#### UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

#### **UFR DE BIOLOGIE**

**ANNEE 1995** 

NUMERO D'ORDRE :

### Thèse de Sciences de la Vie et de la Santé

Présentée à l'Université de Lille I pour l'obtention du grade de Docteur en Biochimie

par

Julie KERR-CONTE

## OPTIMISATION DE LA SOURCE DE TISSU ENDOCRINE PANCREATIQUE POUR LA TRANSPLANTATION CHEZ LES DIABETIQUES DE TYPE 1

soutenue le 13 juillet 1995 devant le jury composé de :

<b>Rapporteurs</b> :	Monsieur le Professeur Lawrence Rosenberg
	Monsieur le Docteur Gérard Reach
<b>Examinateurs:</b>	Monsieur le Professeur Benoni Boilly
	Madame le Professeur Martine Lecomte-Houcke
Directeur de thèse :	Monsieur le Professeur Jean Lefèbvre



Aux futurs greffés . . .

.

.

,

Ce travail a été réalisé dans le cadre du groupe de Recherche sur la Greffe d'Ilots de Langerhans (Laboratoire d'Endocrinologie Expérimentale et Service de Chirurgie Générale et Endocrinienne) et du laboratoire de Culture Cellulaire, au CHRU de Lille.

#### A Monsieur le Professeur Jean Lefebvre:

Je vous remercie de m'avoir fait confiance, et d'avoir soutenu ce projet en lequel vous avez bien voulu croire pendant toute sa réalisation. Vous m'avez donné tous les moyens de réaliser mes recherches afin d'aboutir à cette thèse que vous me faites l'honneur de présider.

Soyez assuré de l'expression de ma profonde reconnaissance et de toute ma gratitude.

#### A Monsieur le Professeur Benoni Boilly :

C'est avec beaucoup de gentillesse et d'enthousiasme que vous m'avez accueillie en acceptant de superviser mes recherches. J'ai pu apprécier vos qualités scientifiques ainsi que l'étendue de vos connaissances.

Je tiens à vous remercier et à vous exprimer mon respect et toute ma sympathie.

#### A Madame le professeur Martine Lecomte-Houcke :

C'est grace à votre enthousiasme communicatif et à votre grande expérience que notre collaboration a pu aboutir. Votre compétence et le temps que vous m'avez accordé pour mener à bien ces études m'ont été d'une aide précieuse dont je vous sais gré.

Soyez remerciée de votre collaboration et trouvez ici le témoignage de ma gratitude.

#### A Monsieur le Docteur Gérard Reach :

Vous êtes un pionnier de la recherche sur le pancréas bioartificiel. Vos encouragements réguliers nous ont toujours stimulés pendant la réalisation de ce travail. Je vous remercie de m'avoir fait l'honneur de participer au jury de cette thèse et d'avoir fait preuve à la fois d'indulgence et de patience lors de sa rédaction.

Veuillez accepter mes sincères remerciements.

#### A Monsieur le Professeur Lawrence Rosenberg :

Je tiens tout particulièrement à vous remercier pour la spontanéité avec laquelle vous avez répondu à notre invitation. Malgré un emploi du temps surchargé, vous avez accepté de traverser l'Atlantique pour juger ce travail et je suis particulièrement sensible à l'honneur que vous me faites. Je voudrais aussi vous exprimer toute mon admiration pour l'ensemble de vos travaux de recherche.

Soyez assuré de ma sincère reconnaissance et de ma profonde estime.

Merci également au **Professeur Charles Proye** et au personnel de la Clinique Chirurgicale Adulte Est, au Service de Médecine Nucléaire et à **Mme le Docteur D'Herbomez**, au service du **Professeur Jean Petit à Amiens**, au laboratoire d'histologie du **Professeur Mazucca**, au laboratoire du Centre Oscar Lambret des **Docteurs Peyrat et Vandewalle**, au laboratoire de Biochimie du **Professeur Degand** pour l'aide qu'il nous ont apportée au cours de la réalisation de ce travail.

Je tiens à remercier de tout coeur Annie Plé pour sa participation active à ce travail depuis trois ans, mais aussi pour son dévouement, sa gentillesse, et sa bonne humeur en toutes circonstances et à toute heure!

Merci particulièrement à **Yingjian Xia**, qui durant ces deux années passées au laboratoire, n'a compté ni les heures, ni les dimanches. Sans sa présence, nous aurions difficilement pu isoler les îlots humains.

Je tiens à remercier vivement Anne-Marie Lefebvre, qui avec beaucoup de gentillesse a déjà fait ses preuves pendant la préparation de cette thèse.

Un grand merci également à Annick Lefebvre pour avoir eu le désir et le courage de se joindre à notre équipe.

Merci aussi à : Christine Hober, Marie-Christine Vantyghem, Marie-Hélène Christiaens, Raphaël Lemaire, Marie Hélène Gevaert, Xian Ge, Sophie Louchard, Michel Pottier pour leur soutien et leur aide au cours de ces années, ainsi qu'aux nombreux étudiants qui ont passé quelques temps avec nous pour secouer les chambres de digestion.

3

Un grand merci à Houcine Amrouni, pour être à nos côtés en toutes circonstances et pour toujours trouver une solution aux problèmes les plus désespérants! Nous remercions aussi Leila, Neila et Faouzi Rekik pour leur aide au cours de la rédaction de cette thèse.

De mon coeur vient un merci à ma famille, ma belle famille, et en particulier à mon rôle modèle scientifique Katie Haffen, lesquels m'ont encouragé au cour des années.

Je remercie aussi la Délégation à la Recherche du CHR de Lille, le Conseil Régional, la société Hospal R&D, ainsi qe la Fondation de l'Avenir et la fondation de la Recherche Médicale. Sans leurs soutiens financiers, je n'aurais pas pu me consacrer à ces recherches scientifiques. Pour finir je voudrais dédier cette thèse à celui qui a été au coeur de ce rêve, qui l'a fait vivre durant ces trois années souvent folles, et qui nous a permis d'en faire aujourd'hui une réalité.

A François Pattou, mon époux...

## SOMMAIRE

•

.

### TABLE DES MATIERES

#### **INTRODUCTION** 1 1. Le diabète insulinodépendant 2 1.1. Fréquence 2 1.2. Physiopathologie 2 2. Prédiction et Prévention du diabète 4 3. Traitement actuel du diabète insulino-dépendant 5 4. Transplantation de tissu endocrine pancréatique 6 5. Greffe d'Ilots de Langerhans 6 6. Conclusion 9

Première partie : ISOLEMENT ET CULTURE DES ILOTS HUMAINS

.

