Meier-Kriesche HU, Kaplan B. Pharmacokinetic principles of immunosuppressive drugs. *Am J Transplant*. 2005;5(2):207-17.
70. 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(3):293-306.
71. Dong H, Fahmy TM, Metcalfe SM, Morton SL, Dong X, Inverardi L, et al. Immuno-isolation of pancreatic islet allografts using pegylated nanotherapy leads to long-term normoglycemia in full MHC mismatch recipient mice. *PLoS one*. 2012;7(12):e50265.
72. Jukes JM, van der Aa LJ, Hiemstra C, van Veen T, Dijkstra PJ, Zhong Z, et al. A newly developed chemically crosslinked dextran-poly(ethylene glycol) hydrogel for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part A*. 2010;16(2):565-73.
73. Prabhasawat P, Ruangvaravate N, Tesavibul N, Thewthong M. Effect of 0.3% Hydroxypropyl Methylcellulose/Dextran Versus 0.18% Sodium Hyaluronate in the Treatment of Ocular Surface Disease in Glaucoma Patients: A Randomized, Double-Blind, and Controlled Study. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2015;31(6):323-9.
74. Henry M, Ulrichs K, Moskalenko V, Bonneau M, Kang C, Belcourt A, et al. Surface analysis of an encapsulation membrane after its implantation in mini-pigs. *Biomed Mater*. 2007;2(1):S78-89.

75. Holdcraft RW, Gazda LS, Circle L, Adkins H, Harbeck SG, Meyer ED, et al. Enhancement of in vitro and in vivo function of agarose-encapsulated porcine islets by changes in the islet microenvironment. *Cell Transplant*. 2014;23(8):929-44.
76. Soon-Shiong P, Feldman E, Nelson R, Heintz R, Yao Q, Yao Z, et al. Long-term reversal of diabetes by the injection of immunoprotected islets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90(12):5843-7.
77. 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(6):1180-3.
78. Sun AM, Vacek I, Sun YL, Ma X, Zhou D. In vitro and in vivo evaluation of microencapsulated porcine islets. *ASAIO journal*. 1992;38(2):125-7.
79. Toole BP. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(7):528-39.
80. Mencucci R, Boccalini C, Caputo R, Favuzza E. Effect of a hyaluronic acid and carboxymethylcellulose ophthalmic solution on ocular comfort and tear-film instability after cataract surgery. *J Cataract Refract Surg*. 2015;41(8):1699-704.
81. Hunter DJ. Viscosupplementation for osteoarthritis of the knee. *N Engl J Med*. 2015;372(11):1040-7.
82. Jiang D, Liang J, Noble PW. Hyaluronan in tissue injury and repair. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2007;23:435-61.
83. Cohen W, Wynne DM. Using Hyaluronic Acid for Improving Vocal Function in a Prepubescent Boy With an Atrophied Right Vocal Fold. *J Voice*. 2015;29(4):494-7.
84. Maillard E, Juszczak MT, Clark A, Hughes SJ, Gray DR, Johnson PR. Perfluorodecalin-enriched fibrin matrix for human islet culture. *Biomaterials*. 2011;32(35):9282-9.
85. V. Stefanellia TB. The evolution of fibrin-specific targeting strategies. *J Mater Chem B*. 2015;7(3):1177-86.
86. Salvatori M, Katari R, Patel T, Peloso A, Mugweru J, Owusu K, et al. Extracellular Matrix Scaffold Technology for Bioartificial Pancreas Engineering: State of the Art and Future Challenges. *J Diabetes Sci Technol*. 2014;8(1):159-69.
87. De Carlo E, Baiguera S, Conconi MT, Vigolo S, Grandi C, Lora S, et al. Pancreatic acellular matrix supports islet survival and function in a synthetic tubular device: in vitro and in vivo studies. *Int J Mol Med*. 2010;25(2):195-202.
88. Singelyn JM, DeQuach JA, Seif-Naraghi SB, Littlefield RB, Schup-Magoffin PJ, Christman KL. Naturally derived myocardial matrix as an injectable scaffold for cardiac tissue engineering. *Biomaterials*. 2009;30(29):5409-16.
89. Song JJ, Ott HC. Organ engineering based on decellularized matrix scaffolds. *Trends Mol Med*. 2011;17(8):424-32.
90. Espes D, Eriksson O, Lau J, Carlsson PO. Striated muscle as implantation site for transplanted pancreatic islets. *J Transplant*. 2011;2011:352043.
91. Svensson J, Lau J, Sandberg M, Carlsson PO. High vascular density and oxygenation of pancreatic islets transplanted in clusters into striated muscle. *Cell transplantation*. 2011;20(5):783-8.
92. Christoffersson G, Henriksnas J, Johansson L, Rolny C, Ahlstrom H, Caballero-Corbalan J, et al. Clinical and experimental pancreatic islet transplantation to striated muscle: establishment of a vascular system similar to that in native islets. *Diabetes*. 2010;59(10):2569-78.

93. van Suylichem PT, Strubbe JH, Houwing H, Wolters GH, van Schilfgaarde R. Rat islet isograft function. Effect of graft volume and transplantation site. *Transplantation*. 1994;57(7):1010-7.
94. Merani S, Toso C, Emamaullee J, Shapiro AM. Optimal implantation site for pancreatic islet transplantation. *Br J Surg*. 2008;95(12):1449-61.
95. Zweifach BW, Lipowsky HH. Quantitative studies of microcirculatory structure and function. III. Microvascular hemodynamics of cat mesentery and rabbit omentum. *Circ Res*. 1977;41(3):380-90.
96. Ferguson J, Scuthorne RJ, Johnston ID. Proceedings: the survival of transplanted isolated pancreatic islets in the omentum and testis. *Br J Surg*. 1973;60(11):907.
97. Singh AK, Gudehithlu KP, Litbarg NO, Sethupathi P, Arruda JA, Dunea G. Transplanting fragments of diabetic pancreas into activated omentum gives rise to new insulin producing cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2007;355(1):258-62.
98. Litbarg NO, Gudehithlu KP, Sethupathi P, Arruda JA, Dunea G, Singh AK. Activated omentum becomes rich in factors that promote healing and tissue regeneration. *Cell Tissue Res*. 2007;328(3):487-97.
99. Saltz R, Stowers R, Smith M, Gadacz TR. Laparoscopically harvested omental free flap to cover a large soft tissue defect. *Ann Surg*. 1993;217(5):542-6; discussion 6-7.
100. Collins D, Hogan AM, O'Shea D, Winter DC. The omentum: anatomical, metabolic, and surgical aspects. *J Gastrointest Surg*. 2009;13(6):1138-46.
101. Kin T, Korbutt GS, Rajotte RV. Survival and metabolic function of syngeneic rat islet grafts transplanted in the omental pouch. *Am J Transplant*. 2003;3(3):281-5.
102. Berman DM, Molano RD, Fotino C, Ulissi U, Gimeno J, Mendez AJ, et al. Bioengineering the Endocrine Pancreas: Intraomental Islet Transplantation Within a Biologic Resorbable Scaffold. *Diabetes*. 2016;65(5):1350-61.
103. Cantarelli E, Melzi R, Mercalli A, Sordi V, Ferrari G, Lederer CW, et al. Bone marrow as an alternative site for islet transplantation. *Blood*. 2009;114(20):4566-74.
104. Echeverri GJ, McGrath K, Bottino R, Hara H, Dons EM, van der Windt DJ, et al. Endoscopic gastric submucosal transplantation of islets (ENDO-STI): technique and initial results in diabetic pigs. *Am J Transplant*. 2009;9(11):2485-96.
105. Wszola M, Berman A, Fabisiak M, Domagala P, Zmudzka M, Kieszek R, et al. TransEndoscopic Gastric SubMucosa Islet Transplantation (eGSM-ITx) in pigs with streptozotocine induced diabetes - technical aspects of the procedure - preliminary report. *Ann Transplant*. 2009;14(2):45-50.
106. Kemp CB, Knight MJ, Scharp DW, Ballinger WF, Lacy PE. Effect of transplantation site on the results of pancreatic islet isografts in diabetic rats. *Diabetologia*. 1973;9(6):486-91.
107. Pepper AR, Gala-Lopez B, Pawlick R, Merani S, Kin T, Shapiro AM. A prevascularized subcutaneous device-less site for islet and cellular transplantation. *Nat Biotechnol*. 2015;33(5):518-23.
108. Stagner JI, Rilo HL, White KK. The pancreas as an islet transplantation site. Confirmation in a syngeneic rodent and canine autotransplant model. *JOP*. 2007;8(5):628-36.
109. Stagner J, Ahren B, Sundler F, White K. Reconstructing the pancreas: restoration of normoglycemia, exocrine function, and islet innervation by islet transplantation to the pancreas. *Transplantation proceedings*. 2008;40(2):452-4.
110. Lazard D, Vardi P, Bloch K. Anti-diabetic and neuroprotective effects of pancreatic islet transplantation into the central nervous system. *Diabetes Metab Res Rev*. 2016;32(1):11-20.

111. Rayat GR, Korbutt GS, Elliott JF, Rajotte RV. Survival and function of syngeneic rat islet grafts placed within the thymus versus under the kidney capsule. *Cell Transplant.* 1997;6(6):597-602.
112. Nasr IW, Wang Y, Gao G, Deng S, Diggs L, Rothstein DM, et al. Testicular immune privilege promotes transplantation tolerance by altering the balance between memory and regulatory T cells. *J Immunol.* 2005;174(10):6161-8.
113. Andersson A, Eriksson U, Petersson B, Rebring L, Swenne I. Failure of successful intrasplenic transplantation of islets from lean mice to cure obese-hyperglycaemic mice, despite islet growth. *Diabetologia.* 1981;20(3):237-41.
114. Lowe KC, Davey MR, Power JB. Perfluorochemicals: their applications and benefits to cell culture. *Trends Biotechnol.* 1998;16(6):272-7.
115. Benov L, Sztejnberg L, Fridovich I. Critical evaluation of the use of hydroethidine as a measure of superoxide anion radical. *Free radical biology & medicine.* 1998;25(7):826-31.
116. Bindokas VP, Jordan J, Lee CC, Miller RJ. Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 1996;16(4):1324-36.
117. Gomes A, Fernandes E, Lima JL. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of biochemical and biophysical methods.* 2005;65(2-3):45-80.
118. Schaschkow A, Mura C, Dal S, Langlois A, Seyfritz E, Sookhareea C, et al. Impact of the Type of Continuous Insulin Administration on Metabolism in a Diabetic Rat Model. *Journal of Diabetes Research.* 2016;2016:10.
119. Schaschkow A, Mura C, Bietiger W, Peronet C, Langlois A, Bodin F, et al. Impact of an autologous oxygenating matrix culture system on rat islet transplantation outcome. *Biomaterials.* 2015;52:180-8.
120. Rackham CL, Jones PM, King AJ. Maintenance of islet morphology is beneficial for transplantation outcome in diabetic mice. *PloS one.* 2013;8(2):e57844.
121. Greenberg CS, Miraglia CC, Rickles FR, Shuman MA. Cleavage of blood coagulation factor XIII and fibrinogen by thrombin during in vitro clotting. *The Journal of clinical investigation.* 1985;75(5):1463-70.
122. Doolittle RF, Watt KW, Cottrell BA, Strong DD, Riley M. The amino acid sequence of the alpha-chain of human fibrinogen. *Nature.* 1979;280(5722):464-8.
123. Salsmann A, Schaffner-Reckinger E, Kabil F, Plancon S, Kieffer N. A new functional role of the fibrinogen RGD motif as the molecular switch that selectively triggers integrin alphallbbeta3-dependent RhoA activation during cell spreading. *The Journal of biological chemistry.* 2005;280(39):33610-9.
124. Salsmann A, Schaffner-Reckinger E, Kieffer N. RGD, the Rho'd to cell spreading. *Eur J Cell Biol.* 2006;85(3-4):249-54.
125. Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D. Integrins. *Cell Tissue Res.* 2010;339(1):269-80.
126. Suehiro K, Mizuguchi J, Nishiyama K, Iwanaga S, Farrell DH, Ohtaki S. Fibrinogen binds to integrin alpha(5)beta(1) via the carboxyl-terminal RGD site of the Aalpha-chain. *J Biochem.* 2000;128(4):705-10.
127. Laurens N, Koolwijk P, de Maat MP. Fibrin structure and wound healing. *J Thromb Haemost.* 2006;4(5):932-9.
128. Fang J, Hodivala-Dilke K, Johnson BD, Du LM, Hynes RO, White GC, 2nd, et al. Therapeutic expression of the platelet-specific integrin, alphallbbeta3, in a murine model for Glanzmann thrombasthenia. *Blood.* 2005;106(8):2671-9.

129. Kaido T, Yebra M, Cirulli V, Montgomery AM. Regulation of human beta-cell adhesion, motility, and insulin secretion by collagen IV and its receptor alpha1beta1. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(51):53762-9.
130. Lee BH, Ruoslahti E. alpha5beta1 integrin stimulates Bcl-2 expression and cell survival through Akt, focal adhesion kinase, and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV. *J Cell Biochem*. 2005;95(6):1214-23.
131. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev*. 1999;13(22):2905-27.
132. Stupack DG, Cheresh DA. Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *J Cell Sci*. 2002;115(Pt 19):3729-38.
133. Mehlen P, Puisieux A. Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(6):449-58.
134. Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab*. 2006;3(3):177-85.
135. Robertson RP. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(41):42351-4.
136. 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(7):745-7.
137. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2007;87(1):245-313.
138. Montalto AS, Curro M, Russo T, Visalli G, Impellizzeri P, Antonuccio P, et al. In vitro CO₂-induced ROS production impairs cell cycle in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Pediatr Surg Int*. 2013;29(1):51-9.
139. Hoffmann A, Hammes E, Plieth C, Desel C, Sattelmacher B, Hansen UP. Effect of CO₂ supply on formation of reactive oxygen species in *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma*. 2005;227(1):3-9.
140. Kim SH, Turnbull J, Guimond S. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *J Endocrinol*. 2011;209(2):139-51.
141. Kim SJ, Winter K, Nian C, Tsuneoka M, Koda Y, McIntosh CH. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) stimulation of pancreatic beta-cell survival is dependent upon phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (PKB) signaling, inactivation of the forkhead transcription factor Foxo1, and down-regulation of bax expression. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(23):22297-307.
142. Martinez SC, Tanabe K, Cras-Meneur C, Abumrad NA, Bernal-Mizrachi E, Permutt MA. Inhibition of Foxo1 protects pancreatic islet beta-cells against fatty acid and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Diabetes*. 2008;57(4):846-59.
143. Zhong Q, Zhou Y, Ye W, Cai T, Zhang X, Deng DY. Hypoxia-inducible factor 1-alpha-AA-modified bone marrow stem cells protect PC12 cells from hypoxia-induced apoptosis, partially through VEGF/PI3K/Akt/FoxO1 pathway. *Stem Cells Dev*. 2012;21(14):2703-17.
144. Glauser DA, Schlegel W. The emerging role of FOXO transcription factors in pancreatic beta cells. *J Endocrinol*. 2007;193(2):195-207.