I. INTRODUCTION	11
I.1. Anatomie et physiologie du pancréas endocrine humain	11
I.1.1. Anatomie	11
I.1.2. Physiologie	12
I.2. L'Isolement des îlots Humains	13
I.2.1. Etudes préliminaires chez le rongeur	13
I.2.2. Isolement des îlots humains	14
I.2.3. Méthode de digestion automatisée	16
I.3. Purification des îlots	17
I.4. Conservation des îlots	18
I.4.1. Cryopréservation	18
I.4.2. Conservation hypothermique	19
I.4.3. Culture des îlots	19
I.5. Objectif de l'étude	20
II. MATERIEL ET METHODES	21
II.1. Prélèvement du pancréas	21
II.2. Dissection et distension du pancréas	22
II.3. Digestion enzymatique automatisée	22
II.4. Purification	24
II.4.1. Gradient	24
II.4.2. Test de purification	24
II.4.3. Séparateur de cellules	24
II.5. Evaluation des îlots	25
II.5.1. Evaluation quantitative	26
II.5.2. Morphologie	26
II.5.3. Viabilité	27
II.5.4. Fonction in vitro	28
II.6. Culture	29
II.7. Expression des résultats et statistiques	31
III. RESULTATS	32
III.1. Evaluation quantitative	32
III.2. Test de purification	36
III.3. Evaluation qualitative	37
III.3.1. Viabilité	37

III.3.2. Fonction des îlots	37	
III.4. Culture des îlots	39	
IV. DISCUSSION	43	
IV.1. Isolement	43	
IV.1.1. Rendement	43	
IV.1.2. Caractéristiques des donneurs	46	
IV.1.3. Conditions du prélèvement.	46	
IV.1.4. Conservation hypothermique du pancréas	47	
IV.1.5. Collagénase	48	
IV. 2. Purification	49	
IV.2.1. Technique	49	
IV.2.2. Variation des résultats	51	
IV.2.3. Test de purification	51	
IV.2.4. Intérêt de la purification	52	
IV.3. Evaluation de l'isolement	54	
IV.4. Culture	56	
IV 5. Conclusion	58	

## Deuxième partie : DEVELOPPEMENT D'UNE SOURCE XENOGENIQUE D'ILOTS DE LANGERHANS 59

I. INTRODUCTION	60
I.1. La xénogreffe	60
I.2. Pancréas bioartificiel	61
I.3. Choix de l'espèce porcine	62
I.4. Isolement des îlots porcins	62
I.5. Objectif	64
II. MATERIEL ET METHODES	65
II.1. Prélèvement du pancréas	65
II.2. Isolement des îlots porcins	65
II.2.1. Isolement	66
II.2.2. Purification	66
II.3. Evaluation des îlots	67
II.4. Autogreffe des îlots chez le porc	67
II.4.1. Greffe	68
II.4.2. Suivi des animaux	68
III. RESULTATS	70
III.1. Isolement	70
III.2. Purification	74
III.3. Evaluation des îlots	74
III.4. Autogreffe	77
IV. DISCUSSION	80
IV.1. Isolement	80
IV.1.1. Rendement de l'isolement	80
IV.1.2. Caractéristiques du donneur	83
IV.1.3. Conditions du prélèvement	84
IV.1.4. Technique d'isolement	84
IV.I.5. Collagénase	85
IV.2. Fonction in vitro des îlots porcins	86
IV.3. Culture des îlots porcins	88
IV.4. Fonction in vivo après transplantation	88
V. CONCLUSION	90

## Troisième partie : NEOFORMATION IN VITRO DE CELLULES HUMAINES SECRETRICES D'INSULINE

I. INTRODUCTION	92
I.1. Lignées cellulaires sécrétrices d'insuline	92
I.2. La néogenèse de tissu endocrine pancréatique in vitro	93
I.3. Prolifération des cellules différenciées du pancréas endocrine	94
I.4. Embryogenèse du pancréas endocrine humain	95
I.5. Réactivation à l'âge adulte de la voie embryonnaire de formation des îlots	99
I.5.1. Ligature du canal pancréatique	100
I.5.2. La compression du pancréas	101
I.5.3. Pancréatectomie partielle	101
I.5.4. Destruction chimique du pancréas endocrine	102
I.5.6. Hyperglycemie	103
I.5.7. Thyroxine	103
I.5.8. Souris transgéniques	103
I.6. Nesidioblastose d'îlots à l'âge adulte chez l'homme	105
I.7. Rôle de l'environnement cellulaire pour l'embryogenèse	106
I.8. Objectif de l'étude	107
II. MATERIEL ET METHODES	109
II.1. Isolement des îlots	109
II.2. Culture des îlots dans des matrices extra-cellulaires	109
II.3. Evaluation semi-quantitative de la formation des kystes	110
II.4. Effet des facteurs solubles	110
II.5. Inhibition de la prolifération	111
II.6. Quantification de la prolifération par l'incorporation	111
de thymidine	
II.7. Identification des structures kystiques	112
II.8. Caractérisation de la prolifération	113
II.9. Quantification du CA19-9	114
III. RESULTATS	115
III.1. Formation des kystes	115
III.2. Influence des facteurs solubles	116
III.3. Inhibition de la prolifération	117
III.4. Incorporation de la thymidine tritiée	118
III.5. Caractérisation des kystes	119

III.6. Quantification du CA 19-9	119 120
III.7. Cytodifférenciation	
IV. DISCUSSION	121
IV.1. Nature des kystes	122
IV.2. Rôle de l'environnement cellulaire	122
IV.2.1. Matrice extra-cellulaire	122
IV.2.2. Rôle des facteurs solubles	123
IV.3. Origine des structures kystiques	124
IV.4. Cytodifférenciation in vitro	126
V. CONCLUSION	128

.

## BIBLIOGRAPHIE

129

#### ABREVIATIONS

ABC : avidin biotin complex ACTH : adrenocorticotropic hormone AMPc : adénosine monophosphate cyclique ARNm : acide ribonucléique messager b-FGF : basic fibroblast growth factor BrdU: bromodeoxyuridine  $\beta$ -TC :  $\beta$  tumor cell CA-19-9 : carbohydrate antigen 19-9 CMH : complexe majeur d'histocompatibilité CMRL 1066 : Connaught Medical Research Laboratory collagène QR : collagène de queue de rat DAB: diaminobenzidine DID : diabète insulino-dépendant Dnase : deoxyribonuclease EGF : epidermal growth factor GAD : glutamate décarboyxylase GLUT-1/GLUT-2 : nom propre du transporteur de glucose HSPG : héparin sulfate proteoglycans HGF : hepatocyte growth factor IBMX : isobutyl methyl xanthine IDDM : insulin dependent diabetes mellitus IE : îlot équivalent à 150 µm IFN $\gamma$ : interferon- $\gamma$ Hepes : N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid) MEC : la matrice extracellulaire MEM : Medium essential medium NEDH : New England Deaconess Hospital NOD (souris) : non obsese diabetic PP : pancréatique polypeptide RPMI 1640 : Roswell Park Memorial Institute SCID (souris) : severe combined immuno deficient SNN : sérum de nouveau né SVF : sérum de veau foetal TGF- $\beta$  : transforming growth factor  $\beta$ TGF- $\alpha$ : transforming growth factor  $\alpha$ UW : solution de conservation de l'Université de Wisconsin

# **INTRODUCTION**

#### 1. Le diabète insulinodépendant

#### 1.1. Généralités

Le diabète de type 1 ou diabète insulinodépendant (DID) est secondaire à la destruction sélective des cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas, sécrétrices de l'insuline. C'est une maladie fréquente qui frappe 150 000 patients en France et dont l'incidence est de 7 à 10 pour 100 000 hab./an[1]. Environ 1 enfant sur 300 devient diabétique avant l'âge de 20 ans et définitivement dépendant de l'insuline. Malgré un traitement substitutif par l'insuline, le DID est à l'origine de nombreuses complications dégénératives oculaires, rénales, neurologiques et cardio-vasculaires[2]. Il constitue un problème majeur de santé publique dans les pays occidentaux[3].

#### 1.2. Physiopathologie

Le mécanisme de la destruction sélective des cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans est une réaction inflammatoire de type auto-immune (insulite) dirigée contre des antigènes exprimés par ces cellules[4]. De nombreux antigènes cibles sont reconnus par le système immunitaire au cours de la phase de début de la maladie ou pré-diabète[5]. Le rôle de certains de ces antigènes comme l'insuline ou la glutamate décarboxylase ou GAD est bien démontré[6]. D'autres antigènes ont également été incriminés comme le GM2-1, un ganglioside porteur d'un résidu d'acide sialique terminal[7], la carboxypeptidase H, l'antigène p69, une protéine de 38kd située dans les granules de sécrétion, ou un fragment de 64kd voisin du GAD.

La réaction auto-immune et la destruction des cellules  $\beta$  est une réaction mixte, à la fois humorale et cellulaire. La réaction humorale est médiée par des anticorps anti-cellules des îlots ou ICA circulants et facilement détectés par immunofluorescence sur coupes de pancréas dans le sérum des patients atteint du diabète[8] et cytotoxiques pour les cellules  $\beta$ [9]. La réaction cellulaire est provoquée par des lymphocytes T CD4+ auxiliaires de type TH1 ou TH2[10] et des lymphocytes CD8+ cytotoxiques spécifiques qui proliférent au contact des cellules insulaires[11] et infiltrent les îlots pour provoquer l'insulite. L'origine de cette réaction auto-immune reste mal connue ; elle est très probablement multifactorielle. La fréquence du diabète de type 1 est nettement augmentée chez les parents au premier degré des diabétiques. La maladie est très certainement favorisée par un terrain génétique particulier et plusieurs gènes sont probablement en cause. Il existe ainsi une forte association du diabète avec quelques haplotypes spécifiques du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe 2. Certains allèles DR (DR3 et/ou DR4 voire DR1 et/ou DR8) ou DQ (DQ8) sont retrouvés chez la majorité des diabétiques caucasiens. Un des gènes responsables du diabète pourrait donc se trouver sur le chromosome 6 à proximité des gènes codant pour les molécules DR et DO du CMH (Insulin Dependant Diabetes Mellitus 1 ou IDDM 1). Des études de liaison ont permis de distinguer d'autres locus potentiels situés sur le chromosome 11 à proximité du gène codant pour l'insuline (IDDM 2) et du gène codant pour le facteur de croissance des fibroblastes ou FGF 3 (IDDM 4) ou encore sur le chromosome 15 à proximité du gène codant pour le récepteur de l'insulin growth factor 1 ou IGF1 (IDDM 3)[12]. Cependant, bien que le terrain génétique favorise la survenue du diabète, seulement un tiers des jumeaux monozygotes de patients diabétiques développeront la maladie[13]. Le terrain génétique n'est donc pas le seul facteur en cause.

Des facteurs environnementaux comme la consommation de lait de vache[14] ou une infection par un virus de type coxsachie[15] ou d'autres entérovirus[15] ont également été incriminés[15]. Ces facteurs pourraient intervenir directement en déclenchant une réaction immunitaire croisée avec certains antigènes des cellules  $\beta$  en raison d'une mimicrie moléculaire. Une homologie de séquence existe, par exemple, entre la glutamate décarboxylase et une protéine du virus coxsackie B<sub>4</sub> ou entre l'antigène p69 des îlots et la sérum-albumine bovine. Récemment le rôle de superantigènes d'origine exogène et en particulier bactérienne conduisant à l'activation de toute une famille de lymphocytes (V $\beta$ 7) dont certains membres pourraient être dirigés contre les îlots a été également avancé pour expliquer la rupture de la tolérance pour les cellules  $\beta$ [11]. Les facteurs environnementaux pourraient également agir de façon indirecte en provoquant la production locale d'interféron  $\gamma$  au niveau des îlots[16]. C'est la souffrance induite des cellules  $\beta$  et l'hyperexpression de certains antigènes cibles à leur surface qui induiraient alors une rupture de la tolérance naturelle pour le soi[4].

#### 2. Prédiction et Prévention du diabète

L'activation de la réaction auto-immune précède de plusieurs années la destruction de l'ensemble des cellules sécrétrices d'insuline et l'apparition des signes de la maladie. La recherche de marqueurs de la réaction auto-immune chez les sujets à risque (parents de diabétiques ou sujets de type HLA DR3 ou DR4) pourrait permettre de détecter la maladie à sa phase initiale pour tenter de la prévenir. On retrouve un des auto-anticorps décrits ci-dessus dans le sérum de la plupart des parents du premier degré de patients diabétiques et 90% des patients à la phase initiale du diabète ou pré-diabète en expriment 2 ou davantage. L'expression de ces autoanticorps s'accompagne souvent d'anomalies métaboliques débutantes comme la perte de la première phase de la sécrétion d'insuline[17]. Différentes approches sont envisageables pour lutter contre la destruction des cellules  $\beta$  à la phase débutante de la maladie. Bien que les immunosuppresseurs puissent théoriquement limiter la réaction auto-immune, leur toxicité limite encore leur application pour le traitement du DID débutant[18]. Les techniques actuellement en cours d'évaluation clinique incluent : l'administration d'insuline qui en diminuant la fonction des cellules  $\beta$ , pourrait les protéger de la destruction auto-immune[19]; l'administration de nicotinamide qui, en inhibant la poly-ADP-ribose synthétase et en réduisant la production de radicaux libres, pourrait bloquer l'induction du diabète[20]; et, l'exclusion du lait de vache pour diminuer le contact antigénique chez les enfants à risques[21].

En admettant l'efficacité de ces techniques de prévention qui reste encore à démontrer, elles ne pourraient intéresser qu'une faible proportion des patients diabétiques. Le dépistage systématique dans la population générale et la recherche des marqueurs du pré-diabète chez les sujets à risque semble actuellement encore difficile (seuls 6 % des patients de type DR3/DR4 développeront un diabète) et seulement 10% des nouveaux cas de DID surviennent dans une famille comportant déjà d'autres membres atteints.

#### 3. Traitement actuel du diabète insulino-dépendant

Depuis la découverte simultanée de l'"isletin" par Banting et Best à Toronto et de la "pancréine" par Paulesco à Bucarest en 1921, le diabète de type 1 n'est plus une maladie létale grâce au traitement substitutif par l'insuline. Les progrès réalisés dans le domaine de l'insulinothérapie depuis cette date ont été considérables, tant dans le domaine de l'insuline elle même que dans celui du mode d'administration ou de la surveillance de l'équilibre glycémique. Pourtant, le traitement substitutif du DID par l'insuline ne permet toujours pas de rétablir un équilibre glycémique physiologique. Il n'évite donc pas l'apparition des complications secondaires de la maladie qui sont directement corrélées à la correction de l'hyperglycémie[22-24]. Même optimisée par des protocoles astreignants d'insulinothérapie intensive ou à l'aide de pompes portables, dans le but de maintenir le plus précisément la glycémie dans les limites de la normale, l'insulinothérapie ne permet que de ralentir la progression des complications, au prix d'un risque accru d'hypoglycémie[23]. Malgré la description de pompes à insuline intracorporelles[25], la réalisation d'un glucose sensor implantable et la mise au point d'un véritable pancréas artificiel qui régulerait en temps réel la libération d'insuline en fonction de la glycémie paraît encore bien lointaine[26].