145. Juszczak MT, Elsadig A, Kumar A, Muzyamba M, Pawelec K, Powis SH, et al. Use of perfluorodecalin for pancreatic islet culture prior to transplantation: a liquid-liquid interface culture system--preliminary report. *Cell Transplant.* 2011;20(2):323-32.
146. Rousselot M, Delpy E, Drieu La Rochelle C, Lagente V, Pirow R, Rees JF, et al. Arenicola marina extracellular hemoglobin: a new promising blood substitute. *Biotechnol J.* 2006;1(3):333-45.
147. Thuillier R, Dutheil D, Trieu MT, Mallet V, Allain G, Rousselot M, et al. Supplementation with a new therapeutic oxygen carrier reduces chronic fibrosis and organ dysfunction in kidney static preservation. *Am J Transplant.* 2011;11(9):1845-60.
148. Rodriguez-Brotóns A, Bietiger W, Peronet C, Magisson J, Sookhareea C, Langlois A, et al. Impact of Pancreatic Rat Islet Density on Cell Survival during Hypoxia. *J Diabetes Res.* 2016;2016:3615286.
149. Hamamoto K, Yamada S, Hara A, Kodera T, Seno M, Kojima I. Extracellular matrix modulates insulin production during differentiation of AR42J cells: functional role of Pax6 transcription factor. *J Cell Biochem.* 2011;112(1):318-29.
150. Chanet S, Martin AC. Mechanical force sensing in tissues. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2014;126:317-52.
151. Nikolova G, Jabs N, Konstantinova I, Domogatskaya A, Tryggvason K, Sorokin L, et al. The vascular basement membrane: a niche for insulin gene expression and Beta cell proliferation. *Dev Cell.* 2006;10(3):397-405.
152. Daoud J, Petropavlovskaya M, Rosenberg L, Tabrizian M. The effect of extracellular matrix components on the preservation of human islet function in vitro. *Biomaterials.* 2010;31(7):1676-82.
153. Goto M, Tjernberg J, Dufrane D, Elgue G, Brandhorst D, Ekdahl KN, et al. Dissecting the instant blood-mediated inflammatory reaction in islet xenotransplantation. *Xenotransplantation.* 2008;15(4):225-34.
154. Yang YG, Sykes M. Xenotransplantation: current status and a perspective on the future. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(7):519-31.
155. Robles L, Storrs R, Lamb M, Alexander M, Lakey JR. Current status of islet encapsulation. *Cell Transplant.* 2014;23(11):1321-48.
156. Desai ES, Tang MY, Ross AE, Gemeinhart RA. Critical factors affecting cell encapsulation in superporous hydrogels. *Biomed Mater.* 2012;7(2):024108.
157. Lin CC, Anseth KS. Glucagon-like peptide-1 functionalized PEG hydrogels promote survival and function of encapsulated pancreatic beta-cells. *Biomacromolecules.* 2009;10(9):2460-7.
158. Olabisi RM, Lazard ZW, Franco CL, Hall MA, Kwon SK, Sevick-Muraca EM, et al. Hydrogel microsphere encapsulation of a cell-based gene therapy system increases cell survival of injected cells, transgene expression, and bone volume in a model of heterotopic ossification. *Tissue Eng Part A.* 2010;16(12):3727-36.
159. Filomeni G, De Zio D, Cecconi F. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell Death Differ.* 2015;22(3):377-88.
160. Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free radical biology & medicine.* 2001;30(11):1191-212.
161. Rowley JA, Mooney DJ. Alginate type and RGD density control myoblast phenotype. *J Biomed Mater Res.* 2002;60(2):217-23.

- 162.Jeon O, Powell C, Ahmed SM, Alsberg E. Biodegradable, photocrosslinked alginate hydrogels with independently tailorably physical properties and cell adhesivity. *Tissue Eng Part A*. 2010;16(9):2915-25.
- 163.Evangelista MB, Hsiong SX, Fernandes R, Sampaio P, Kong HJ, Barrias CC, et al. Upregulation of bone cell differentiation through immobilization within a synthetic extracellular matrix. *Biomaterials*. 2007;28(25):3644-55.
- 164.Yip AK, Iwasaki K, Ursekar C, Machiyama H, Saxena M, Chen H, et al. Cellular response to substrate rigidity is governed by either stress or strain. *Biophys J*. 2013;104(1):19-29.
- 165.Du J, Chen X, Liang X, Zhang G, Xu J, He L, et al. Integrin activation and internalization on soft ECM as a mechanism of induction of stem cell differentiation by ECM elasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(23):9466-71.
- 166.Bridgewater RE, Norman JC, Caswell PT. Integrin trafficking at a glance. *J Cell Sci*. 2012;125(Pt 16):3695-701.
- 167.Kristin e. Michael vnV, benjamin g. Keselowsky , j. Carson meredith , robert a. Latour ,and andrés j. Garcia. Adsorption-Induced Conformational Changes in Fibronectin Due to Interactions with Well-Defined Surface Chemistries. *Langmuir*. 2003;19(19):pp 8033–40.
- 168.H. Lodish AB, P. Matsudaira, J. Darnell. *Biologie moléculaire de la cellule*: De Boeck Supérieur; 2014 2014.
- 169.Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal*. 2002;14(5):381-95.
- 170.New DC, Wong YH. Molecular mechanisms mediating the G protein-coupled receptor regulation of cell cycle progression. *J Mol Signal*. 2007;2:2.
- 171.Bhang SH, Jung MJ, Shin JY, La WG, Hwang YH, Kim MJ, et al. Mutual effect of subcutaneously transplanted human adipose-derived stem cells and pancreatic islets within fibrin gel. *Biomaterials*. 2013;34(30):7247-56.
- 172.Deng C, Vulesevic B, Ellis C, Korbutt GS, Suuronen EJ. Vascularization of collagen-chitosan scaffolds with circulating progenitor cells as potential site for islet transplantation. *J Control Release*. 2011;152 Suppl 1:e196-8.
- 173.Yap WT, Salvay DM, Silliman MA, Zhang X, Bannon ZG, Kaufman DB, et al. Collagen IV-modified scaffolds improve islet survival and function and reduce time to euglycemia. *Tissue Eng Part A*. 2013;19(21-22):2361-72.
- 174.Rackham CL, Dhadda PK, Chagastelles PC, Simpson SJ, Dattani AA, Bowe JE, et al. Pre-culturing islets with mesenchymal stromal cells using a direct contact configuration is beneficial for transplantation outcome in diabetic mice. *Cyotherapy*. 2013;15(4):449-59.
- 175.Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev*. 2014;94(3):909-50.
- 176.Chen C, Moreno R, Samikannu B, Bretzel RG, Schmitz ML, Linn T. Improved intraportal islet transplantation outcome by systemic IKK-beta inhibition: NF-kappaB activity in pancreatic islets depends on oxygen availability. *Am J Transplant*. 2011;11(2):215-24.
- 177.Laudien J, Gross-Heitfeld C, Mayer C, de Groot H, Kirsch M, Ferenz KB. Perfluorodecalin-Filled Poly(n-butyl-cyanoacrylate) Nanocapsules as Potential Artificial Oxygen Carriers: Preclinical Safety and Biocompatibility. *J Nanosci Nanotechnol*. 2015;15(8):5637-48.
- 178.Sautereau N, Daumas A, Truillet R, Jouve E, Magalon J, Veran J, et al. Efficacy of Autologous Microfat Graft on Facial Handicap in Systemic Sclerosis Patients. *Plast Reconstr Surg Glob Open*. 2016;4(3):e660.

179. Amar O, Bruant-Rodier C, Lehmann S, Bollecker V, Wilk A. [Fat tissue transplant: restoration of the mammary volume after conservative treatment of breast cancers, clinical and radiological considerations]. Ann Chir Plast Esthet. 2008;53(2):169-77.
180. Serratrice N, Bruzzese L, Magalon J, Veran J, Giraudo L, Aboudou H, et al. New fat-derived products for treating skin-induced lesions of scleroderma in nude mice. Stem Cell Res Ther. 2014;5(6):138.
181. Boissier R, Magalon J, Sabatier F, Veran J, Giraudo L, Giusiano S, et al. Histological and Urodynamic Effects of Autologous Stromal Vascular Fraction Extracted from Fat Tissue with Minimal ex Vivo Manipulation in a Porcine Model of Intrinsic Sphincter Deficiency. J Urol. 2016.
182. Guillaume-Jugnot P, Daumas A, Magalon J, Sautereau N, Veran J, Magalon G, et al. State of the art. Autologous fat graft and adipose tissue-derived stromal vascular fraction injection for hand therapy in systemic sclerosis patients. Curr Res Transl Med. 2016;64(1):35-42.
183. Dhanasekaran M, Indumathi S, Harikrishnan R, Mishra R, Lissa RP, Rajkumar JS, et al. Human omentum fat-derived mesenchymal stem cells transdifferentiates into pancreatic islet-like cluster. Cell Biochem Funct. 2013;31(7):612-9.
184. Garcia-Gomez I, Goldsmith HS, Angulo J, Prados A, Lopez-Hervas P, Cuevas B, et al. Angiogenic capacity of human omental stem cells. Neurol Res. 2005;27(8):807-11.
185. Frayn KN. Adipose tissue and the insulin resistance syndrome. Proc Nutr Soc. 2001;60(3):375-80.
186. Salans LB, Knittle JL, Hirsch J. The role of adipose cell size and adipose tissue insulin sensitivity in the carbohydrate intolerance of human obesity. The Journal of clinical investigation. 1968;47(1):153-65.
187. Larsson A, Skoldenberg E, Ericson H. Serum and plasma levels of FGF-2 and VEGF in healthy blood donors. Angiogenesis. 2002;5(1-2):107-10.
188. Nakae J, Kitamura T, Kitamura Y, Biggs WH, 3rd, Arden KC, Accili D. The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation. Dev Cell. 2003;4(1):119-29.
189. Dharaneeswaran H, Abid MR, Yuan L, Dupuis D, Beeler D, Spokes KC, et al. FOXO1-mediated activation of Akt plays a critical role in vascular homeostasis. Circ Res. 2014;115(2):238-51.

8 Publications

A. Schaschkow, C. Mura, S. Dal, A. Langlois, E. Seyfritz, C. Sookhareea, W. Bietiger, C. Peronet, N. Jeandidier, M. Pinget, S. Sigrist and E. Maillard, **Impact of the type of continuous insulin administration on metabolism in a diabetic rat model.** *Journal of Diabetes Research*, June 2016.

Dal S, Jeandidier N, Schaschkow A, Spizzo AH, Seyfritz E, Sookhareea C, Bietiger W, Péronet C, Moreau F, Pinget M, Maillard E, Sigrist S. **Portal or subcutaneous insulin infusion: efficacy and impact on liver inflammation.** *Fundam Clin Pharmacol*. 2015 Jun 10.

A. Schaschkow, C. Mura, W. Bietiger, C. Peronet, A. Langlois, F. Bodin, C. Dissaux, C. Bruant-Rodier, M. Pinget, N. Jeandidier, M.T. Juszczak, S. Sigrist, E. Maillard, **Impact of an autologous oxygenating matrix culture system on rat islet transplantation outcome,** *Biomaterials*, Volume 52, June 2015, Pages 180-188.

S. Dal, A. Schaschkow, E. Maillard-Pedracini, M. Pinget, N. Jeandidier, S. Sigrist, **Le stress oxydant: Nouvelle cible pour optimiser la prise en charge du patient diabétique de type 1.** *Infusystèmes France*, Volume 31 No.3, 2014. Pages 25-30.

9 Résumés publiés

A. Schaschkow, C. Mura, W. Bietiger, C. Peronet, C. Bruant-Rodier, N. Jeandidier, M. Pinget, S. Sigrist, E. Maillard Pedracini. **Intra-omental implantation: a promising novel technique for islets transplantation.** Abstracts of the IPITA-IXA-CTS 2015 Joint Congress November 15–19, 2015, Melbourne, Australia. *Xenotransplantation* Volume 22, Issue Supplement S1, pages S121–S184, November 2015.

A. Schaschkow, C. Mura, W. Bietiger, S. Dal, C. Peronet, N. Jeandidier, M. Pinget, S. Sigrist, E. Maillard, P337 **Administration sous-cutanée d'insuline: avantages des pompes osmotiques sur l'amélioration du contrôle métabolique des rats diabétiques,** *Diabetes & Metabolism*, Volume 41, Supplement 1, March 2015, Page A119.

A. Schaschkow, C. Mura, W. Bietiger, C. Peronet, A. Langlois, C. Bruant-Rodier, M. Pinget, N. Jeandidier, S. Sigrist, E. Maillard, **Oxygenated-plasma matrix as support for islet culture, in vitro validation.** *Diabetes Technology & Therapeutics*, Volume 17(S1), February 2015, Page A-112.

A. Schaschkow, C. Mura, W. Bietiger, C. Peronet, N. Jeandidier, M.T. Juszczak, S. Sigrist, E. Maillard, **Sub-cutaneous insulin administration: advantages of osmotic pumps on diabetic rats metabolic control improvement** & A. Schaschkow, C. Mura, W. Bietiger, C. Peronet, C. Bruant-Rodier, M. Pinget, N. Jeandidier, S. Sigrist, E. Maillard, **Intra-omental implantation: a promising novel technique for islets transplantation,** 5th EPITA Winter Symposium & 34th AIDPIT Workshop Igls/Innsbruck, Austria: 25-27 January 2015. *Acta Diabetol.* 2015 Jan 23 Page 198-199.

10 Brevet et publication en préparation

Brevet

Un brevet est en cours de préparation avec le CTTM (fournisseur d'hydrogels).

Inventeurs : A. Schaschkow, E. Maillard, S. Sigrist et P. Marmey

Partie concernée : Greffe intra-omentale d'îlots avec les hydrogels

Titre provisoire : Dispositif et hydrogels en vue d'une greffe intra-tissulaire de cellules

Publications

- A. Schaschkow, C. Mura, E. Seyfritz, C. Sookhareea, W. Bietiger, C. Peronet, N. Jeandidier, M. Pinget, S. Sigrist, E. Maillard Pedracini. **Pancreatic islet loss in culture: identification of essentials elements to fight against anoikis. Cell transplantation.** (Cette publication réunira les données collectées sur l'alginate et les RGD en culture, soumission prévue en 2016).
- Les données sur les hydrogels d'HPMC plasma seront publiées après dépôt du brevet.

11 Conférences et congrès

Communications orales

- Présentation au sein de la conférence du Pr. Guy Magalon : « Du tissus adipeux à la cellule souche mésenchymateuse : applications diverses » - Juin 2016 - Strasbourg, France :
Environnement et site receveur : enjeux majeurs pour la survie des îlots pancréatiques
- EST Transplant - Novembre 2015 - Strasbourg, France :
Transplantation intra-omentale d'îlots pancréatiques, une alternative prometteuse pour la thérapie du diabète de type 1
- 5th joint EPITA and AIDPIT Winter Symposium - January 2015 - Innsbruck/Igls, Autriche :
#1 Sub-cutaneous insulin administration: advantages of osmotic pumps on diabetic rats metabolic control improvement.
#2 Intra-omental implantation: a promising novel technique for islets transplantation.
- 4th joint EPITA and AIDPIT Winter Symposium - January 2014 - Innsbruck/Igls, Autriche :
Optimization of pancreatic islet implantation using oxygenated-plasma gels as provisional support.

Communications affichées

- 52nd EASD (European Association for the Study of Diabetes) annual meeting – Septembre 2016 – Munich – Allemagne :
Intra-omental graft with a plasma hydrogel carrier: a novel alternative for islet transplantation

- 6th joint EPITA and AIDPIT Winter Symposium - Janvier 2016 - Innsbruck/Igls, Autriche:
Improvement of intra-omental islet implantation by ECM enriched scaffolds
- IPITA-IXA-CTS joint Meeting - Novembre 2015 - Melbourne, Australie :
Intra-omental implantation: a promising novel technique for islet transplantation
- Congrès annuel de la Société Francophone du Diabète – Mars 2015 – Bordeaux, France :
Administration sous-cutanée d'insuline: avantages des pompes osmotiques sur l'amélioration du contrôle métabolique des rats diabétiques
- The 8th international conference on Advanced Technologies & Treatments for Diabetes - Février 2015 – Paris, France:
Oxygenated-plasma matrix as support for islet culture, in vitro validation.
- 14^{ème} congrès annuel de la Société Francophone de Transplantation – Décembre 2014 - Caen France:
Optimisation de la survie des îlots pancréatiques: utilisation de matrices oxygénées comme support de culture

12 Distinctions

- Bourse de voyage pour participation au Congrès EASD (SFD, Juin 2016).
- Prix de recherche « Benjamin RAMUS » : *Transplantation intra-omentale d'îlots pancréatiques, une alternative prometteuse pour la thérapie du diabète de type 1* (EST Transplant, Novembre 2015, Strasbourg France).

13 Annexes

- A. Impact of an autologous oxygenating matrix culture system on rat islet transplantation outcome**
- B. Impact of the type of continuous insulin administration on metabolism in a diabetic rat model**

A.



Impact of an autologous oxygenating matrix culture system on rat islet transplantation outcome



A. Schaschkow^a, C. Mura^a, W. Bietiger^a, C. Peronet^a, A. Langlois^a, F. Bodin^d, C. Dissaux^d, C. Bruant-Rodier^{a,d}, M. Pinget^b, N. Jeandidier^{a,b}, M.T. Juszczak^c, S. Sigrist^a, E. Maillard^{a,*}

^a UMR DIATHEC, EA 7294, Centre Européen d'Etude du Diabète, Université de Strasbourg, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg, Bld René Leriche, Strasbourg, France

^b Structure d'Endocrinologie, Diabète-Nutrition et Addictologie, Pole NUDE, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

^c Department of Vascular Surgery, John Radcliffe Hospital, Oxford, United Kingdom

^d Service de chirurgie Plastique et maxillo faciale, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Strasbourg, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 15 October 2014
Accepted 1 February 2015
Available online

Keywords:
Type 1 diabetes
Plasma matrix
Perfluorodecalin
IBMIR
Intraportal transplantation

ABSTRACT

Disruption of the pancreatic islet environment combined with the decrease in oxygen supply that occurs during isolation leads to poor islet survival. The aim of this study was to validate the benefit of using a plasma-based scaffold supplemented with perfluorodecalin to improve islet transplantation outcome.