Comme le constatait récemment Pierre Lefebvre[27], "plus de 70 ans après la découverte de l'insuline, le bilan reste terrifiant. Le patient atteint de diabète de type 1 est stricto sensu insulinodépendant. Deux heures après l'interruption d'une perfusion sous-cutanée continue d'insuline, la dégradation métabolique est évidente ; six heures après, l'hyperglycémie et la cétose sont majeures; le coma intervient en 24-48 heures et la mort est inéluctable si l'on ne reprend pas l'administration d'insuline. Miracle de l'insulinothérapie, précarité de la santé du patient privé quelques heures seulement de l'hormone à laquelle il doit la vie".

Actuellement, le seul espoir de traitement curatif du diabète de type 1 est la transplantation de tissu endocrine pancréatique.

#### 4. Transplantation de tissu endocrine pancréatique

Minkowski a été le premier, en 1892, à démontrer chez le chien que l'autotransplantation d'un segment du pancréas pouvait prévenir l'apparition du diabète après une pancréatectomie puis, en 1920, que l'allotransplantation d'un pancréas pouvait guérir temporairement le diabète chez un pancréatectomisé. En des animal préalablement 1966, l'apparition traitements immunosuppresseurs a permis à Lillehei d'effectuer les premières transplantations allogéniques de pancréas chez l'homme. Depuis, plus de 6000 transplantations ont été effectuées dans le monde[28]. Lorsque le greffon est toléré, la greffe de pancréas permet la normalisation quasi complète de la glycémie malgré la persistance d'une légère intolérance au glucose au cours d'épreuves de stimulation[29]. Après deux ans, elle permet le rétablissement du taux de l'insuline circulante et la restauration de la sensibilité des tissus périphériques à l'insuline[30]. Si elle ne permet pas la régression des lésions constituées rénales[31] ou oculaires[32], la transplantation de pancréas s'accompagne d'une réduction de la progression des complications neurologiques[33] et une amélioration du bilan lipidique[34].

En 25 ans, les progrès des techniques chirurgicales et des traitements immunosuppresseurs ont permis d'améliorer nettement les résultats de la greffe de pancréas[35]. Aujourd'hui, près de 75% des diabétiques insuffisants rénaux bénéficiant d'une greffe couplée rein-pancréas sont encore normoglycémiques deux ans après la greffe[28]. Ces bons résultats fonctionnels sont cependant grevés par une morbidité importante qui, associée aux effets secondaires de l'immunosuppression, limite encore considérablement les indications de la greffe de pancréas[36].

#### 5. Greffe d'Ilots de Langerhans

Le tissu exocrine qui représente plus de 95% du tissu pancréatique est à l'origine de la majorité des complications de la greffe de pancréas. La greffe sélective des îlots de Langerhans, qui

permettrait de transplanter uniquement le tissu endocrine (soit 2% environ du tissu pancréatique) au cours d'une intervention chirurgicale minime, serait une alternative séduisante. Elle apparaît aujourd'hui comme l'un des traitements les plus prometteurs du diabète de type 1[37].

La greffe d'îlots a été décrite dès le début du siècle[38] mais elle n'a été sérieusement envisagée pour le traitement du diabète de type 1 qu'après la démonstration de son efficacité chez le rongeur en 1972[39]. Sa faisabilité chez l'homme a été démontrée en 1980 par l'autotransplantation de préparations d'îlots non purifiés après une pancréatectomie chez des patients atteints de pancréatite chronique[40]. Implantés dans le foie après injection dans la veine porte, les îlots permettent chez ces patients la normalisation de la glycémie à jeun et de l'hémoglobine glycosylée (HbA1c) jusqu'à 7 ans après la greffe[41]. Bien qu'elle soit légèrement diminuée, la stimulation de la sécrétion d'insuline et de C peptide par le glucose ou l'arginine est conservée[42]. La tolérance au glucose lors d'une épreuve de stimulation orale est pratiquement normale[41].

Malgré plusieurs centaines de tentatives, la difficulté de l'isolement des îlots de Langerhans à partir des pancréas de cadavres a longtemps freiné le développement clinique de la greffe d'îlots allogéniques[43]. Grâce à l'amélioration de la technique d'isolement des îlots humains[44], les premiers succès de l'allogreffe d'îlots chez des patients pancréatectomisés[45] puis chez un patient diabétique de type 1[46] ont été décrits en 1990. Depuis cette date, une quinzaine de malades diabétiques de type 1 dans quelques centres d'Amérique du Nord[47-50] et d'Europe [51,52] ont également pu interrompre leur insulinothérapie après une allogreffe intraportale d'îlots. Bien qu'ils n'aient été obtenus que chez un petit nombre de patients et qu'ils furent souvent transitoires, ces résultats très encourageants confirment que la greffe d'îlots pourrait devenir prochainement une méthode de choix pour le traitement curatif du diabète insulinodépendant[43,53].

Comme toute transplantation allogénique, la greffe d'îlots s'accompagne d'une réaction de rejet immunitaire et il est également probable qu'elle déclenche chez les patients diabétiques une deuxième réaction, auto-immune et spécifique des cellules  $\beta$ . La greffe d'îlots nécessite donc l'utilisation d'un traitement immunosuppresseur à l'aide d'agents classiques comme la ciclosporine, les corticoïdes, l'azathioprine et les immunoglobulines anti-lymphocytaires ou plus récents comme le tacrolimus[45] ou la 15-déoxyspergualine[50]. L'importance des effets secondaires de ces agents immunosuppresseurs limite, pour l'instant, les indications de la greffe d'îlots. Néanmoins, chez les diabétiques immunosupprimés ayant déjà bénéficié d'une greffe de rein, la greffe d'îlots devrait vraisemblablement se substituer prochainement à la greffe de pancréas en raison de sa très faible morbidité.

D'autre part, comme les autres techniques de transplantations cellulaires[54-56], la greffe d'îlots offre d'importantes perspectives de développement[43]. En particulier, de nombreux travaux expérimentaux laissent entrevoir de nouvelles possibilités de lutte contre la réaction immunitaire en évitant les effets secondaires liés à l'immunosuppression. L'immunomodulation des îlots par la culture[57,58], l'exposition aux rayons ultra-violets[59] ou l'incubation avec des anticorps monoclonaux dirigés contre les molécules du CMH[60,61], permet la réduction de leur antigénicité avant la transplantation. L'induction d'un état de tolérance spécifique chez le receveur par l'implantation intra-thymique des îlots[62] ou par l'injection préalablement à la greffe des îlots, de cellules[63] ou d'antigènes solubles[64] du donneur dans le thymus après une déplétion lymphocytaire transitoire permet d'éviter le traitement immunosuppresseur. Enfin, l'immuno-protection physique des îlots par une membrane semi-perméable au sein d'un pancréas bioartificiel[65,66] permet de les isoler physiquement pour les protéger du système immunitaire tout en conservant leur fonction métabolique. Si ces progrès de la lutte contre le rejet immunitaire se confirment chez l'homme, la greffe d'îlots pourrait devenir un traitement de choix pour le diabète de type 1.

Actuellement, un des principaux freins pour le développement clinique de la greffe d'îlots est la faible quantité de tissu disponible pour la transplantation. En effet, la masse des cellules implantées apparaît comme le facteur critique du succès d'une greffe d'îlots. Chez l'homme, la quantité minimale nécessaire de tissu endocrine pour prévenir le diabète après une pancréatectomie est d'environ 3000 îlots par kg de poids[41]. Pour obtenir la guérison c'est à dire l'insulino-indépendance chez un diabétique de type 1, il est nécessaire de transplanter au minimum 6000 îlots par kg[67] et probablement plus de 10 000 îlots par kg[43] soit généralement

plus de 500 000 îlots. Avec les techniques actuelles d'isolement des îlots humains, il est donc souvent indispensable de réunir les îlots de plusieurs donneurs pour pouvoir proposer une greffe d'îlots à un patient diabétique. Bien que le nombre des diabétiques insuffisants rénaux bénéficiant d'une greffe de rein soit relativement limité, le nombre de pancréas humains disponibles serait à peine suffisant pour greffer des îlots à l'ensemble de ces receveurs potentiels. Avec les progrès probables des techniques de prévention de la réaction immunitaire, le nombre de patients susceptibles de bénéficier d'une greffe d'îlots pourrait être considérablement étendu. Le développement de sources alternatives aux pancréas de cadavres serait alors indispensable.

#### 6. Conclusion

En conclusion, la greffe d'îlots apparaît susceptible de connaître un large développement pour le traitement des diabétiques dans les années à venir. Parmi les progrès restant à accomplir pour étendre les indications cliniques de cette technique, l'optimisation de la source de tissu endocrine disponible pour la transplantation sera vraisemblablement un des facteurs déterminants.

Trois voies principales semblent pouvoir se développer :

- l'isolement et la conservation des îlots humains dont l'amélioration permettrait de développer à court terme la greffe d'îlots chez les diabétiques immunosupprimés.
- L'utilisation d'îlots d'origine animale (xénogreffe) qui constituerait une source inépuisable de tissu endocrine si le développement des techniques d'immunoprotection se confirme.
- La néoformation et la production *in vitro* de cellules humaines sécrétrices d'insuline qui constituerait une source idéale de tissu endocrine pour le traitement des diabétiques de type 1.

Première partie :

## ISOLEMENT ET CULTURE DES ILOTS HUMAINS

#### I. INTRODUCTION

#### I.1. Anatomie et physiologie du pancréas endocrine humain

#### I.1.1. Anatomie

Le pancréas est situé dans la partie postérieure de la cavité abdominale, devant le rachis, entre le cadre duodénal et la rate[68]. Il pèse environ 90g chez l'homme et 75g chez la femme. Il est divisé en 4 parties, la tête et le petit pancréas de Winslow au contact du duodénum, l'isthme, le corps et la queue qui se prolonge jusqu'au hile de la rate. Chez l'homme, comme chez les autres mammifères, le pancréas est constitué de trois contingents tissulaires, exocrine, endocrine et canalaire, distincts tant sur le plan morphologique que sur le plan fonctionnel. Le pancréas exocrine constitue plus de 95 % du tissu pancréatique. Il est organisé sous la forme de lobules ou acini. Ce tissu acineux synthétise et sécrète les enzymes digestives comme l'amylase ou la lipase. Le tissu acineux est organisé autour d'un arbre canalaire qui achemine les sécrétions jusqu'au duodénum. Ces canaux pancréatiques comprennent successivement les canaux intercalés ou centro-acineux, les canaux intralobulaires, et les canaux interlobulaires qui convergent dans le canal principal ou canal de Wirsung qui débouche avec le canal cholédoque dans la lumière duodénale. Il persiste parfois à l'âge adulte un canal accessoire ou canal de Santorini qui débouche directement dans le deuxième duodénum. Ces canaux pancréatiques ont également une fonction sécrétrice importante (bicarbonate et mucine). Le tissu endocrine est réparti en amas cellulaires ou îlots disséminés au sein du tissu exocrine, d'un bout à l'autre du pancréas. La raison d'être de cette répartition unique du tissu endocrine chez les mammifères au contraire de certaines espèces plus primitives reste une énigme depuis sa découverte. C'est Laguesse à Lille qui fût le premier à suspecter le rôle fonctionnel primordial de ces îlots pancréatiques[69]. Il les dénomma "îlots de Langerhans" en référence à Paul Langerhans, étudiant en médecine allemand qui observa quelques années plus tôt ces amas cellulaires au sein du tissu pancréatique. Les îlots endocrines constituent 2% du volume total du pancréas, cependant ils reçoivent 20% du débit

sanguin de cet organe[70]. Leur nombre est hautement variable d'un individu à l'autre ; il est compris entre  $2x10^5$  et  $2,3x10^6$ [71]. Leur taille varie de 15 à 500 µm[72]. Les îlots de Langerhans sont composés en movenne de 2500 cellules avec des extrêmes de quelques-unes à plus de 12 000 cellules[73]. Ils sont composés de 4 populations cellulaires différentes. Les cellules  $\beta$  qui sécrètent l'insuline sont situées plutôt au centre de l'îlots et représentent 80% des cellules. Les cellules  $\alpha$  se trouvent à la périphérie des îlots et sécrètent le glucagon. Les cellules  $\delta$ (5%), qui sécrètent la somatostatine, et les cellules PP, qui sécrètent le polypeptide pancréatique, sont en faible nombre et sont dispersées au sein de l'îlot. Les influences paracrines réciproques de ces 4 types cellulaires sont essentielles pour la fonction physiologique des îlots[74,75]. La distribution des îlots dans le tissu pancréatique et la proportion des différents types cellulaires ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  et PP) qui les composent, varient avec les régions anatomiques du pancréas. Les îlots sont plus nombreux dans la queue du pancréas que dans la tête. Les cellules PP sont plus nombreuses à la périphérie des îlots dans la tête du pancréas [76]. Les îlots humains ne sont pas séparés physiquement, c'est-à-dire par une capsule, du tissu exocrine auquel ils sont intimement liés. Les effets réciproques entre le tissu exocrine et les îlots ne sont que partiellement connus[77]. Toutefois, de nombreux résultats expérimentaux et cliniques convergent aujourd'hui pour affirmer les relations étroites qui unissent les contingents endocrines et exocrines du pancréas[78].

#### I.1.2. Physiologie

Seules les cellules  $\beta$  expriment le gène de l'insuline qui est situé sur le chromosome 11[79]. Le précurseur de la biosynthèse de l'insuline est la pré-pro-insuline qui se forme dans le réticulum endoplasmique des cellules  $\beta$  rugueux puis est rapidement transférée sous forme de pro-insuline dans l'appareil de Golgi. La pro-insuline est ensuite concentrée dans des granules immatures dérivant des saccules golgiens dans lesquelles elle est clivée en deux peptides, l'insuline et le connnecting peptide ou C-peptide. L'insuline est alors concentrée et cristallisée grâce à l'action du zinc sous formes de polymères[80]. En l'absence de glucose, l'insuline est relarguée de façon continue à la surface de la cellules  $\beta$  par exocytose avec le contenu des granules (C-peptide en quantités équimolaires avec la pro-insuline et l'amyline). La sécrétion active de l'insuline est

déclenchée par l'augmentation du glucose intracellulaire[81]. Le glucose transporté dans la cellule par un transporteur membranaire spécifique, le GLUT2, inhibe les canaux potassiques et entraîne une dépolarisation cellulaire qui elle-même active les canaux calciques. C'est l'augmentation du calcium intracellulaire qui déclenche la sécrétion active de l'insuline. La sécrétion peut également être déclenchée *in vitro* par des acides aminés comme l'arginine ou d'autres agents qui augmentent l'AMPc intracellulaire comme la théophylline ou l'IBMX. La sécrétion de l'insuline est un phénomène rapide, phasique, pulsatile et conservateur. La libération d'insuline est détectable moins d'une minute après l'augmentation de la concentration du glucose et inhibée 2 minutes après sa diminution. Lors d'une stimulation soutenue par le glucose, la sécrétion d'insuline s'effectue de façon pulsatile avec des cycles d'une période de 1 minute environ, selon trois phases successives 1188}: une phase précoce qui dure quelques minutes suivie d'une phase plus lente de sécrétion active et très lentement décroissante pendant plusieurs heures et enfin une dernière phase de désensibilisation au glucose où la sécrétion bien que toujours pulsatile apparaît réduite. Au cours de la sécrétion active, les cellules  $\beta$  ne libèrent qu'une faible quantité de l'insuline disponible dans les granules cytoplasmiques.