Rat islets were cultured in three conditions: i) control group, ii) plasma based-matrix (P-matrix), and iii) P-matrix supplemented with emulsified perfluorodecalin. After 24 h culture, matrix/cell contacts (Integrin β 1, p-FAK/FAK, p-Akt/Akt), survival (caspase 3, TUNEL, FDA/PI), function, and HIF-1 α translocation were assessed. Afterwards, P-matrices were dissolved and the islets were intraportally transplanted. Graft function was monitored for 31 days with glycaemia and C-peptide follow up. Inflammation was assessed by histology (macrophage and granulocyte staining) and thrombin/anti-thrombin complex measurement.

Islet survival correlated with an increase in integrin, FAK, and Akt activation in P-matrices and function was maintained. Perfluorodecalin supplementation decreased translocation of HIF-1 α in the nucleus and post-transplantation islet structure was better preserved in P-matrices, but a quicker activation of IBMIR resulted in early loss of graft function.

"Oxygenating" P-matrices provided a real benefit to islet survival and resistance *in vivo*. However, intraportal transplantation is not suitable for this kind of culture due to IBMIR; thus, alternative sites must be explored.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Pancreatic islet transplantation has proven to be a successful cell therapy for reversing life-threatening hypoglycaemic unawareness for type 1 diabetic patients [1,2]. However, several pancreases are

required to obtain sufficient engrafted islet mass to reach insulin-independence in a single patient. Indeed, the number of isolated islets falls dramatically during the process of isolation and transplantation because they are weakened by hypoxia, anoikis, and the inflammatory coupled with thrombotic reaction (IBMIR) [3–6].

Pancreatic islets represent only 2% of the whole pancreas. They are complex structures composed of different cell types with specific function in glycaemia regulation and are often compared to mini organs scattered in the pancreatic tissue. To ensure glycaemic control, islets are vascularized by a rich network [7] of vessels providing nutrient supply, hormone transport, and a high oxygen partial pressure (~40 mm Hg) [8]. To preserve islet structure, contacts with the surrounding tissue are maintained by integrin receptors such as the β 1 integrin subunit. The structural role of β 1

Abbreviations: ECM, extra-cellular matrix; ePFD, Emulsified perfluorodecalin; FAK, Focal Adhesion Kinase; FDA, Fluorescein Diacetate; HIF-1 α , Hypoxia-inducible factor 1 α ; IBMIR, Instant Blood Mediated Inflammatory Reaction; PI, Propidium iodide; PI3K/Akt, Phosphatidylinositol-3'-kinase/Protein kinase B; PV, Portal vein; STZ, Streptozotocin; TAT, Thrombin–Antithrombin complex; TUNEL, Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labelling.

* Corresponding author.

E-mail address: e.pedracini@eed-diabete.org (E. Maillard).

http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.02.031
0142-9612/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

integrin is its connection with surrounding collagen, laminin, and fibronectin [9], which is essential for β -cell function and insulin secretion [10,11]. Indeed, contacts with the extra-cellular matrix (ECM) create intricate interactions with the islet environment and provide cells with signals essential for islet survival and function.

During islet isolation, enzymatic digestion disrupts the integrin/ECM interaction. Thus, the survival pathway is no longer activated via focal adhesion kinase (FAK), PI3K/Akt, and the MAPKs [12] and anoikis/apoptosis is enhanced [13]. In addition, digestion disassembles vascularization and leads to long-term hypoxia in the islet core [14,15]. The chronic absence of oxygen supply enhances HIF-1 α (Hypoxia Inducible Factor-1 α) activation and apoptosis [16]. Consequently, during maintenance culture of the cells prior to transplantation, hypoxia and anoikis pathway activation disrupt islet structural organization and lead to apoptosis. Between 20% and 40% of the islets die during culture [4]. Numerous studies have shown that islet pre-conditioning in culture prior to transplantation permitted better and longer graft function. For instance, the use of anti-apoptotic agents [17,18], antioxidant agents [19], or oxygen carriers [20] in vitro provided post-transplantation benefits.

Matrices have been developed to address anoikis during islet culture, preserve islet morphology, and promote cell survival via new cell-ECM contacts [21–23]. Matrices such as collagen [24–27] and fibrin [28–30] improved islet insulin secretion and are assumed to reinforce islet structure, thus enhancing resistance to mechanical stress during transplantation [31]. Furthermore, islet survival can be improved by supplementing the matrix [32,33]. However, islet transplantation in the liver requires the islets be free-floating islets. It is therefore essential to release the islets from the matrix without damaging them. Because of their capacity to be dissolved before intraportal transplantation, fibrin-based matrices are an interesting candidate. Moreover, fibrin is naturally present in blood; therefore, plasma from the recipient could be used to build the matrix and provide nutrients to the islets without triggering rejection. However, if matrices can solve the anoikis problem, they amplify the hypoxic conditions that limit islet survival. Therefore perfluorocarbon oxygen carriers must be combined with the matrix to improve human islet survival in vitro [31].

The objective of the present study was to improve islet survival by preventing islet disruption and anoikis *in vitro* and assess the consequences *in vivo* for the graft function in the liver. Thus, a culture system using a plasma-based matrix supplemented by emulsified perfluorodecalin (ePFD) was tested *in vitro* and islets preconditioned in such a matrix were released and transplanted in the liver.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Males Wistar and Lewis rats were supplied by Janvier laboratory (Le Genes St Isle, France). Rats were housed in pathogen-free conditions, in standard collective cages housed in a temperature-controlled room ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) with a 12-h light; 12-h darkness cycle. They were fed with SAFE-A04 (Villermonois-sur-Orge, France); food and water were available *ad libitum*. All experiments were performed according to the National Institutes of Health guidelines with the authorization number: AL/60/67/02/13.

2.2. Oxygen carrier emulsion

When mixed with a matrix, perfluorocarbons are more efficient as an emulsified form [31]. Perfluorodecalin emulsions (ePFD) were formed using phospholipids E80 (0.5 g, LIPOID E80, Lipoid, Ludwigshafen, Germany), M199 medium as aqueous phase (5.7 mL, Gibco, Fisher Bioblock, Illkirch Graffenstaden, France) and PFD (7 g, F2Chemical, United Kingdom). Droplets were obtained using a Polytron and their size was reduced by ultrasound. The droplet size was controlled with a Nano particle analyser (Horiba Scientific, Kyoto, Japan) and was around 400 nm.

2.3. Islet isolation and citrated plasma collection

Pancreatic islets were isolated from 200 to 250 g male Wistar rats for the *in vitro* studies and from male Lewis rats, a syngeneic model to sustain immune reactions, for the *in vivo* studies. Islet isolation was performed according to Sutton et al. [34]. Blood was harvested from the thoracic aorta in citrate tubes and centrifuged (10 min, 5000G, 4°C). Citrated-plasma was then aliquoted and stored at -20°C until plasma-based matrix formation.

2.4. Cell culture

Islets were cultured in three different conditions. In the "control", 1000 islets were cultured in M199 medium supplemented with 10% FBS (Foetal Bovine Serum, Sigma—Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 1% AB/AM (Antibiotic/Antimycotic, Gibco, Fisher Bioblock, Illkirch Graffenstaden, France). In the "plasma" condition, 1000 islets were placed in a 250- μL plasma drop at the bottom of the plate. In the "ePFD" condition, 1000 islets were placed in 225 μL plasma supplemented with 25 μL ePFD (10% w/v). Thrombin (0.5 U, Sigma) was then added to polymerize the plasma via fibrinogen cleavage. After complete polymerization, 8 mL complete M199 was used to recover the matrix. Islets were cultured for 24 h at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere.

2.5. Islet viability

Viability of ten islets from each condition were analysed by fluorescein diacetate/propidium iodide staining (FDA/P, Sigma) by three independent investigators. The ratio of green to red cells provided the percentage viability. Images were obtained by Nikon Eclipse 50i microscopy with NIS-Element-BR software (Nikon, Amstelveen, Netherlands). Results are expressed as percentage viability.

2.6. Islet functionality

Forty islets from each experimental condition were washed extensively and incubated in Krebs Ringer bicarbonate (KRB) solution with 10% FBS and 4.4 mmol/L glucose (Sigma). Islets were then stimulated with KRB solution containing 10% FBS and 22.6 mmol/L glucose, for a final concentration of 4.4 mmol/L. Each incubation step was performed for 90 min at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. Supernatants were collected and stored at -80 °C. Insulin measurements were performed using a rat insulin enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Mercodia, Uppsala, Sweden). Results are expressed as pmol/L insulin release per 40 islets.

2.7. Protein extraction

Cytosolic, nuclear, and membrane proteins were extracted by a fractionation (NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents, and HALT™ Protease and phosphatase inhibitor cocktail, ThermoFisher Scientific, Illkirch Graffenstaden, France). Protein concentration was determined using a Bradford micro-method (Bio-Rad, Life Science Group, Marne-la-Coquette, France) and expressed as mg/mL.

2.8. Western blotting

Equal protein concentrations from each sample were mixed with sample buffer, loaded, separated by electrophoresis on polyacrylamide gel (Criterion™ XT 4–10% Bis Tris, Bio-Rad), and dried-transferred onto cellulose membranes (iBlot TM Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Membranes were probed with primary antibodies (4 °C overnight) against integrin $\beta 1$ (source rabbit 1/500e, Santa Cruz, Dallas, Texas, USA), FAK (source rabbit 1/100e, Cell Signaling, Ozyme, St. Quentin en Yvelines, France), p-FAK (source rabbit 1/500e, Santa Cruz), Akt (source rabbit 1/1000e, Cell Signaling), p-Akt (source rabbit 1/1000e, Cell Signaling), HIF-1 α (source mouse 1/500e, Santa Cruz), and β -actin (source rabbit 1/10000e, Abcam, Paris, France) as loading control. Secondary antibodies (1/500e, Anti-mouse-HRP, or 1/500e, anti-rabbit-HRP, Sigma) were incubated for 1 h at room temperature. Blots were developed with the Immun-Star™ Western™ kit (Bio-Rad) and recorded with a Chemidoc (Bio-Rad). Densitometry analysis were performed with Image J software. Results are expressed relative to β -actin.

2.9. Apoptosis

Caspase 3 activation was assessed by Quantikine® ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) in islets cytosolic extracts. Results are expressed in ng/mL.

2.10. Histology

Cultured islets were harvested, washed, and snap-frozen in optimal cutting temperature compound (Tissue O.C.T. Labonord, Templemars, France), then sliced in 5- μm sections. Apoptotic cells were visualised by TUNEL assay (Terminal deoxy-nucleotidyl transferase dUTP Nick End Labelling) (Millipore, Molisheim, France). Reactive oxygen species (ROS) were visualised with dihydroethidium (DHE, Sigma) after 30 min incubation at 37 °C, washed with phosphate-buffered saline (PBS, Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and observed by fluorescence microscopy.

2.11. Diabetes induction and monitoring

Experimental type 1 diabetes was induced pharmacologically by a single intraperitoneal injection of streptozotocin in Lewis rats (STZ, 75 mg/kg, Sigma). Diabetic rats with non-fasting blood glucose values >400 mg/dL, measured by a blood glucose monitor (AccuCheck, Roche, Basel, Switzerland), were the recipients of islet grafts. Insulin Lantus® (Sanofi Aventis, Paris, France, 2UI/200 g of body weight) was administrated subcutaneously once daily prior to transplantation.

2.12. Islet transplantation

After 24 h culture in matrices, islets were released by dissolving the clots using plasmin (200 UG, Plasmin from human plasma, Sigma). Islets were washed three times with transplantation medium (CMRL, Life Technologies) prior to transplantation. Rats were divided into the following groups: (1) sham: injection of culture medium only in the portal vein (PV) ($n = 6$); (2) control: 1000 free islets injected in the PV ($n = 8$); (3) plasma: 1000 islets cultured 24 h in a plasma clot injected in the PV ($n = 8$); (4) plasma + ePFD: 1000 islets cultured 24 h in a plasma clot + 10% ePFD injected in the PV ($n = 8$). Rats were anaesthetized with Imalgene®-Rompun® (Ketamine 100 mg/ml, Merial, Lyon, France; Xylazine 2%, Bayer Health-Care, Puteaux, France). After laparotomy, islets were infused in the liver through the portal vein. Rats were then stitched, placed under a lamp until they awakened, and treated with an anti-inflammatory (Metacam®, 1 mL/kg, Boehringer, Allemagne) and antibiotic (Baytril®, 5x, 10 mg/kg, Bayer, France) once daily for seven days post-surgery. Insulin (2 UI/200 g body weight) was administrated subcutaneously once daily, as the rats remained diabetic (glycaemia >2 g/L).

2.13. Sampling

Blood samples were collected in heparin tubes from the tail vein at 15 min before (t=0 min) and at t15 min, t2 h, t4 h, and t8 h after transplantation for 8 h follow-up. For the one-month follow-up, blood samples and body weight were recorded (expressed as weight gain/initial weight in grams) at 1 day (t=1d) before and at t0d, t1d, t3d, t7d, t10d, t14d, t21d, and t31d post-transplantation. Grafted hepatic lobes were harvested at 0 h, 4 h, 8 h, 24 h, and 31 days after transplantation; native pancreas after sacrifice at 31 days and samples were embedded in OCT.

2.14. Metabolic follow-up

Blood glucose was assessed using a RTU® dosage assay (RTU®, Biomerieux, France) and results expressed in g/L; C-peptide was analysed by ELISA (Mercodia, Uppsala, Sweden) and results expressed in pmol/L. The ratio of C-peptide and glycaemia reflects dynamic graft function.

2.15. Inflammation

Thrombin–Antithrombin complex (TAT) is a blood complex produced in response to ILMR-specific inflammation observed in islets transplantation. TAT plasma levels were assessed using ELISA kit (Cusabio, R&D, Hubei, China) according to the manufacturer protocol.

2.16. Immunohistochemistry analysis on grafts

Frozen sections (10 µm) of pancreas and liver were fixed for 10 min in 4% paraformaldehyde (PFA, Sigma) followed by antigen retrieval with 1% Sodium dodecylsulfate (SDS, Euromedex, Souffelweyersheim, France) in PBS for 5 min. Primary antibodies were incubated overnight: Guinea pig anti-insulin (1/30, Abcam), mouse anti-macrophages (1/75e, ED1, Abcam) or mouse anti-granulocyte (1/20e, AbD Serotec, Colmar, France) at 4 °C. Secondary antibodies were added and incubated for 1 h at room temperature: Anti-guinea pig Texas-Red (1/75e, Vector

Laboratories, Burlingame, CA, USA) or anti-mouse HRP-coupled secondary antibody (1/200e, Sigma). The tyramide-488 kit (Life Technologies) was used to detect HRP. Mounting media with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) was then used and slides were assessed by Nikon Eclipse 50i microscopy with Nis-Element-BR software. Fluorescence staining quantification was realised on four sections of each condition. Fluorescence was measured 100 µm around islets using Nis-Element-BR software. Results were expressed as a ratio between immune cells fluorescence intensity and islet surface.

2.17. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Statistica software (StatSoft, Maisons-Alfort, France). *In vitro* test results were analysed by one-way ANOVA with LSD Fisher's post-hoc test for parametric data or Kruskal-Wallis for non-parametric analysis. *In vivo* results were analysed by repeated-measures ANOVA or one-way ANOVA with a LSD Fisher's post-hoc test. Results are presented as mean ± SEM. P values of less than 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Cell-matrix interaction

Integrins are mediators of cellular environment signals and promoters of several survival pathways. $\beta 1$ integrin was overexpressed in the plasma condition versus the control ($p = 0.0039$; Fig. 1A). The presence of ePFD enhanced integrin expression ($p = 0.0023$ vs. plasma). Activation of integrin correlated with downstream proteins in the survival pathway such as FAK and Akt. Activation of FAK and Akt (Fig. 1B, C) followed the same pattern as integrin expression, with a significant increase when islets were cultured in matrices (Control vs. plasma, p-FAK/FAK; $p = 0.0001$; pAkt/akt $p = 0.0115$). Supplementation with ePFD slightly reduced FAK and Akt phosphorylation (Control vs. ePFD; p-FAK/FAK, $p = 0.0309$ and pAkt/Akt, $p = 0.2404$).

3.2. Islet viability

FDA/PI staining (Fig. 2A, B) showed that cell viability was comparable for embedded and free islets. Levels of activated Caspase 3 were higher in control islets than in matrices, independent of ePFD (Fig. 2C) (control vs. plasma, $p = 0.0002$; control vs. ePFD, $p = 0.0002$). Accordingly, TUNEL staining was reduced in islets cultured in matrices, independent of ePFD, than in control (Fig. 2D).

3.3. Islet hypoxia

Islets cultured in plasma matrix alone exhibited a significant enhancement of HIF-1 α translocation into the nucleus as compared with control islets ($p = 0.0312$) (Fig. 3A) and correlated with an increase in ROS staining (Fig. 3B). The presence of ePFD in the

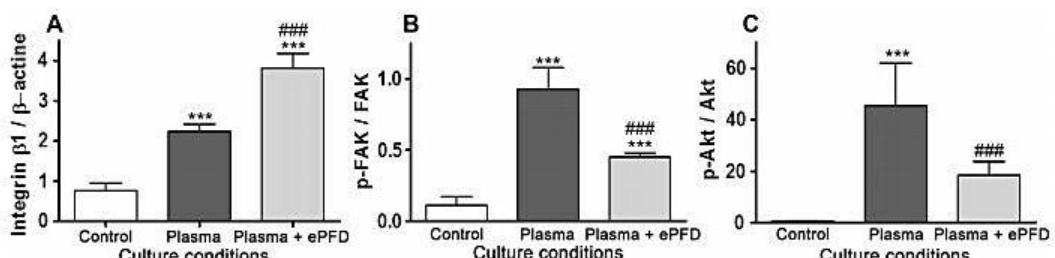


Fig. 1. Islet-plasma interactions. Islet membrane (integrin) or cytoplasmic fractions (FAK and Akt) were analysed for $\beta 1$ -integrin, p-FAK, FAK, p-Akt, and Akt expression by western blotting. Equal amount of protein were loaded with β -actin as a loading control. Quantification by densitometry was performed in Image J software. (A) $\beta 1$ -integrin, (B) p-FAK/FAK, and (C) p-Akt/Akt. Matrices enabled overexpression of $\beta 1$ -integrin and activation of FAK and Akt. Data are presented as mean ± SEM of four independent experiments. *** $p < 0.01$ vs. control, ### $p < 0.01$ vs. Plasma.

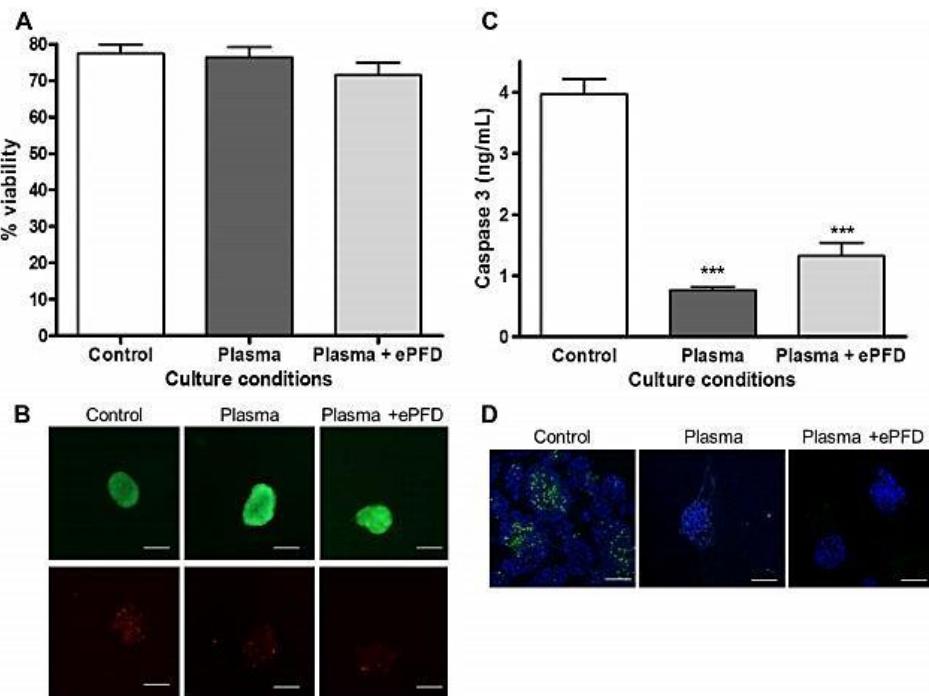


Fig. 2. Islet viability. (A) Islet viability after 24 h culture and (B) representative images. FDA green staining represents living cells and PI red staining indicates necrotic cells. (C) Caspase 3 activation in the cytosolic extract. (D) TUNEL staining of 10-μm slices; green staining represents apoptotic cells and blue represents the nucleus. Scale bars: 100 μm ***p < 0.01 vs. Control. Data are presented as mean ± SEM of 4–6 independent experiments.

matrix significantly reduced the level of HIF-1 α in the nucleus (Fig. 3A) to a level comparable to the control ($p = 0.1316$ vs. control) with a concomitant decrease in ROS staining (Fig. 3B).

3.4. Islet functionality

Glucose stimulation did not significantly differ between culture conditions. Islets responded to a rise in glucose concentration by insulin secretion (stimulation index around 5), irrespective of the culture conditions (Fig. 4). After high glucose stimulation, however, the level of insulin secretion in matrices was higher than in control.

3.5. Matrix benefit *in vivo*

Islet lysis was reflected by a rapid and massive release in C-peptide post-transplantation (within the first hours). Blood samples were taken post-infusion and C-peptide measured to assess islet resistance to the infusion process. C-peptide/glycaemia levels were significantly lower in rats that received islets previously cultured in matrix than in control ($p = 0.0002$, 15 min post-graft). Control conditions produced a massive release of C-peptide within the first minutes post-infusion (Fig. 5A).

After the preliminary short-term validation of the benefit of a matrix on islet resistance, graft follow up was continued for a month. While the control group maintained C-peptide/glycaemia levels over the course of the study (around 120 pM/g L $^{-1}$), islets previously cultured in matrices with or without ePFD had no effect

on C-peptide/glycaemia and the results were similar to the sham group (Fig. 5B). All transplanted rats except the shams gained weight continuously throughout the study (Fig. 5C).

3.6. Inflammatory status post-transplantation

We examined inflammation in order to understand the absence of graft function in plasma groups when promising results were obtained *in vitro* in terms of islet survival and resistance to mechanical stress of infusion. Formation of thrombin/anti-thrombin complex was measured in blood during the first 8 h post-transplantation. A general inflammatory status was observed, with TAT levels increased in all conditions, including the sham groups. However, areas under the curves were significantly higher for the plasma group than for the control ($p = 0.0162$) or sham ($p = 0.0013$) (Fig. 6A).

3.7. Histological assessment

Histological analysis of livers retrieved from islet graft recipients within the first hours post-infusion revealed that islet structure was maintained in the plasma group, with no insulin-positive single cells; the islets exhibited a well-preserved round structure (Fig. 6B). At 15 min post-transplantation, the islets were localized in the portal venules surrounded by macrophages but no granulocytes. Four hours post-islet infusion, numerous macrophages were observed in close vicinity of the graft in the plasma

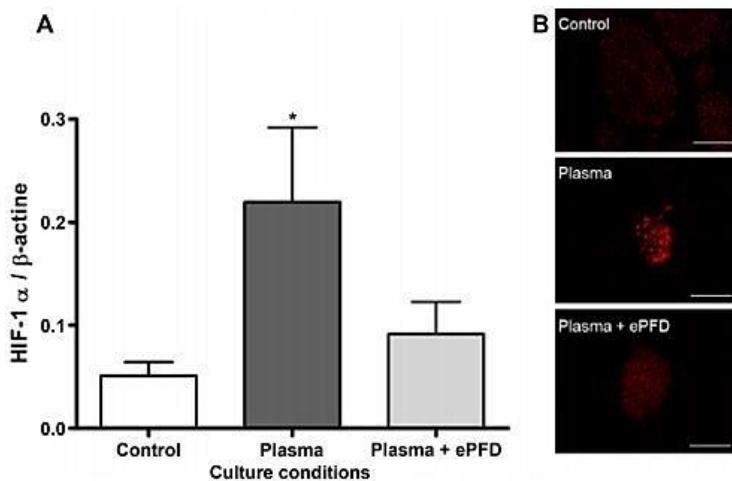


Fig. 3. Hypoxia. (A) HIF-1 α quantification in the nucleus revealed increased hypoxia in the presence of plasma matrix; this was counteracted by adding ePFD. (B) ROS staining was consistent with the HIF-1 α results. * $p < 0.05$ vs. Control. Data are presented as mean \pm SEM of four independent experiments. Scale bars: 100 μ m.

group and granulocytes started to infiltrate the islets; in the control group, macrophage and granulocyte recruitment and infiltration started at 8 h post-infusion. At 24-h post-transplantation, some intact islets survived in both groups (Fig. 6B). Thirty-one days post-infusion, islets were observed in the liver of the control group, but none were found in the matrix groups. Histological analysis of native pancreases four weeks after transplantation revealed no insulin-positive cells in either group (data not shown).

4. Discussion

In this study, we showed that a plasma-based matrix culture system improved islet survival and resistance to embolization, but supplementation with oxygen carriers was needed to reduce hypoxia caused by the embedding process. However, transplantation of islets cultured in plasma-derived matrix did not restore good

metabolic control due to enhanced activation of IBMIR and swifter destruction of the graft, thus highlighting the need to test alternative sites.

The maintenance of islet morphology is crucial for survival *in vitro* and *in vivo*. Indeed, the use of matrix pre- and post-transplantation triggers vascularization and long-term function [35–37]; however, the beneficial effect was attributed to a decrease in anoikis thanks to the presence of the matrices in fat, epidermis, and other sites post-transplantation [38–40]. In the clinical setting, the site of choice remains the liver, despite the risk of IBMIR, because it is the most efficient. The technique of islet infusion through the portal vein requires free-floating islets, which compromises the possibility of co-transplantation. The impact of decreased anoikis during culture has never been investigated in a liver model. Collagen or matrigel could be dissociated by collagenase, which may also destroy the islets. In contrast, fibrin can be dissolved by plasmin, which is harmless (data not shown).

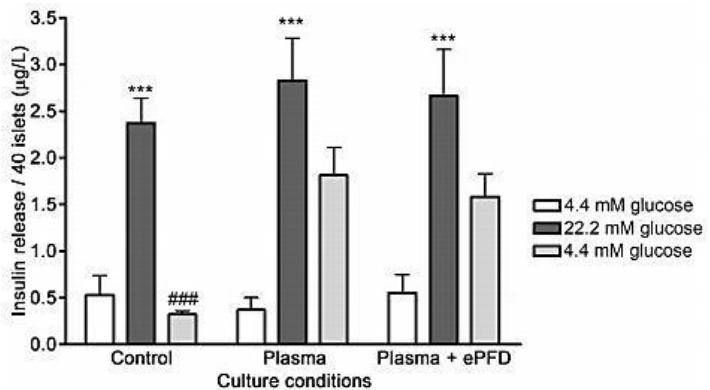


Fig. 4. Islet functionality. Islets respond to increasing glucose concentrations by inducing insulin secretion. Data are presented as mean \pm SEM of six independent experiments. *** $p < 0.01$ vs. 4.4 mM glucose. ### $p < 0.01$ vs. 22.2 mM glucose.

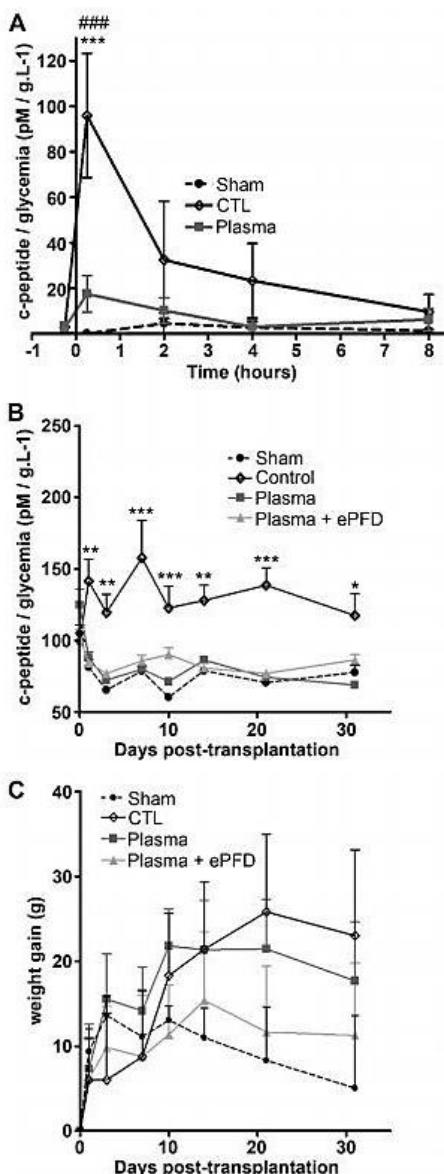


Fig. 5. Metabolic follow-up of dynamic graft function. (A) Fasting C-peptide/blood glucose levels in Lewis rats with intraportal islet transplants over 8 h. After control islet transplantation, the recipients showed a significant increase 15 min after graft compared to sham or plasma groups. Fasting TAT complex formation in Lewis rats with intraportal islet transplants and the area under the curve was significantly higher in the plasma group than in the control or sham groups ($p < 0.05$). (B) Fasting C-peptide/blood glucose levels in Lewis rats with intraportal islet transplants over 31 days. After transplantation, recipients showed good metabolic regulation until 31 days after graft. After intraportal islet transplantation of plasma or ePFD islets, however, blood glucose levels and C-peptide remained elevated. (C) Weight gain of recipient rats. Results are expressed in weight/initial weight (in grams). Rats put on weight independently of the

Here, islets were shown to be able to create contacts via integrin receptors with plasma matrix and collagen [24] or matrigel [41], although fibrin (the main component of plasma-based matrix) is not one of the classical ECM proteins. In our study, these contacts have a cellular effect, as engagement of the $\beta 1$ integrin receptors triggered phosphorylation of FAK and Akt, thereby reducing apoptosis. Akt activation via FAK plays a fundamental role in survival pathways by decreasing apoptosis [42,43] via inactivation of Bcl-2 [44,45]. Furthermore, plasma-based matrix preserved islet function after 24 h in culture; the return to basal levels was longer in matrices, probably due to insulin retention in the matrix.

However, we showed that embedding the islets in matrix enhanced hypoxia. In our study (24 h culture), we observed no relationship between hypoxic markers and apoptosis. Islets were able to handle hypoxia and ROS generated during short exposure. However, longer culture periods likely increase apoptosis [16] triggered by ROS production [46]. The lack of oxygen acts directly on electron transport and is associated with leakage of electrons from the respiratory chain, increasing ROS and cytotoxicity [47]. Thus, the apoptosis pathway is usually triggered when cells are exposed to extended hypoxic conditions [48,49], making it important to ensure sufficient oxygen supply during culture. Matrix supplementation with perfluorodecalin emulsion counteracted hypoxia and its deleterious effects. Indeed, perfluorocarbons solubilise high concentrations of gases. For instance, perfluorodecalin is a cyclic perfluorocarbon in which 35.5 mmol/L (vs. 2.2 mmol/L in water) oxygen can be dissolved and 125.0 mmol/L (vs. 57.0 mmol/L in water) carbon dioxide [50]. Perfluorocarbons, either pure or emulsified, improve islet survival in culture by improving oxygenation or by harvesting metabolic waste such as CO₂ [20,51]. However, it is important to use emulsified perfluorodecalin in the matrix to preserve the gel structure [31].

Our study showed that the major stress sustained by islets 24 h post-isolation was the lack of ECM contact, which led to rapid cell death. Providing new contacts with an artificial matrix reduced apoptosis and increased the number of islets available for transplant [52]. Clinical data showed that the transplanted islet mass is directly related to graft success [1]; therefore, it is important to prevent the loss of 10–20% of islets islet during culture [53].

To verify that islet graft survival was due to the matrices, we first tested the feasibility of matrix dissolution prior to islet transplantation. Promising short-term results were obtained, as islets pre-cultured in matrix seemed to resist the mechanical stress of infusion. Indeed, the absence of massive insulin release in the first minutes post-transplantation revealed that islets are more resistant to the traumatic event of embolization, probably due to improved structural preservation as seen in the histological analysis.

With these encouraging results, metabolic follow-up was performed over a month. Body weight gain was observed during the study and no metabolic control was detected in matrix groups, revealing massive islet death during the first few hours post-transplantation. The loss was caused by higher levels of inflammation in matrix groups (as shown by activation of thrombin/antithrombin complex formation), associated with a quicker IBMIR with immune cell activation. Thus, no function was observed in the matrix-cultured islet transplants versus the control, in which more islets survived the inflammatory process. Despite dissolution of the matrices, some residues could remain attached to the integrins and accelerate and enhance the IBMIR process. In fact, fibrin is a major element of IBMIR, largely described in islet transplantation

group during the 31 days follow-up. Control group levels tended to be higher than in all other recipients throughout the study, although the difference was not significant. Values are expressed as the mean \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.02$, and *** $p < 0.01$ vs. sham.