#### I.2. L'Isolement des îlots Humains

#### I.2.1. Etudes préliminaires chez le rongeur

Les techniques décrites pour l'isolement des îlots humains dérivent directement d'études menées d'abord chez le rongeur. C'est Bensley qui en 1911 est, pour la première fois, parvenu à isoler quelques îlots de Langerhans du tissu pancréatique après injection préalable de colorant[82]. Les premiers isolements d'îlots reproductibles ont été réalisés avec une technique de microdissection[83]. Bien qu'elle ait permis l'étude expérimentale spécifique des îlots cette technique apparaissait relativement traumatique et quantitativement très limitée. En 1965, Moskalewski a décrit chez le cobaye un principe nouveau pour l'isolement des îlots, la digestion enzymatique par la collagénase du tissu pancréatique[84], qui reste à la base de toutes les techniques d'isolement décrites ultérieurement. Le rendement quantitatif de la méthode et la

qualité des îlots obtenus ont augmenté significativement quand cette technique de digestion par la collagénase a été associée à la distension première et in situ du pancréas par l'injection dans le canal de Wirsung d'une solution saline réfrigérée avant sa dispersion mécanique et son incubation avec la solution de collagénase[85]. Initialement, les îlots isolés étaient séparés manuellement du tissu exocrine, à l'aide d'un loupe binoculaire mais l'utilisation de la séparation par centrifugation d'abord dans le sucrose [85] puis le Ficoll[86] a permis de faciliter encore l'isolement des îlots de rongeurs. Cette technique de digestion du pancréas par la collagénase suivie de la purification par gradient de densité permet d'obtenir de façon reproductible de 500 à 1000 îlots de Langerhans par rat. Aujourd'hui, elle est devenue la technique de référence pour la préparation des îlots de rat dans la plupart des laboratoires.

#### I.2.2. Isolement des îlots humains

La première description de l'isolement d'îlots humains remonte à 1971[87] à l'aide d'une technique identique à celle décrite chez le rongeur. Le pancréas, distendu avec une solution saline réfrigérée, était découpé en morceaux puis incubé à 39°C avec une solution de collagénase. Les îlots étaient ensuite purifiés manuellement du tissu exocrine. Avec une technique similaire en 1976, Lacy est à nouveau parvenu à isoler les îlots des pancréas humains, cependant cette technique s'avérait très décevante chez l'homme en raison de la nature fibreuse du tissu pancréatique des gros mammifères [88]. L'injection artérielle de la solution saline s'est révélée délétère pour les îlots et la distension du pancréas par voie veineuse ne permettait qu'une minime amélioration des résultats[89]. De plus, le traumatisme tissulaire au cours de la phase de dispersion était sévère : la quantité de tissu contenant de l'insuline était diminuée de 50% après la phase de distension et de près de 90% à l'issue de l'incubation avec la collagénase après dispersion mécanique[90]. Le rendement prévisible du recueil des îlots humains par cette technique ne pouvait dépasser 10% des îlots initialement présents dans le pancréas. En fait, c'est le principe de la distension première du pancréas avant la digestion enzymatique qui devait se révéler quelques années plus tard comme l'erreur fondamentale ayant longtemps freiné l'amélioration des résultats de l'isolement chez les gros animaux.

Un nouveau principe fut décrit par Horaguchi en 1981 chez le chien[90] et appliqué chez l'homme par Gray en 1984[91] : la distension du pancréas par l'injection d'une solution de collagénase à 39°C dans le canal de Wirsung. Après une étape de digestion stationnaire à 37°C, le pancréas digéré était sectionné, dissocié à l'aide de pinces puis trituré par aspirations successives au travers d'aiguilles, avant d'être filtré à plusieurs reprises. Après purification par centrifugation sur gradient de Ficoll, cette technique permettait de recueillir en moyenne 44 000 îlots par pancréas avec une pureté de 10 à 40%. Cette technique a ensuite été modifiée et adaptée chez le porc[92] puis chez le singe chez lequel la qualité des îlots isolés a été confirmée par la normalisation de la glycémie après pancréatectomie et autotransplantation[93]. Les îlots humains obtenus avec une technique similaire ont également permis quelques essais cliniques de transplantation chez des diabétiques de type 1 ; une fonction partielle et transitoire des îlots a pu être démontrée mais sans permettre l'interruption de l'insulinothérapie[94]. Lorsque la digestion enzymatique du pancréas était suivie d'une séparation mécanique du tissu exocrine par le velcro [95] le rendement obtenu avec cette technique atteignait 80 000 îlots par pancréas.

Pour faciliter la phase de dispersion du tissu pancréatique digéré, Scharp a développé en 1985 une technique de dissociation mécanisée à l'aide d'un broyeur de tissu[96]. Après séparation du tissu endocrine par élutriation, il a obtenu avec cette méthode environ 150 à 200 000 îlots par pancréas et une pureté de 20 à 30 %. La fonction au moins partielle des îlots isolés a pu être confirmée par la transplantation intra-splénique chez six patients diabétiques et la détection d'une sécrétion de peptide C.

Warnock en 1986 adapta au pancréas humain la technique de distension par perfusion continue avec la collagénase qui avait permis d'améliorer l'isolement chez le chien[97]. La solution de collagénase, chauffée à 39°C était perfusée à l'aide d'une pompe péristaltique dans le canal de Wirsung pendant toute la phase de digestion. Comparée à l'injection simple de la collagénase, cette technique de perfusion continue facilitait la dissociation mécanique secondaire du pancréas et contribuait à limiter la fragmentation des îlots tout en diminuant la concentration nécessaire de la solution de collagénase Elle a permis d'augmenter le rendement de l'isolement d'un facteur 1,5 à 2 et d'isoler en moyenne 161 000 îlots par pancréas pour obtenir après purification par centrifugation dans le Ficoll 82 000 îlots avec une pureté de 20 à 40%[98]. Ce principe de la perfusion intra-canalaire continue de la collagénase a également été utilisé pour l'application clinique[99].

Malgré ces améliorations successives, la difficulté de l'isolement des îlots humains a longtemps freiné le développement clinique de la greffe d'îlots. L'action de la collagénase injectée dans le canal de Wirsung permet la dissociation du tissu exocrine et la libération des îlots par destruction du réseau collagène du tissu pancréatique. Cependant l'étape de dispersion du tissu pancréatique par macération, trituration ou simple filtrage du tissu était responsable d'une importante souffrance tissulaire. Ce stress mécanique aboutissant à la fragmentation des îlots s'est révélé particulièrement délétère tant pour le rendement quantitatif de l'isolement que pour la viabilité et la fonction des îlots obtenus. L'action de la collagénase sur le tissu pancréatique n'est pas homogène et la dissociation des îlots est progressive et continue ; alors que les premiers îlots libérés commencent déjà à se fragmenter, d'autres sont encore intimement liés au tissu exocrine. Idéalement, la technique d'isolement devrait prendre en compte ce caractère progressif de la digestion et permettre la digestion de la totalité de la glande tout en assurant la soustraction des îlots de l'action de la collagénase au fur et à mesure de leur libération. Elle devrait également permettre d'adapter les caractéristiques de la digestion en fonction des caractéristiques de chaque pancréas humain.

#### I.2.3. Méthode de digestion automatisée

Tentant de résoudre ces difficultés, Ricordi et l'équipe de Saint-Louis ont développé et décrit en 1988 une nouvelle technique d'isolement des îlots, baptisée "automated method", utilisant une chambre de digestion placée sur un circuit fermé permettant de limiter le traumatisme mécanique et l'exposition excessive des îlots à la collagénase. Cette technique a permis l'isolement de 275 000 îlots par pancréas et l'obtention après purification par centrifugation en gradient de Ficoll de 160 000 îlots par pancréas avec une pureté de 79%[44]. L'amélioration des résultats quantitatifs et qualitatifs de l'isolement des îlots humains obtenus avec la méthode de Ricordi devait déboucher deux ans plus tard sur la description des premiers succès cliniques d'allogreffe

d'îlots[45,46]. Malgré quelques tentatives de simplification[100] et en raison de sa bonne reproductibilité, cette technique d'isolement automatisée s'est rapidement imposée dans le monde comme la technique de référence et a contribué de façon importante au développement clinique de la greffe d'îlots[45,47,49,51,101-104]. La maîtrise de cette technique de l'isolement des îlots humains apparaît aujourd'hui comme le préalable essentiel de toute application clinique.

#### I.3. Purification des îlots

Après la digestion enzymatique et la dispersion mécanique, le tissu pancréatique occupe après centrifugation un volume variant de 30 à plus de 60 ml. En plus des îlots de Langerhans qui n'en représentent qu'une faible proportion (environ 2%), ce digestat est constitué d'un petit contingent de débris canalaires et vasculaires et surtout de tissu acineux. Afin d'éviter la perte d'une partie importante des îlots qui accompagne inévitablement la purification, on peut envisager la transplantation de cette préparation "brute" sans autre manipulation préalable. Les résultats obtenus après pancréatectomie totale et autotransplantation chez l'animal[105] et chez l'homme[41] voire après allotransplantation chez le diabétique de type 1[50] ont montré qu'on pouvait greffer avec succès des malades avec les îlots non purifiés d'un seul pancréas. Cependant, la transplantation simultanée avec les îlots d'une importante quantité de tissu exocrine inutile sur le plan fonctionnel peut être à l'origine de complications mécaniques préoccupantes[41,103,106,107]. La contamination des préparations d'îlots avec des fragments exocrines et très probablement des leucocytes passagers semblent également augmenter l'immunogénicité du greffon[108] et diminuer leur implantation au niveau du site receveur[109]. La purification est aujourd'hui considérée par la plupart des équipes comme indispensable pour envisager leur utilisation clinique[110].

Les premières tentatives de purification des îlots, à l'issue de la digestion du tissu pancréatique humain, ont été effectuées par recueil manuel sous une loupe binoculaire ou "hand-picking"[87]. Cette technique très efficace chez le rongeur permet également d'obtenir d'excellents résultats pour la préparation d'îlots humains à des fins expérimentales[111]. Chez l'homme, comme chez

les grands mammifères, elle se révèle cependant particulièrement laborieuse et d'un très faible rendement. Bien qu'elle ait déjà été utilisée[112] la purification manuelle des îlots ne semble pas compatible avec l'application clinique de la greffe d'îlots. L'effort a donc porté sur le développement de techniques permettant la purification de masse des préparations de tissu pancréatique digéré. Des techniques simples comme la sédimentation[113] et la séparation mécanique du tissu fibreux par le Velcro[95] ou la filtration [91] permettent une purification grossière des préparations. De nombreuses techniques de purification comme l'élutriation[114], la cytofluorométrie de flux[115], la séparation magnétique[116] ont été décrites pour en améliorer les résultats. Chez l'homme, la technique ayant permis d'obtenir les meilleurs résultats est la séparation isopycnique par centrifugation en gradient de densité mise au point chez le rongeur[39,85]. Cette technique repose sur la différence de densité qui sépare les îlots endocrines du tissu exocrine pancréatique particulièrement riche en granules de sécrétion[117]. Malgré l'amélioration de ces techniques, la purification des préparations implique encore une perte considérable de la masse de tissu endocrine et ses résultats sont très inconstants d'un pancréas à l'autre[110].

#### I.4. Conservation des îlots

Il est actuellement exceptionnellement possible de pouvoir guérir un diabétique avec les îlots isolés à partir d'un seul pancréas[50,51]. Le plus souvent, les îlots provenant de plusieurs pancréas doivent être réunis et transplantés chez un même patient[67]. En raison de la nature imprévisible des prélèvements d'organes, les îlots doivent donc fréquemment être conservés au moins quelques jours voire plusieurs semaines[118].

#### I.4.1. Cryopréservation

La cryopréservation des îlots qui permet la conservation illimitée des îlots serait une solution théorique idéale[119]. La constitution de banques de tissu autoriserait l'échange entre les centres et l'appariement immunologique des donneurs avec les receveurs. Sa réalisation pratique soulève

cependant de nombreuses difficultés. La cryopréservation des îlots humains entraîne inexorablement une diminution de leur nombre et de leur fonction[99,120]. Inévitablement précédée d'une courte période de culture, elle entraîne la perte de 30 à 50 % de la masse des îlots initialement isolée[121]. *In vivo*, après transplantation intrahépatique, la fonction des îlots humains cryopréservés est inférieure à celle des îlots frais (Davalli, communication personnelle, 1994). Si la greffe simultanée d'îlots cryopreservés permet d'augmenter la masse de tissu endocrine transplantée, l'utilisation d'îlots fraichement isolés a toujours été nécessaire pour obtenir la correction du diabète[67].

#### I.4.2. Conservation hypothermique

La conservation hypothermique des îlots à 4°C est possible mais elle est très limitée dans le temps. Elle ne dépasse pas quelques heures dans une solution saline physiologique et peut être prolongée au maximum jusqu'à 48 heures avec les solutions de types intracellulaires développées pour la conservation d'organes comme la solution de l'Université du Wisconsin (UW)[122].

#### I.4.3. Culture des îlots

Le dernière méthode qui permet de conserver les îlots après l'isolement quelques heures en attendant la greffe voire de quelques jours à quelques semaines pour réunir les îlots de plusieurs donneurs est la culture cellulaire. Elle a été nécessaire dans la majorité des études cliniques de greffe d'îlots[47,51,102,104] et permet l'évaluation fonctionnelle et infectieuse des préparations. De plus, la culture des îlots diminue leur antigénicité et facilite leur transplantation[57,123,124]. De nombreuses techniques permettant l'immunomodulation des îlots avant leur transplantation en réduisant la présence des leucocytes passagers et l'expression des molécules du CMH ont également été décrites et leur application clinique imposera la maîtrise des techniques de culture des îlots adultes humains a été décrite pour la première fois en 1976 avec les techniques classiques de culture sur support plastique[125]. La culture en suspension dans des milieux additionnés de sérum[126] a permis de prolonger la survie des îlots humains pendant plusieurs mois[127]. Parmi les milieux de culture existants, le plus performant est le CMRL 1066[43]. Cependant, ce milieu n'empêche pas la réduction rapide de la sécrétion

d'insuline et de la réponse des cellules  $\beta$  à une augmentation de la concentration de glucose[58]. D'autre part, l'utilisation dans le milieu de culture de sérum d'origine souvent animale et de composition peu contrôlée apparaît difficile pour l'application clinique. Il est donc souhaitable de développer des techniques de cultures reproductibles, utilisant des milieux définis et permettant de minimiser la perte de la fonction et de la masse du tissu endocrine au cours de sa conservation.