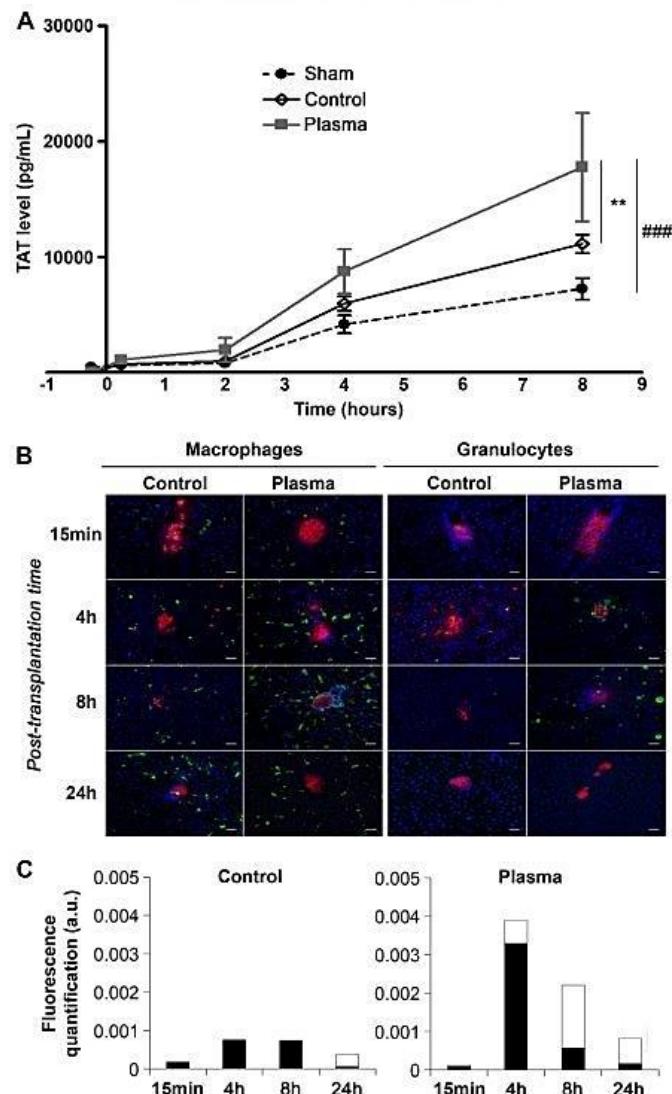


Fig. 6. Inflammation in the immediate post-transplant period. (A) Fasting TAT complex formation blood levels in Lewis rats with intraportal islet transplants; the area under the curve of the plasma group was significantly higher than in the control or sham groups. Values are expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.02$, ** $p < 0.01$ vs. control, *** $p < 0.01$ vs. sham. (B) Immunofluorescence staining of transplanted livers. Insulin is red, macrophages (left) or granulocytes (right) green, and the nucleus is blue. (C) Quantification of immune cells associated fluorescence 100 μ m around islets, either macrophages (black bars) or granulocytes (white bars). Immune cell infiltration was observed at 4 h in the plasma group, but not until 8 h in the controls. Islet morphology was better preserved in plasma than in control conditions, but islets were more exposed to immune cells.

[54–56], because of its capacity to trigger platelet aggregation and islet destruction.

5. Conclusions

This study demonstrated that oxygenated plasma-based matrices are of interest for islet culture before transplantation.

They limit the loss of islets during culture by reducing anoikis and hypoxia without reducing viability and functionality, and by maintaining islet morphology. However, liver-grafted islets were non-functional. The matrix-cultured islets enhanced IBMIR more than the control. Therefore, we demonstrated the necessity of a 3D culture system and the need for an optimized matrix composition. The next step will be to identify new dissolvable matrices that

provide the needed *in vitro* benefits and preserve islet survival in the liver. An alternative would be to extend the benefits of plasma-based matrix to the transplantation step by choosing an alternative transplant sites where the IBMIR may be avoided by preventing contact between islets and blood. The intestine [57], subcutaneous [58], or intramuscular sites [59] have been tested. Preliminary studies performed in the laboratory and others [60] have demonstrated that the greater omentum could be the best promising acceptor site for plasma-based matrix transplantation.

Acknowledgements

This work was funded by Région Alsace, BioArtMAtix-Pôle Alsace Biovalley-CQDM; 53/14/C1.

References

- [1] Barton FB, Rickels MR, Alejandro R, Hering BJ, Wease S, Naziruddin B, et al. Improvement in outcomes of clinical islet transplantation: 1999–2010. *Diabetes Care* 2012;35:1436–45.
- [2] Group CR. 2007 update on allogeneic islet transplantation from the collaborative islet transplant registry (CITR). *Cell Transpl* 2009;18:753–67.
- [3] Pepper AR, Gala-Lopez B, Ziff O, Shapiro AM. Revascularization of transplanted pancreatic islets and role of the transplantation site. *Clin Dev Immunol* 2013;2013:352315.
- [4] Kin T, Senior P, O'Gorman D, Richer B, Salam A, Shapiro AM. Risk factors for islet loss during culture prior to transplantation. *Transpl Int* 2008;21:1029–35.
- [5] Bennet W, Groth CG, Larsson R, Nilsson B, Korsgren O. Isolated human islets trigger an instant blood mediated inflammatory reaction: implications for intraportal islet transplantation as a treatment for patients with type 1 diabetes. *Ups J Med Sci* 2000;105:125–33.
- [6] Naziruddin B, Iwahashi S, Kanak MA, Takita M, Itoh T, Levy MF. Evidence for instant blood-mediated inflammatory reaction in clinical autologous islet transplantation. *Am J Transpl* 2014;14:428–37.
- [7] Zanone MM, Favaro E, Camussi G. From endothelial to beta cells: insights into pancreatic islet microendothelium. *Curr Diabates Rev* 2008;4:1–9.
- [8] Carlsson PO, Palm F, Andersson A, Liss P. Markedly decreased oxygen tension in transplanted rat pancreatic islets irrespective of the implantation site. *Diabetes* 2001;50:483–95.
- [9] Suehiro K, Mizuguchi J, Nishiyama K, Iwanaga S, Farrell DH, Ohtaki S. Fibrinogen binds to integrin $\alpha(5)\beta(1)$ via the carboxyl-terminal RGD site of the α -chain. *J Biomed Mater Res* 2000;128:705–10.
- [10] Bosco D, Meda P, Halsted PA, Rouiller DG. Importance of cell-matrix interactions in rat islet beta-cell secretion in vitro: role of α lpha β eta γ integrin. *Diabetes* 2000;49:233–43.
- [11] Hulinsky L, Harrington J, Cooney S, Silink M. Insulin secretion and DNA synthesis of cultured islets of Langerhans are influenced by the matrix. *Pancreas* 1995;11:309–14.
- [12] Gilmore AP. Anoikis. *Cell Death Differ* 2005;12(Suppl. 2):1473–7.
- [13] 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.
- [14] Lau J, Henriksson J, Svensson J, Carlsson PO. Oxygenation of islets and its role in transplantation. *Curr Opin Organ Transpl* 2009;14:688–93.
- [15] 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.
- [16] 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;16:745–7.
- [17] Emanaulee JA, Davis J, Pawlick R, Toso C, Merani S, Cai SX, et al. The caspase selective inhibitor EP1013 augments human islet graft function and longevity in marginal mass islet transplantation in mice. *Diabetes* 2008;57:1556–66.
- [18] Brandhorst D, Brandhorst H, Maataoui V, Maataoui A, Johnson PR. Anti-caspase-3 preconditioning increases proinsulin secretion and deteriorates post-transplant function of isolated human islets. *Apoptosis* 2013;18:681–8.
- [19] Mohseni Salehi, Monfared SS, Larijani B, Abdollahi M. Islet transplantation and antioxidant management: a comprehensive review. *World J Gastroenterol* 2009;15:1153–61.
- [20] Juszczak MT, Elsadig A, Kumar A, Muzyamba M, Pawelec K, Powis SH, et al. Use of perfluorodecalin for pancreatic islet culture prior to transplantation: a liquid-liquid interface culture system—preliminary report. *Cell Transpl* 2011;20:323–32.
- [21] Rosenberg L, Wang R, Paraskevas S, Mayssinger D. Structural and functional changes resulting from islet isolation lead to islet cell death. *Surgery* 1999;126:393–8.
- [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;163:181–90.
- [23] Stendahl JC, Kaufman DB, Stupp SI. Extracellular matrix in pancreatic islets: relevance to scaffold design and transplantation. *Cell Transpl* 2009;18:1–12.
- [24] Kaido T, Yebra M, Cirulli V, Montgomery AM. Regulation of human beta-cell adhesion, motility, and insulin secretion by collagen IV and its receptor alpha1beta1. *J Biol Chem* 2004;279:53762–9.
- [25] Lee BR, Hwang JW, Choi YY, Wong SF, Hwang YH, Lee DY, et al. In situ formation and collagen-alginate composite encapsulation of pancreatic islet spheroids. *Biomaterials* 2012;33:837–45.
- [26] McEwan K, Padavan DT, Ellis C, McBane JE, Vulesevic B, Korbutt GS, et al. Collagen-chitosan-laminin hydrogels for the delivery of insulin-producing tissue. *J Tissue Eng Regen Med* 2013 [ahead of print].
- [27] Beenken-Rothkopf LN, Karfeld-Sulzer LS, Davis NE, Forster R, Barron AE, Fontaine MJ. The incorporation of extracellular matrix proteins in protein polymer hydrogels to improve encapsulated beta-cell function. *Ann Clin Lab Sci* 2013;43:111–21.
- [28] Riopel M, Trinder M, Wang R. Fibrin, a scaffold material for islet transplantation and pancreatic endocrine tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev* 2015 Feb;21(1):34–44.
- [29] Daoud JT, Petropavloskaya MS, Patapas JM, Degrandpre CE, Diraddo RW, Rosenberg L, et al. Long-term in vitro human pancreatic islet culture using three-dimensional microfabricated scaffolds. *Biomaterials* 2011;32:1536–42.
- [30] Daoud J, Petropavloskaya M, Rosenberg L, Tabrizian M. The effect of extracellular matrix components on the preservation of human islet function in vitro. *Biomaterials* 2010;31:1676–82.
- [31] Maillard E, Juszczak MT, Clark A, Hughes SJ, Gray DR, Johnson PR. Perfluorodecalin-enriched fibrin matrix for human islet culture. *Biomaterials* 2011;32:9282–9.
- [32] Hlavaty KA, Gibly RF, Zhang X, Rives CB, Graham JG, Lowe Jr WL, et al. Enhancing human islet transplantation by localized release of trophic factors from PLG scaffolds. *Am J Transpl* 2014;14:1523–32.
- [33] Lu S, Lam J, Trachtenberg JE, Lee EJ, Seyednejad H, van den Beucken JJ, et al. Dual growth factor delivery from bilayered, biodegradable hydrogel composites for spatially-guided osteochondral tissue repair. *Biomaterials* 2014;35:8829–39.
- [34] Sutton R, Peters M, McShane P, Gray DW, Morris PJ. Isolation of rat pancreatic islets by ductal injection of collagenase. *Transplantation* 1986;42:689–91.
- [35] Yap WT, Salvay DM, Silliman MA, Zhang X, Bannon ZG, Kaufman DB, et al. Collagen IV-modified scaffolds improve islet survival and function and reduce time to euglycemia. *Tissue Eng Part A* 2013;19:2361–72.
- [36] Rackham CL, Dhadda PK, Chagastell PC, Simpson SJ, Dattani AA, Bowe JE, et al. Pre-culturing islets with mesenchymal stromal cells using a direct contact configuration is beneficial for transplantation outcome in diabetic mice. *Regen Therap* 2013;15:449–59.
- [37] Rackham CL, Jones PM, King AJ. Maintenance of islet morphology is beneficial for transplantation outcome in diabetic mice. *PLoS One* 2013;8:e57844.
- [38] Merani S, Toso C, Emanaulee J, Shapiro AM. Optimal implantation site for pancreatic islet transplantation. *Br J Surg* 2008;95:1449–61.
- [39] Bhang SH, Jung MJ, Shin JY, La WG, Hwang YH, Kim MJ, et al. Mutual effect of subcutaneously transplanted human adipose-derived stem cells and pancreatic islets within fibrin gel. *Biomaterials* 2013;34:7247–56.
- [40] Deng C, Vulesevic B, Ellis C, Korbutt GS, Suuronen RJ. Vascularization of collagen-chitosan scaffolds with circulating progenitor cells as potential site for islet transplantation. *J Control Release* 2011;152(Suppl. 1):e196–8.
- [41] Hamamoto K, Yamada S, Hara A, Kodera T, Seno M, Kojima I. Extracellular matrix modulates insulin production during differentiation of AR42J cells: functional role of Pax6 transcription factor. *J Cell Biochem* 2011;112:318–29.
- [42] Lee BH, Ruoslahti E. Alpha5beta1 integrin stimulates Bcl-2 expression and cell survival through Akt, focal adhesion kinase, and Ca2+-calmodulin-dependent protein kinase IV. *J Cell Biochem* 2005;95:1214–23.
- [43] Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 1999;13:2905–27.
- [44] Stupack DG, Cheresh DA. Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *J Cell Sci* 2002;115:3729–38.
- [45] Mehlen P, Puisieux A. Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer* 2006;6:449–58.
- [46] Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2007;87:245–313.
- [47] Kim JW, Tchernyshov I, Semenza GL, Dang CV. Hif-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* 2006;3:177–85.
- [48] Zorov DB, Juhaszova M, Soltott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev* 2014;94:909–50.
- [49] Chen C, Moreno R, Samikkannu B, Bretzel RG, Schmitz ML, Linn T. Improved intraportal islet transplantation outcome by systemic IKK-beta inhibition: NF-kappaB activity in pancreatic islets depends on oxygen availability. *Am J Transpl* 2011;11:215–24.
- [50] Lowe KC. Perfluorocarbons as oxygen-transport fluids. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 1987;87:825–38.
- [51] Maillard E, Juszczak MT, Langlois A, Kleiss C, Sencier MC, Bietiger W, et al. Perfluorocarbon emulsions prevent hypoxia of pancreatic beta-cells. *Cell Transpl* 2012;21:657–69.
- [52] Navarro-Alvarez N, Rivas-Carrillo JD, Soto-Gutierrez A, Yuasa T, Okitsu T, Noguchi H, et al. Reestablishment of microenvironment is necessary to maintain *in vitro* and *in vivo* human islet function. *Cell Transpl* 2008;17:111–9.

- [53] Kin T. Islet isolation for clinical transplantation. *Adv Exp Med Biol* 2010;654:683–710.
- [54] Gott M, Tjernberg J, Dufrene D, Elgue G, Brandhorst D, Eldahl KN, et al. Dissecting the instant blood-mediated inflammatory reaction in islet xenotransplantation. *Xenotransplantation* 2008;15:225–34.
- [55] Nilsson B. The instant blood-mediated inflammatory reaction in xenogeneic islet transplantation. *Xenotransplantation* 2008;15:96–8.
- [56] Yang YG, Sykes M. Xenotransplantation: current status and a perspective on the future. *Nat Rev Immunol* 2007;7:519–31.
- [57] Kakabadze Z, Gupta S, Pileggi A, Molano RD, Ricordi C, Shatirishvili G, et al. Correction of diabetes mellitus by transplanting minimal mass of syngeneic islets into vascularized small intestinal segment. *Am J Transpl* 2013;13:2550–7.
- [58] Luan NM, Iwata H. Long-term allogeneic islet graft survival in prevascularized subcutaneous sites without immunosuppressive treatment. *Am J Transpl* 2014;14:1533–42.
- [59] Sterkers A, Hubert T, Gmyr V, Torres F, Baud G, Delalleau N, et al. Islet survival and function following intramuscular autotransplantation in the minipig. *Am J Transpl* 2013;13:891–8.
- [60] Hefty TR, Kuhn CS, Chong KT, Guiney DG, Wang W, Reems JA, et al. Omental roll-up: a technique for islet engraftment in a large animal model. *J Surg Res* 2010;161:134–8.

Research Article

Impact of the Type of Continuous Insulin Administration on Metabolism in a Diabetic Rat Model

A. Schaschkow,¹ C. Mura,¹ S. Dal,¹ A. Langlois,¹ E. Seyfritz,¹ C. Sookhareea,¹ W. Bietiger,¹ C. Peronet,¹ N. Jeandidier,^{1,2} M. Pinget,^{1,2} S. Sigrist,¹ and E. Maillard¹

¹UMR DIATHEC, EA 7294, Centre Européen d'Etude du Diabète, Université de Strasbourg (UdS), Boulevard René Leriche, 67200 Strasbourg, France

²Department of Endocrinology, Diabetes, and Metabolic Diseases, Pôle NUDE, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (HUS), 67000 Strasbourg Cedex, France

Correspondence should be addressed to E. Maillard; e.pedracini@eed-diabete.org

Received 8 April 2016; Revised 26 May 2016; Accepted 14 June 2016

Academic Editor: Bernard Portha

Copyright © 2016 A. Schaschkow et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Exogenous insulin is the only treatment available for type 1 diabetic patients and is mostly administered by subcutaneous (SC) injection in a basal and bolus scheme using insulin pens (injection) or pumps (preimplanted SC catheter). Some divergence exists between these two modes of administration, since pumps provide better glycaemic control compared to injections in humans. The aim of this study was to compare the impacts of two modes of insulin administration (single injections of long-acting insulin or pump delivery of rapid-acting insulin) at the same dosage (4 IU/200 g/day) on rat metabolism and tissues. The rat weight and blood glucose levels were measured periodically after treatment. Immunostaining for signs of oxidative stress and for macrophages was performed on the liver and omental tissues. The continuous insulin delivery by pumps restored normoglycaemia, which induced the reduction of both reactive oxygen species and macrophage infiltration into the liver and omentum. Injections controlled the glucose levels for only a short period of time and therefore tissue stress and inflammation were elevated. In conclusion, the insulin administration mode has a crucial impact on rat metabolic parameters, which has to be taken into account when studies are designed.

1. Introduction

Glycaemia regulation is closely controlled by beta cells (β -cells), which routinely monitor blood glucose increases and control insulin release. Blood insulin rise triggers glucose absorption and storage in hepatic, adipose, and muscle cells. The rapid regulation by β -cells permits the blood glucose to return to a normal fasting level within an hour after eating [1]. Uncontrolled glycaemia and a high level of blood glucose are associated with diabetes, in particular type 1 diabetes, which is an autoimmune disease triggering the specific destruction of β cells. The lack of insulin cannot be compensated by other hormones since insulin is the unique hypoglycaemic hormone. Moreover, because of its sensitivity to the digestive tracts [2], insulin needs to be injected by the parenteral route to be biofunctional.

The main issue with insulin injection self-management is that the proper tight regulation of glycaemia to that of β -cells is dependent upon the compliance of the patient. The right dose of insulin needs to be administrated at the right time and it is based mainly on experience and training. In order to mimic β -cell action, different types of insulin are available: rapid-, long-, and medium-acting insulin types. Type 1 diabetic patients typically require some basal level of insulin, provided by a long-acting insulin (given once or twice a day), as well as short- and rapid-acting insulin types to cover meals (bolus insulin). The compliance of the patient can be improved by the use of a pump to allow continuous insulin release. In fact, pumps can release a small amount of rapid insulin continuously as a basal level, and a bolus can be ordered directly via the pump at meal time. Administration of a continuous release of rapid-acting insulin is more reliable

than multiple injections of the long-acting insulin. Indeed, in numerous clinical studies [3–8], continuous release has shown improvements of blood glucose values [9] and HbA1c levels [10], as well as decreases in global inflammation [11, 12] and oxidative stress [13] levels in plasma of diabetic patients equipped with pumps.

The different impact of the two modes of insulin administration is well documented in humans but barely so in rodent models, which is the main model used in research. Since the differences between injection and continuous delivery in humans are so important in terms of global inflammation and oxidative stress, the differences are likely to be equally as important in rodent models, and the choice of insulin administration could interfere with the results of a study, especially with rats which do not have a specific meal time and eat all night long. Currently, insulin administration in research animals is done to comply with guidelines set by animal welfare authorities and usually depends upon the habits and means of the different laboratories. It is thought so unimportant that it is scarcely described in publications [14]. However, from a previous work, we highlighted that global and organ-specific stress and inflammation are dependent upon glycaemia. Indeed, when glycaemia was regulated, a decrease in oxidative stress and inflammation was observed [15]. In that case, the portal route allows the first insulin clearance by the liver and better regulation. With regard to the administration mode, since continuous insulin delivery permits better glycaemic regulation than injections, the use of pumps in rodent models could have an important impact on inflammation and oxidative stress, especially in the liver and omentum (fat tissue), the principal organs of glycogen storage [15, 16].

In order to identify the impact of the chosen modes of insulin administration, a single injection of long-acting insulin was compared with continuous release of rapid-acting insulin. Either insulin with retarded activity or osmotic pumps provide a continuous insulin diffusion replacing the basal insulin delivered by the pancreas. The impact of these two treatments on rat metabolism was studied, specifically on liver and omental inflammation and oxidative stress.

2. Material and Methods

2.1. Animals. Males Lewis rats were supplied by Janvier Laboratory (Le Genes St. Isle, France). The rats were housed in standard collective cages under pathogen-free conditions in a temperature-controlled room ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) with a 12 h light:12 h darkness cycle. They were fed SAFE-A04 rodent chow (Villemoisson-sur-Orge, France); the food and water were available ad libitum. All experiments were performed according to the National Institutes of Health guidelines (Authorization Number AL/60/67/02/13).

2.2. Diabetes Induction. Experimental type 1 diabetes was induced pharmacologically in Lewis rats by a single intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ; 75 mg/kg diluted in citrate buffer, pH 4.5; Sigma, St. Louis, MO, USA). Diabetic rats with nonfasting blood glucose values >400 mg/dL, as measured by a blood glucose monitor (AccuCheck, Roche,

Basel, Switzerland) and confirmed by a glucose assay kit (RTU® Glucose; bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France), were used in the study. The diabetic state of each rat was verified from its C-peptide level. Blood analysis showed a statistically significant reduction of C-peptide levels in STZ-injected rats compared with their control nondiabetic (CTL ND) counterparts ($p < 0.01$). The low levels of C-peptide remained stable throughout the study (day 14 levels: CTL ND: 2500.63 ± 120.54 pmol/L; diabetic: 15.71 ± 7.50 pmol/L; injection: 13.24 ± 5.06 pmol/L; pump: 6.25 ± 4.31 pmol/L).

2.3. Pump Preparation. Osmotic pumps (Alzet®, Cupertino, CA, USA) were loaded with Insuman® 400 IU/mL (Sanofi-Aventis, Paris, France) and placed in warm (37°C) saline solution for 24 h prior to implantation in order to be activated. The dose loaded into the pump allowed for a 30-day release of 4 IU/day, according to the technical description furnished by the supplier. Diluted Insuman (120 IU in buffer solution used for insulin pumps (Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt am Main, Germany)) was loaded into the pumps, which were set at a pumping rate of $2.5 \pm 0.5 \mu\text{L}/\text{h}$ to allow delivery of 3.60 ± 0.72 IU/day of insulin.

2.4. Insulin Therapy. Rats were divided randomly into the following four groups: (i) nondiabetic control rats, untreated (CTL ND group, $n = 6$), (ii) diabetic rats, untreated (diabetic group, $n = 6$), (iii) diabetic rats, treated via injections (injection group, $n = 11$), and (iv) diabetic rats, treated via pumps (pump group, $n = 9$). Rats from the Injection group received 4 IU/200 g of body weight per day of a long-acting insulin (100 UI/mL Insulin Lantus; Sanofi-Aventis, France) via a daily subcutaneous (SC) injection. The pump group receive 4 IU/200 g of body weight per day of a short-acting insulin (Insuman) delivered continuously via an osmotic pump (Alzet) placed in the dorsal SC space. Briefly, rats were anaesthetised with isoflurane (Abbott Laboratories, Berkshire, UK) and placed in the prone position. The skin was shaved and an incision was made longitudinally with a scalpel. The preactivated pump was then introduced through the skin incision with its head in the opposite site of the incision. The incision was then stitched up and the rats were placed under a lamp until they awoken. Thereafter, the rats were treated with an antibiotic (5%, 10 mg/kg Baytril®; Bayer, Lyon, France) once daily for 7 days after surgery.

2.5. Study Scheme. Diabetes was induced 1 week before the first injection or pump implantation. Metabolic follow-up was carried out by analysing tail-vein blood, sampled at days 0, 7, 14, 21, and 28 after treatment. The body weight and noninvasive glucose monitoring (AccuCheck) were assessed three times a week. Two time scales were used in this study for assessing the insulinaemia and glycaemia of rats: a short time after SC insulin treatment (namely, 5 h after ($t + 5\text{ h}$)) and a long time after treatment (namely, 22 h ($t + 22\text{ h}$)). The intraperitoneal glucose tolerance test (IpGTT) was conducted on day 14. The rats were sacrificed on day 28. Total blood was collected into heparinised tubes and then plasma-frozen. Liver and omental tissues were snap-frozen in optimal cutting

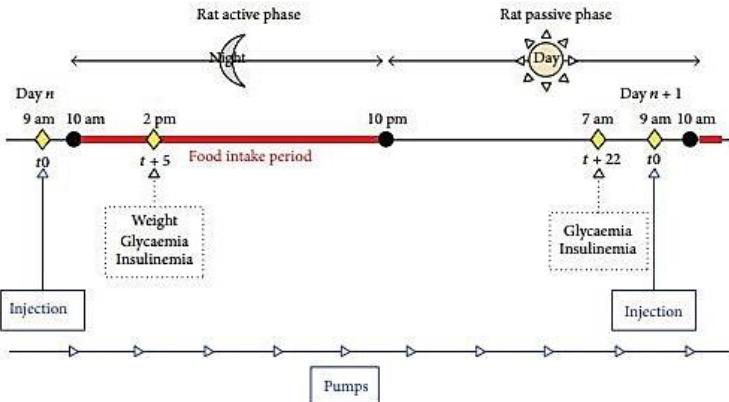


FIGURE 1: Experimental daily scheme. Blue represents the two insulin administration modes. For the single injection group, 4 UI/200 g of body weight of long-acting insulin was administered each day at 9 am. Analyses were carried out at $t + 5$ and $t + 22$ h thereafter. For the continuous insulin administration group (via pumps), a rapid-acting insulin was loaded into the osmotic pump to allow a delivery of 4 UI/200 g of body weight per day. The injection point t_0 corresponds to 9 am and analyses were carried out at $t + 5$ and $t + 22$ h thereafter.

temperature compound (Tissue OCT, Labonord, Templemars, France) (Figure 1).

2.6. Intraperitoneal Glucose Tolerance Test. Intraperitoneal glucose tolerance test (IpGTT) was realized on day 14. Briefly, nonfasting rats were placed in clean cages with no food or feces in hopper or bottom of cage with water access *ab libitum*. Glycaemia was recorded with fingerpick at the end of the tail and blood glucose meter. Baseline glycaemia was measured at t_0 and then intraperitoneal injection of 2 g of glucose/kg body was realized. Blood glucose levels were measured at 15, 30, 60, and 120 minutes after glucose injection. Food was then reintroduced at the end of the test.

2.7. Analysis of Blood Parameters. The blood glucose was assessed using a glucose assay kit (RTU, bioMérieux) and results were expressed in g/L. Rat C-peptide and human insulin were analysed by ELISA (enzyme linked immunosorbent assay, Mercodia, Uppsala, Sweden) and the results were expressed in pmol/L and mU/L, respectively. Insulinaemia and glycaemia status were assessed at $t + 5$ and $t + 22$ h after insulin injection. Plasma fructosamine (expressed in $\mu\text{mol}/\text{L}$) was quantified at the time of sacrifice, using a colorimetric method of Laboratoire Cerba (Cergy Pontoise, France).

2.8. Hepatic and Omental Oxidative Stress. The oxidative fluorescent dye dihydroethidine (DHE) was used to evaluate *in situ* formation of reactive oxygen species (ROS), following the method described by Dal-Ros et al. [17]. Unfixed liver or omental tissues were cut into 10 μm thick sections, treated with DHE (2.5 μM), and incubated in a light-protected humidified chamber at 37°C for 30 min. The level of ROS was determined using a microscope and whole fluorescence of tissue was quantified with the microscope assistant (NIS-Elements BR, Nikon, Paris, France). The fluorescence

intensity of liver was quantified in five arbitrarily selected fields and the mean value for each section was calculated.

2.9. Hepatic and Omental Inflammation. Hepatic and omental macrophage staining was carried out using 10 μm thick tissue sections on slides. In brief, the slides were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min and then incubated with 3% H₂O₂ in methanol in order to block endogenous peroxidases. The slides were then blocked and incubated with a 1:1000 dilution of rabbit anti-Iba-1 antibody (Wako Chemicals GmbH, Neuss, Germany) for 1 h at room temperature. The biotinylated secondary antibody and reagent solution were provided in the Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Detection was done using the 3,3-diaminobenzidine (DAB) peroxidase substrate kit (Vector Laboratories), and the slides were counterstained with Harris hematoxylin (Labonord, Templemars, France). Observations were made and pictures were taken with a camera-attached microscope (Nikon, France) and macrophage quantification was determined using ImageJ software.

2.10. Statistical Analyses. Statistical analyses were performed using Statistica software (StatSoft, Maisons-Alfort, France). Results were analysed by repeated-measures analysis of variance (ANOVA) or one-way ANOVA with a Fisher's least-square difference *post hoc* test. Results are presented as mean \pm SEM. A p value of less than 0.05 was considered statistically significant. For graphic representation, a p value < 0.05 was defined as *, $p < 0.03$ as **, and $p < 0.01$ as ***.

3. Results

3.1. Human Insulin

3.1.1. Short-Time Study. At 5 h after injection, human insulin was detectable in both groups of treated rats and was

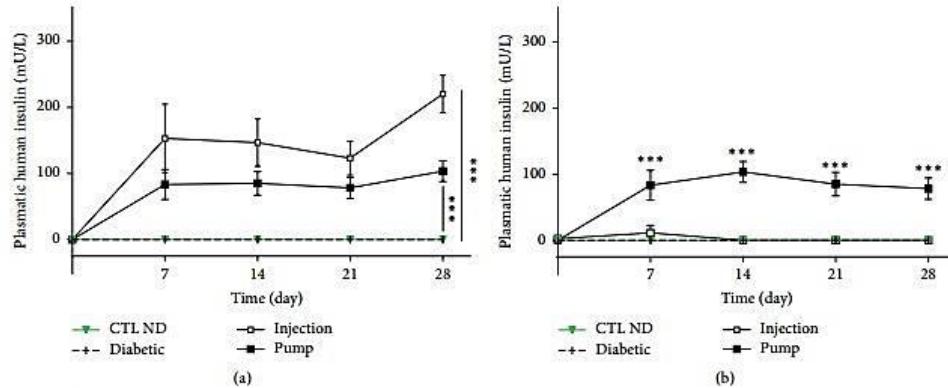


FIGURE 2: Plasma levels of human insulin at 5 h (a) and 22 h (b) after insulin administration. For both control nondiabetic (CTL ND) and diabetic rats which received no insulin treatment, human insulin was undetectable at $t + 5$ or $t + 22$ h. At $t + 5$ h, both injection and pump rats presented a high level of detectable insulin, but at 22 h thereafter, only the pump group levels continued to increase while the injection group levels did not. CTL ND and diabetic groups are different from injection and pump groups at all times since 7 days ($p < 0.01$) (a); pump group is different from all other groups at all times since 7 days ($p < 0.01$) (b). *** $p < 0.01$.

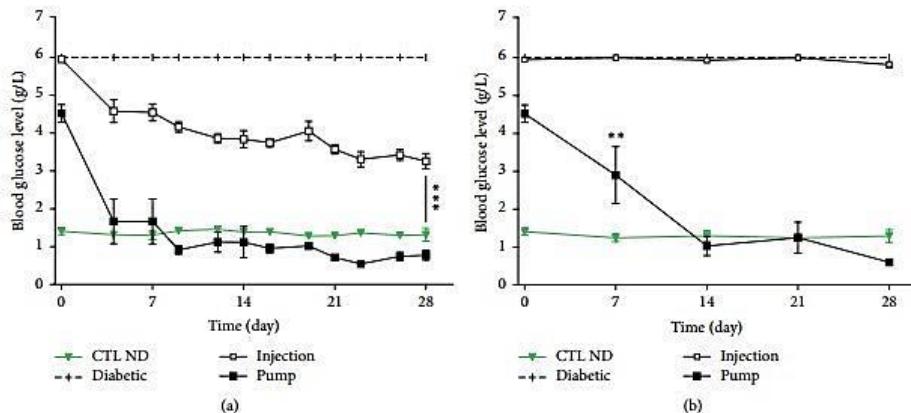


FIGURE 3: Blood glucose levels at $t + 5$ h (a) and $t + 22$ h (b) after insulin injection. At $t + 5$ h, untreated rats (CTL ND and diabetic) had, respectively, normal glycaemia and 6 g/L glucose, the highest value detectable with our material. Pump rats succeeded in achieving normoglycaemia in a few days, whereas the injection group only reached ~ 4 g/L. Diabetic group is different ($p < 0.01$) from all groups at all times. Injection group is different ($p < 0.01$) from all other groups at all times since day 4 ($p < 0.01$). Pump group is different ($p < 0.01$) from injection and diabetic group since day 4 (a). On a longer time ($t + 22$ h), CTL ND rats still had a normal blood glucose level, whereas the diabetic and injection groups levelled at 6 g/L. Pump rats still achieved normoglycaemia. Diabetic and injection groups are different ($p < 0.01$) from all groups at all times. ** $p < 0.03$ pump versus CTL ND at day 7 (b). *** $p < 0.01$.

statistically different from the CTL ND rats (day 21 levels: CTL ND: undetectable; diabetic: undetectable; injection: 123.11 ± 25.57 mU/L; pump: 78.19 ± 16.07 mU/L; $p < 0.01$ CTL ND versus injection and pump) (Figure 2(a)).

3.1.2. Long-Time Study. At 22 h after injection, human insulin was detectable only in the pump group and was statistically different from the CTL ND and injection groups (day 21 levels: CTL ND: undetectable; diabetic: undetectable; injection:

undetectable except for day 7: 11.27 ± 3.43 mU/mL; pump: 84.99 ± 17.77 mU/L, $p < 0.01$) (Figure 2(b)).

3.2. Blood Glucose Levels

3.2.1. Short-Time Study. The blood glucose levels were controlled by insulin (whether continuously delivered or by injection, Figure 3(a)) at 5 h after injection as compared with that at t_0 . Rats in the pump group were normoglycaemic

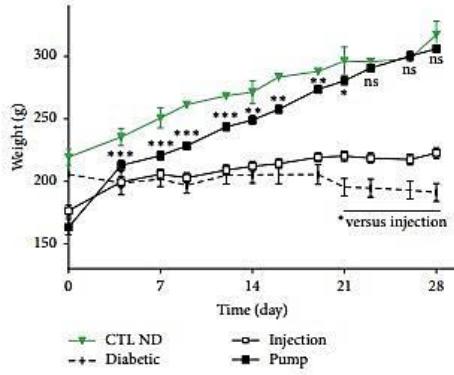


FIGURE 4: Weight of rats. The control nondiabetic (CTL ND) rats had a normal and regular weight gain curve. Rats of the pump group succeeded in reaching the control level within 21 days. Rats from the diabetic and injection groups did not gain much weight during the study period. Injection group is different from CTL ND and pump groups at all time points since day 7 ($p < 0.01$). Injection group is also different from diabetic group since day 21 ($p < 0.05$). Pumps versus CTL ND: ns = non significant. * $p < 0.05$, ** $p < 0.03$, and *** $p < 0.01$.

(below 1.20 g/L) throughout the study, whereas the glucose levels of rats in the injection group increased dramatically to ~4 g/L (day 21 levels: CTL ND: 1.28 ± 0.02 g/L; diabetic: 6.00 ± 0.00 g/L; injection: 4.05 ± 0.26 g/L; pump: 1.02 ± 0.07 g/L) (Figure 3(a)).

3.2.2. Long-Time Study. After 22 h, rats in the pump group were still normoglycaemic, whereas the blood glucose levels of rats under insulin injection therapy were comparable to those of untreated diabetic rats (day 21: CTL ND: 1.24 ± 0.02 g/L; diabetic: 6.00 ± 0.00 g/L; injection: 6.00 ± 0.02 g/L; pump: 1.25 ± 0.41 g/L) (Figure 3(b)).

3.3. Weight. The weight of rats on insulin therapy increased throughout the study, whereas that of untreated diabetic rats remained relatively unchanged. Weight gain was more prominent in the pump group (reaching the level of the CTL ND group) than in the injection group. During the first 8 days, the weight of rats in the pump group was significantly lower than that of CTL ND rats ($p < 0.01$). Over the next few days (12–19 days), the pump group weight levels were still lower than the controls but to a lesser degree ($p < 0.05$), and by the end of the study (21–28 days) there was no statistically significant difference between these two groups (Figure 4). The weight measure in the injection group was different from the controls throughout the follow-up period (0–28 days, $p < 0.01$) and was significantly lower than the pump group from day 4 onwards (4–28 days, $p < 0.01$).

3.4. Intraperitoneal Glucose Tolerance Test. Both the injection and pump groups did not have a normal IpGTT response

profile. The CTL ND group responded properly, with an initial increase of glucose level at 15 min (2.22 ± 0.19 g/L), followed by a progressive decrease at 30 min (1.50 ± 0.08 g/L), and finally reaching the normal level by 60 min (1.39 ± 0.05 g/L). The diabetic group was unable to respond properly ($t0$ min: 5.09 ± 0.04 g/L; $t15$ min: 5.55 ± 0.22 g/L; $t60$ min: 4.82 ± 0.23 g/L). The injection group did not respond to glucose ($t0$ min: 5.51 ± 0.12 g/L; $t15$ min: 5.74 ± 0.12 g/L) and was also not able to reduce the levels after glucose injection ($t60$ min: 5.13 ± 0.21 g/L). In the pump group, no glucose elevation was observed ($t0$ min: 1.06 ± 0.28 g/L; $t15$ min: 0.82 ± 0.16 g/L), and the levels remained stable during the 2 h of experiment (~1 g/L) (Figure 5).

3.5. Fructosamine Levels. Fructosamine levels reflect the glycaemic balance in rats. The levels in the pump group were comparable to those of the CTL ND group (CTL ND: 126.00 ± 5.37 μ mol/L; pump: 124.00 ± 4.03 μ mol/L, $p > 0.05$). The levels in the Injection group were statistically higher than in the CTL ND or pump groups (injection: 258.88 ± 11.52 μ mol/L, $p < 0.01$) but no difference was observed between the diabetic and injection groups (diabetic: 245 ± 4.29 μ mol/L, $p > 0.05$) (Figure 6).

3.6. Liver and Omental Oxidative Stress. The liver and omentum were chosen to study oxidative stress because they represent glucose storage organs and can be directly affected by chronic hyperglycaemia. In addition, the tissues represent the actual and an alternative site for islet transplantation, respectively. Basal fluorescence intensity was observed in the liver tissue of CTL ND rats (6.35 ± 0.85 AU). Compared with the controls, the level was significantly higher in the diabetic group (16.06 ± 1.67 AU, $p < 0.01$) and moderately higher in the injection group (11.88 ± 1.31 AU, $p > 0.05$). That of the pump group was comparable to the CTL ND group (5.48 ± 0.55 AU, not significant (ns)) (Figure 7(a)).

Similar patterns were observed in the omentum: that is, a basal level of fluorescence intensity in the CTL ND rats (0.78 ± 0.44 AU), a significantly increased level in the diabetic group (11.31 ± 5.657 AU, $p < 0.01$), a moderately higher level in the injection group (8.35 ± 4.01 AU, $p > 0.05$), and a comparable level in the pump group relative to the control rats (0.96 ± 0.36 AU, ns) (Figure 7(b)).

3.7. Liver and Omental Inflammation. The level of macrophages in the liver and omentum reflects the inflammation status in these tissues.

Macrophage staining was observed in the liver of CTL ND rats (0.76 ± 0.27 AU), and this level was comparatively much higher in the diabetic group (1.20 ± 0.23 AU, $p < 0.05$), moderately higher in the injection group (0.93 ± 0.13 AU, $p > 0.05$), and of comparable level in the pump group (0.7 ± 0.08 AU, ns) (Figure 7(c)).

In the omentum, a similar pattern of macrophage staining was observed (CTL ND: 0.35 ± 0.22 AU; diabetic: 7.66 ± 1.65 AU, $p < 0.01$; injection: 5.29 ± 1.20 AU, $p > 0.05$; and pump: 2.62 ± 0.90 AU, ns) (Figure 7(d)).

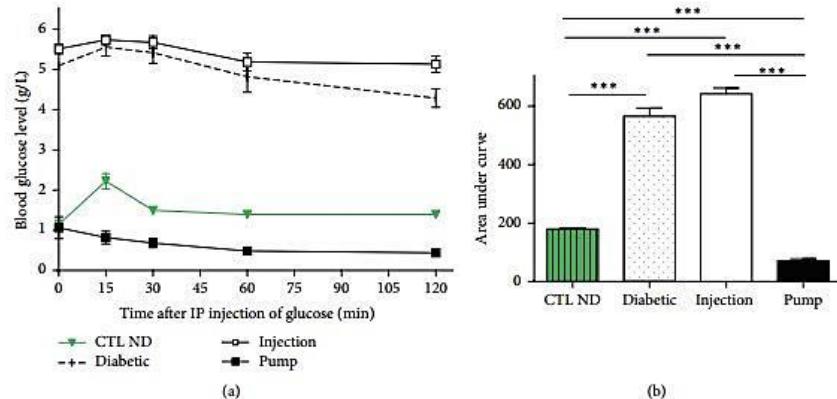


FIGURE 5: Intraperitoneal glucose tolerance test on rats. IpGTT profile (a) and areas under the curves (b). In control nondiabetic (CTL ND) rats, a rapid elevation of blood glucose (within 15 min) was observed, but with a rapid return to basal level. Diabetic and injection rats had similar profiles, with the glucose levels being much higher than the basal level and remaining high for more than 30 min. For the pump rats, glycaemia was observed only after glucose infusion. IP glucose, intraperitoneal glucose injection; IpGTT, intraperitoneal glucose tolerance test. *** $p < 0.01$.

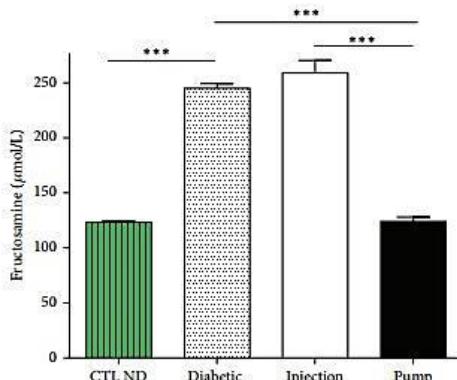


FIGURE 6: Plasma fructosamine level at time of sacrifice (30 days). Diabetic rats had a higher level of fructosamine than control nondiabetic (CTL ND) rats. Injection rats had a level comparable to the diabetic rats, whereas the level in pump rats was the same as CTL ND rats. *** $p < 0.01$.

4. Discussion

In this study, we showed that the continuous release of insulin with pumps controlled glycaemic fluctuations, which improved the metabolic parameters of oxidative stress and macrophage infiltration in both the liver and omentum. On the contrary, insulin injections did not ensure glycaemic regulation and showed a short efficiency time of the insulin despite its long-acting characteristic. Subsequently, variations

in the blood glucose levels enhanced the oxidative stress and inflammation status of the liver and omentum.

We chose the same dose for both the once-a-day long-acting injected insulin and the continuously administrated rapid-acting insulin in the hope that the effects would be similar. In fact, long-acting insulin (or better named extended-release insulin) has a delay of action of 1 h and duration of 24 h. This kind of insulin is obtained through the modification of amino acids. It is able to precipitate in the SC space through modification of the pH to 6.7 and is less soluble at physiological pH, which explains its slow action rate. Normally, this insulin can achieve a peak level for at least 24 h and is nondetectable after 22 h.

Nevertheless, the continuous delivery of small amounts of rapid-acting insulin, also designed for human use, achieved better glycaemic regulation throughout the day. The one used in our study is Insuman, which is unmodified insulin with rapid action (10–15 min) and short duration (5–8 h) times. Theoretically, both insulin types should have decreased the blood glucose levels throughout the day. The difference observed between Lantus and Insuman could perhaps have resulted from the chemical modification. In fact, modified insulin will not bind to insulin receptors with the same affinity as unmodified insulin [18]. Furthermore, the insulin used is adapted to humans, not to rats, so the structural difference and lower affinity for insulin receptors could be explanations for the lower effective action recorded. To achieve glycaemic control by injection, the doses or the number of injections should be increased [19].

The improvement of glycaemic fluctuations by a continuous release of insulin was probably due to several factors. The constant amounts of rapid-acting insulin released guaranteed the continuous presence of insulin in the blood. This has been described to be more efficient than injections in humans [9]

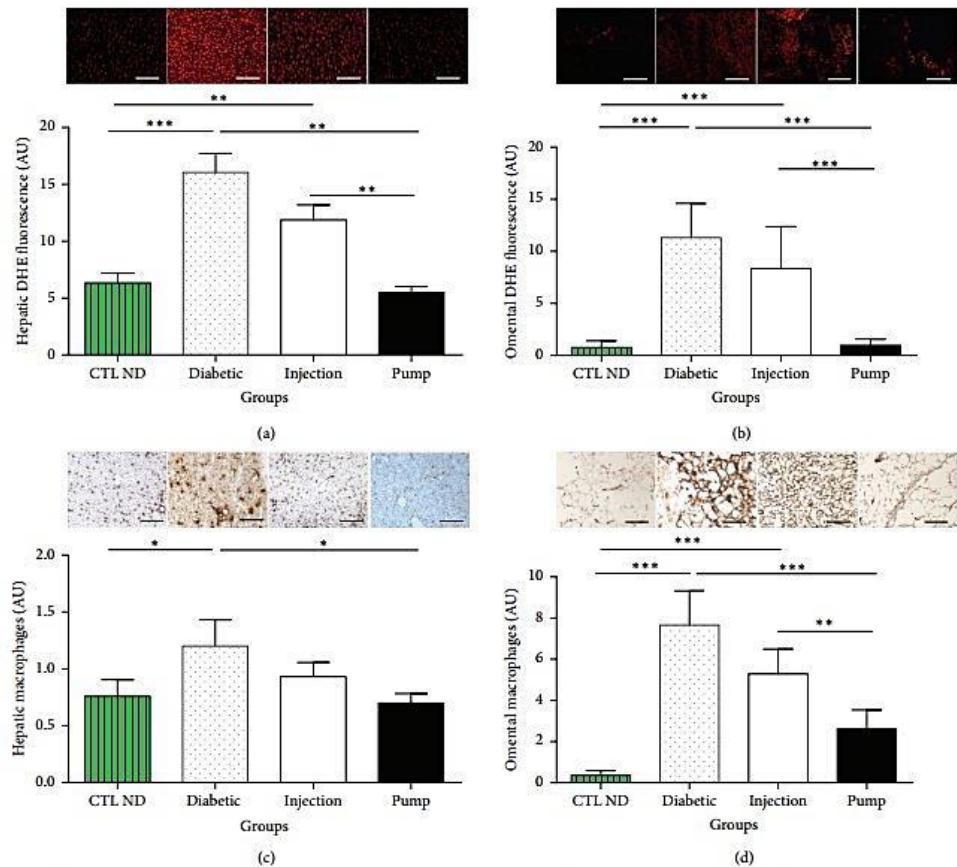


FIGURE 7: Reactive oxygen species (ROS) staining in liver (a) and omental tissue (b), macrophage staining in liver (c) and omental tissue (d), and their respective quantifications. The profiles were similar for all quantitative graphs, with diabetic rats having the highest level of oxidative stress or inflammation in both tissue sites. The control nondiabetic (CTL ND) and pump rats had the lowest level of ROS and macrophage staining. The injection group had lower levels than the diabetic group, but higher levels than the CTL ND or pump groups. * $p < 0.05$, ** $p < 0.03$, and *** $p < 0.01$. Scale bar: 100 μ m. DHE, dihydroethidium.

and, as shown in our model, likewise in rats. In the present work, injections were less efficient. The dose of insulin delivered could have been variable since it was dependent upon the manipulation, and the repetitive injections could have triggered fibrosis which prevents proper diffusion of the insulin [20]. As a result, we found that the weight gain was lower in the injection group. However, continuous insulin diffusion needs to be optimised since, in our model, the regulation of glycaemia was too efficient and the blood glucose level was very low. This large amount of insulin release could create chronic hyperinsulinaemia. This was highlighted especially by the absence of glucose increase in the IpGTT test. Hyperinsulinaemia could also have side effects on rat metabolism [21],

such as triggering insulin resistance [22–24]. In our study, however, no insulin resistance was detected as glycaemia and insulinaemia were stable throughout the study. Nevertheless, to avoid insulin resistance and to be able to control glycaemia, a 3 IU/day dose seems to be the best option for a continuous SC administration, since 2 IU had been invalidated in a previous study [15].

The decrease in glycaemic fluctuations decreased oxidative stress (presence of ROS) and inflammation (presence of macrophages) in the liver and omentum. This was in accordance with previous results stating that a better regulation of the blood glucose level using the continuous administration mode had a positive effect on oxidative stress and

inflammation in the liver [15]. By comparing the difference in glycaemic fluctuations between the pump and injection groups, we were able to identify a cause of oxidative stress and inflammation in the tissues. Glucose is known to be pro-hypertensive [25] and proinflammatory [26, 27], as proved by the increase in liver and omental macrophage infiltrations in this study. Furthermore, cells which are incubated with a high concentration of glucose tend to secrete more cytokines for a same stimulus, suggesting an underlying indirect mechanism for the glucose-induced inflammatory reaction [28]. Indeed, injections result in a variation in glucose levels, as shown by the much higher fructosamine levels, equivalent to Hb1Ac, which was a generator of oxidative stress. On the contrary, the stability of glycaemia in the pump group resulted in a significant decrease in fructosamine levels and significant decrease in oxidative stress.

The liver and omentum were chosen because they are the primary glucose storage sites and because they are the classical and a promising alternative site for islet transplantation, respectively [29]. The characterisation of these two sites has never been done in terms of inflammation and oxidative stress in relation to glycaemic regulation. Indeed, in this study, we showed that high glucose fluctuations increased oxidative stress in both the liver and omentum. During islet transplantation, it has been shown that the graft can be highly sensitive to inflammation and oxidative stress [30–32] which could lead to an early loss of the transplanted tissue. This study highlights the importance of glycaemic regulation before islet transplantation, since it can be critical for engraftment outcome. Oxidative stress is particularly relevant and dangerous for the transplanted islets, which are among those tissues that have the lowest levels of intrinsic antioxidant defenses [33]. As shown in the present study, continuous delivery of insulin was able to maintain normoglycaemia and consequently decreased oxidative stress and inflammation. As we showed, these two sites were rich in ROS in the diabetic state, and although endogenous ROS in physiological concentrations do help to maintain homeostasis, they can still cause chronic oxidative stress and adverse effects when they accumulate. It is well described that diabetes complications are generated by a high level of circulating glucose. Some studies [34] have highlighted the loss of animals as a result of severe hyperglycaemia complications and the dilemma of having to keep animals in a diabetic state for a long period while waiting for islets from, for example, human material. At this time, pumps seem to be the best option, because they can be removed at any time and can keep animals in good health while waiting for available material for islet transplantation, by limiting the adverse effects of diabetes. This study highlights the need to properly manage the diabetes before transplantation in order to allow islets to be engrafted in a healthy environment without glucotoxicity, oxidative stress, and inflammation [35].

In addition, this study was important for highlighting the differences observed in terms of metabolism, inflammation, and oxidative stress in rats treated with the same amount of insulin, a comparison that would not have been possible using different insulin doses. In fact, in diabetes studies, researchers use many different ways to implement insulin

therapies. Firstly, the type and the origin of insulin types vary: slow or rapid, human, porcine, and so forth. Secondly, doses are also not so well defined, being anywhere from 1 IU to 15 IU [36]. Making the comparison even more complex, several models of pumps exist (osmotic pumps [37, 38] or preloaded implants, also named insulin pellets [35, 39]). Unlike the case of preloaded insulin pellets, osmotic pumps need to be filled manually. Although these main differences may seem to be minor, they are in fact highly important in comparison studies, as proven by the differences observed in this study under treatment conditions that appear to be the same.

In conclusion, our comparison of the two modes of insulin delivery promotes the use of continuous insulin administration, in terms of feasibility and good results. In fact, pumps require no daily injection and facilitate rat follow-up. The well-being of the animals and the homogeneity of the results permit researchers to limit the numbers of animals and experiments used to build solid and reproducible results, as confirmed by other studies [40]. Continuous insulin release has a positive effect on rat metabolism (glycaemia, weight gain) and can limit adverse effects of the diabetic state (oxidative stress and inflammation). Additionally, this study highlights the limitations of comparative studies, as different insulin therapies could modify the metabolic parameters.

Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

References

- [1] M. Fízeiová, H. Cederberg, A. Stancáková et al., "Markers of tissue-specific insulin resistance predict the worsening of hyperglycemia, incident type 2 diabetes and cardiovascular disease," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 10, Article ID e109772, 2014.
- [2] Z. Liefeng, H. Jiang, W. Zhu et al., "Improving the stability of insulin in solutions containing intestinal proteases in vitro," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 9, no. 12, pp. 2376–2387, 2008.
- [3] M. Joshi and P. Choudhary, "Multiple daily injections OR insulin pump therapy: choosing the best option for your patient—an evidence-based approach," *Current Diabetes Reports*, vol. 15, no. 10, article 81, 2015.
- [4] G. Mello, S. Biagioli, S. Ottanelli et al., "Continuous subcutaneous insulin infusion (CSII) versus multiple daily injections (MDI) of rapid-acting insulin analogues and detemir in type 1 diabetic (T1D) pregnant women," *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, vol. 28, no. 3, pp. 276–280, 2015.
- [5] M. Reddy, I. E. Godslund, K. D. Barnard et al., "Glycemic variability and its impact on quality of life in adults with type 1 diabetes," *Journal of Diabetes Science and Technology*, vol. 10, no. 1, pp. 60–66, 2015.
- [6] X. Yin, F. Zheng, Q. Pan et al., "Glucose fluctuation increased hepatocyte apoptosis under lipotoxicity and the involvement of mitochondrial permeability transition opening," *Journal of Molecular Endocrinology*, vol. 55, no. 3, pp. 169–181, 2015.
- [7] I. Conget, J. Castaneda, G. Petrovski et al., "The impact of insulin pump therapy on glycemic profiles in patients with type 2 diabetes: data from the Opt2mize study," *Diabetes Technology and Therapeutics*, vol. 18, no. 1, pp. 22–28, 2016.

- [8] H. Thabit and R. Hovorka, "Continuous subcutaneous insulin infusion therapy and multiple daily insulin injections in type 1 diabetes mellitus: a comparative overview and future horizons," *Expert Opinion on Drug Delivery*, vol. 13, no. 3, pp. 389–400, 2016.
- [9] J. Pickup, M. Mattock, and S. Kerry, "Glycaemic control with continuous subcutaneous insulin infusion compared with intensive insulin injections in patients with type 1 diabetes: meta-analysis of randomised controlled trials," *The British Medical Journal*, vol. 324, no. 7339, pp. 705–708, 2002.
- [10] J. H. DeVries, F. J. Snoek, P. J. Kostense, N. Masurel, R. J. Heine, and Dutch Insulin Pump Study Group, "A randomized trial of continuous subcutaneous insulin infusion and intensive injection therapy in type 1 diabetes for patients with long-standing poor glycemic control," *Diabetes Care*, vol. 25, no. II, pp. 2074–2080, 2002.
- [11] W. Huang, Y.-S. Liu, Y.-J. Wang et al., "A comparison of efficacy and safety in the treatment of hyperglycemia with continuous subcutaneous insulin with insulin pump or multiple insulin injections daily in critical elderly patients," *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*, vol. 20, no. 9, pp. 546–549, 2008.
- [12] B. W. Bode, "Use of rapid-acting insulin analogues in the treatment of patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus: Insulin pump therapy versus multiple daily injections," *Clinical Therapeutics*, vol. 29, no. D, pp. S135–S144, 2007.
- [13] I. L. Megson, A. T. Treweek, A. Shaw et al., "Continuous subcutaneous insulin infusion in patients with type 2 diabetes: a cohort study to establish the relationship between glucose control and plasma oxidized low density lipoprotein," *Journal of Diabetes Science and Technology*, vol. 9, no. 3, pp. 573–580, 2015.
- [14] A. J. F. King, "The use of animal models in diabetes research," *British Journal of Pharmacology*, vol. 166, no. 3, pp. 877–894, 2012.
- [15] S. Dal, N. Jeandidier, A. Schaschkow et al., "Portal or subcutaneous insulin infusion: efficacy and impact on liver inflammation," *Fundamental & Clinical Pharmacology*, vol. 29, no. 5, pp. 488–498, 2015.
- [16] C. Zhang, X. Lu, Y. Tan et al., "Diabetes-induced hepatic pathogenic damage, inflammation, oxidative stress, and insulin resistance was exacerbated in zinc deficient mouse model," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 12, Article ID e49257, 2012.
- [17] S. Dal-Ros, M. Oswald-Mammosser, T. Pestrikova et al., "Losartan prevents portal hypertension-induced, redox-mediated endothelial dysfunction in the mesenteric artery in rats," *Gastroenterology*, vol. 138, no. 4, pp. 1574–1584, 2010.
- [18] P. Kurtzhals, L. Schäffer, A. Sorensen et al., "Correlations of receptor binding and metabolic and mitogenic potencies of insulin analogs designed for clinical use," *Diabetes*, vol. 49, no. 6, pp. 999–1005, 2000.
- [19] R. P. Radermecker and A. J. Scheen, "Continuous subcutaneous insulin infusion with short-acting insulin analogues or human regular insulin: efficacy, safety, quality of life, and cost-effectiveness," *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, vol. 20, no. 3, pp. 178–188, 2004.
- [20] M. A. Martínez-Jiménez, J. Aguilar-García, R. Valdés-Rodríguez et al., "Local use of insulin in wounds of diabetic patients: higher temperature, fibrosis, and angiogenesis," *Plastic and Reconstructive Surgery*, vol. 132, no. 6, pp. 1015e–1019e, 2013.
- [21] G. M. Reaven, "Insulin resistance, hyperinsulinemia, hypertriglyceridemia, and hypertension: parallels between human disease and rodent models," *Diabetes Care*, vol. 14, no. 3, pp. 195–202, 1991.
- [22] P. Ky selová, M. Žourek, Z. Rušavý, L. Trefil, and J. Racek, "Hyperinsulinemia and oxidative stress," *Physiological Research*, vol. 51, no. 6, pp. 591–595, 2002.
- [23] P.-R. Ling, R. J. Smith, and B. R. Bistrian, "Acute effects of hyperglycemia and hyperinsulinemia on hepatic oxidative stress and the systemic inflammatory response in rats," *Critical Care Medicine*, vol. 35, no. 2, pp. 555–560, 2007.
- [24] M. H. Shanik, Y. Xu, J. Skrha, R. Dankner, Y. Zick, and J. Roth, "Insulin resistance and hyperinsulinemia: is hyperinsulinemia the cart or the horse?" *Diabetes care*, vol. 31, supplement 2, pp. S262–S268, 2008.
- [25] A. El Midaoui and J. de Champlain, "Effects of glucose and insulin on the development of oxidative stress and hypertension in animal models of type 1 and type 2 diabetes," *Journal of Hypertension*, vol. 23, no. 3, pp. 581–588, 2005.
- [26] P. Dandona, A. Chaudhuri, P. Mohanty, and H. Ghani, "Anti-inflammatory effects of insulin," *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, vol. 10, no. 4, pp. 511–517, 2007.
- [27] P. Dandona, A. Chaudhuri, H. Ghani, and P. Mohanty, "Proinflammatory effects of glucose and anti-inflammatory effect of insulin: relevance to cardiovascular disease," *American Journal of Cardiology*, vol. 99, no. 4, pp. 15B–26B, 2007.
- [28] S. Dhindsa, D. Tripathy, P. Mohanty et al., "Differential effects of glucose and alcohol on reactive oxygen species generation and intranuclear nuclear factor- κ B in mononuclear cells," *Metabolism: Clinical and Experimental*, vol. 53, no. 3, pp. 330–334, 2004.
- [29] A. K. Singh, K. P. Gudehithlu, N. O. Litbarg, P. Sethupathi, J. A. L. Arruda, and G. Dunea, "Transplanting fragments of diabetic pancreas into activated omentum gives rise to new insulin producing cells," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 355, no. 1, pp. 258–262, 2007.
- [30] J. D. Acharya and S. S. Ghaskadbi, "Islets and their antioxidant defense," *Islets*, vol. 2, no. 4, pp. 225–235, 2010.
- [31] S. Lablanche, C. Cottet-Rousselle, L. Argaud et al., "Respective effects of oxygen and energy substrate deprivation on beta cell viability," *Biochimica et Biophysica Acta—Bioenergetics*, vol. 1847, no. 6–7, pp. 629–639, 2015.
- [32] N. Welsh, B. Margulis, L. A. Borg et al., "Differences in the expression of heat-shock proteins and antioxidant enzymes between human and rodent pancreatic islets: implications for the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus," *Molecular Medicine*, vol. 1, no. 7, pp. 806–820, 1995.
- [33] R. P. Robertson, "Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 41, pp. 42351–42354, 2004.
- [34] M. C. Deeds, J. M. Anderson, A. S. Armstrong et al., "Single dose streptozotocin-induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models," *Laboratory Animals*, vol. 45, no. 3, pp. 131–140, 2011.
- [35] J. F. Merino, V. Nacher, M. Raurell, O. Aranda, J. Soler, and E. Montanya, "Improved outcome of islet transplantation in insulin-treated diabetic mice: effects on beta-cell mass and function," *Diabetologia*, vol. 40, no. 9, pp. 1004–1010, 1997.
- [36] M. Figliuzzi, R. Bianchi, C. Cavagnini et al., "Islet transplantation and insulin administration relieve long-term complications and rescue the residual endogenous pancreatic β cells," *The American Journal of Pathology*, vol. 183, no. 5, pp. 1527–1538, 2013.

- [37] M. Fowler, J. Virostko, Z. Chen et al., "Assessment of pancreatic islet mass after islet transplantation using *in vivo* bioluminescence imaging," *Transplantation*, vol. 79, no. 7, pp. 768–776, 2005.
- [38] C. I. Thompson, J. W. Munford, E. H. Buell et al., "Plasma constituents and mortality in rat pups given chronic insulin via injection, pellet, or osmotic minipump," *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, vol. 80, no. 3, pp. 180–192, 2002.
- [39] K. Jain, S. Asina, H. Yang et al., "Glucose control and long-term survival in biobreeding/worcester rats after intraperitoneal implantation of hydrophilic macrobeads containing porcine islets without immunosuppression," *Transplantation*, vol. 68, no. 11, pp. 1693–1700, 1999.
- [40] C. W. Grant, S. K. Duclos, C. M. Moran-Paul et al., "Development of standardized insulin treatment protocols for spontaneous rodent models of type 1 diabetes," *Comparative Medicine*, vol. 62, no. 5, pp. 381–390, 2012.

Développement et validation de matériaux biomimétiques pour l'optimisation de la transplantation d'îlots pancréatiques

Résumé

La transplantation d'îlots pancréatiques est une des thérapies proposées aux diabétiques de type 1. Cependant, la perte d'un nombre considérable d'îlots durant le processus est un frein à l'expansion de la thérapie (en culture : anoikis et hypoxie ; lors de la greffe : réactions inflammatoires intenses déclenchées lors de l'infusion intra-portale). L'objectif de ce travail était de valider un biomatériau permettant d'optimiser la transplantation d'îlots. Nous avons pu démontrer l'efficacité du plasma réticulé sur la survie des îlots en culture via une diminution drastique de l'anoikis. Nous avons également mis au point une technique de greffe intra-tissulaire à l'aide d'HPMC combinée à du plasma, permettant de reverser le diabète de manière semblable à la greffe hépatique. Ces travaux ont donc permis de valider l'importance d'un support de culture adapté, mais aussi du site receveur de la greffe et placé l'omentum comme site de choix pour ce type de greffe.

Mots-clés : Diabète – Transplantation d'îlots – Biomatériaux – Site d'implantation

Résumé en anglais

Pancreatic islet transplantation is one of the therapies proposed to type 1 diabetic patients. However, the considerable loss of islets during the process is an obstacle to the expansion of this therapy (culture: anoikis and hypoxia; at graft time: intense inflammatory reactions triggered by intra-portal islet infusion). The objective of this work was to validate a biomaterial that can optimize islet transplantation. We were able to demonstrate the effectiveness of cross-linked plasma on the islet survival in culture through a drastic reduction of anoikis. We also design a new intra-tissular grafting technique using HPMC combined with plasma, which reversed diabetes in a manner similar to the liver. This work allowed validating the importance of an adapted culture support, but also the one of the recipient site. Also, this work placed the omentum as an excellent recipient site for this kind of transplant.

Key Words: Diabetes – Islet transplantation – Biomaterials – Implantation site