#### I.5. Objectif de l'étude

La greffe d'îlots allogéniques de Langerhans permet le traitement du diabète de type 1 chez des patients immunosupprimés et pourrait se subsistuer dans les années à venir à la greffe de pancréas vascularisée. Cependant la difficulté de l'isolement des îlots humains limite encore son application clinique. L'objectif de cette étude était le développement et l'amélioration des techniques d'isolement et de culture des îlots de Langerhans humains afin d'obtenir des résultats compatibles avec les impératifs de l'application clinique.

#### **II. MATERIEL ET METHODES**

#### II.1. Prélèvement du pancréas

Les pancréas humains ont été prélevés chez des sujets en état de mort cérébrale au cours de prélèvements multi-organes organisés par l'Etablissement Français des Greffes dans les conditions prévues par la loi relative au don et à l'utilisation des éléments et produits du corps humains et après avis favorable du Comité d'Ethique du CHRU de Lille. Les pancréas étaient prélevés après perfusion aortique in situ d'Eurocollins ou de solution de conservation de l'Université du Wisconsin ou UW (Viaspan, Dupont, Pays-Bas). Lorsque le foie était prélevé simultanément, le flux porte était décomprimé en aval du pancréas. Lorsque le prélèvement hépatique emportait la tête du pancréas en raison de la suspicion d'une artère hépatique droite, seule l'isthme et la queue du pancréas ont été utilisés. *Ex vivo*, le pancréas était disséqué stérilement à 4°C et libéré de toute adénopathie du tissu adipeux et des vaisseaux en évitant toute effraction de la capsule. Quand le pancréas entier était utilisé, il était sectionné au niveau de l'isthme. Un cathéter était mis en place et fixé dans le canal de Wirsung facilement repéré au niveau de chaque tranche de section. Au niveau de la tête, les extrémités du canal de Wirsung et du canal de Santorini, quand il était présent, étaient repérées et liées.

Dans certains cas (n=13), immédiatement après le prélèvement, 150 ml de solution UW à 4  $^{\circ}$  contenant de collagénase (1,5 mg/ml, Boehringer Mannheim Type P) et DNase(250 U/ml) étaient injectés dans le canal de Wirsung pour distendre le pancréas préalablement à la conservation. Les pancréas étaient ensuite conservé à 4  $^{\circ}$ C jusqu'à l'isolement dans l'Eurocollins ou dans la

solution de conservation UW lorsque le temps prévisible de conservation était supérieur à 3 h et acheminés au laboratoire.
## II.2. Dissection et distension du pancréas

L'ensemble de l'isolement était effectué sous hotte à flux laminaire vertical. Après pesage, le pancréas était distendu avec 300 ml d'une solution stérile de Hanks contenant de la collagénase (Boehringer Mannheim Type P), du CaCl<sub>2</sub> (3,7 mMol), et de la DNAse (250U/ml) préchauffée à  $32^{\circ}$ C. La concentration de collagénase utilisée a varié de 2,5 à 4 mg/ml en fonction du lot. Pendant ces expériences, 3 lots différents de collagénase ont été utilisés (une collagénase provenant d'un 4ème lot a été utilisée pour un seul isolement). La qualité de la distension est déterminante pour les résultats de la digestion et la collagénase est injectée au début avec douceur afin d'éviter la rupture précoce des petites branches canalaires terminales puis avec une pression croissante pour distendre l'ensemble de la glande. Les éventuelles fuites capsulaires sont occluses à l'aide de pinces hémostatiques (figure 1). Le pancréas est coupé en deux et mis dans la chambre de digestion chauffée de 38 à 39°C.

# II.3. Digestion enzymatique automatisée

Un schéma du dispositif utilisé pour la digestion automatisée du pancréas est présenté dans la figure 2. La chambre de digestion est en inox et son volume intérieur (400 ml) peut être adapté (300 ml). à l'aide d'un cylindre amovible. Une sonde thermocouple dont l'extrémité est située à l'intérieur de la chambre permet d'en mesurer la température interne. La chambre est fixée sur un agitateur (course d'une hauteur de 10 cm, 45 oscillations par minute) et contient des billes de verre afin de potentialiser l'action mécanique de l'agitation. Un filtre dont les pores ont une taille de 280µ est placé à la sortie de la chambre. La chambre de digestion est connectée à un circuit fermé de tubulures de silicone qui comprend une ampoule à décantation dans laquelle le tissu digéré peut sédimenter, un échangeur thermique en inox plongé dans un bain marie à 50°C, afin de maintenir la température interne de la chambre à 37°C et à une pompe péristaltique qui assure la circulation continue de la solution de collagénase. Le circuit est préalablement rempli avec une solution de Hanks contenant du sérum de veau nouveau-né(SNN) à 2% pour éviter l'adhésion

des cellules sur les parois du circuit, et réchauffé jusqu'à 39°C. Le pancréas distendu est sectionné en 2 parties et placé dans la chambre de digestion, ouverte après vidange du circuit. Le circuit est à nouveau rempli avec la solution de collagénase utilisée pour la distension du pancréas et une solution de Hanks à 2% de SNN (concentration finale de SNN d'environ 1%). Lorsque le circuit est rempli, la solution est perfusée en continu à un débit de 60 ml par minute à l'aide d'une pompe péristaltique. La température de la chambre généralement descendue à 34°C remonte doucement de 1°C par minute. L'agitation de la chambre (15 secondes chaque minute) commence dès que la température arrive à 37°C. La température de la chambre est maintenue à 37°C pendant toute la digestion. L'état de la digestion est évalué sur un échantillon de 1 ml prélevé toutes les 2 minutes en aval de la chambre sur le circuit et coloré par quelques gouttes d'une solution de dithizone (50 mg dissous dans 5 ml de diméthyl sulfoxyde et resuspendu dans 100 ml de solution de Hanks contenant 2% de SNN). Les îlots colorés en rouge par la Dithizone sont aisément identifiables en microscopie inversée[128].

Lorsque la digestion est estimée satisfaisante (plus de 20 îlots libres dans 3 prélèvements successifs}, le pancréas digéré est récolté en perfusant le circuit maintenant ouvert, par une solution froide de Hanks contenant 10% de SNN (débit de 300 ml/min). Le digestat, est recueilli dans des tubes contenant 100 ml d'une solution de Hanks à 20% SNN pour refroidir rapidement la solution et inactiver la collagénase. Pendant la phase de recueil, la chambre de digestion est agitée 15 secondes par minute. La perfusion de 5 à 7 litres de solution de Hanks à 10% de SNN est généralement nécessaire pour vider totalement la chambre du tissu pancréatique digéré. La chambre est alors ouverte et le tissu restant (Planche 1C) est pesé et soustrait du poids de tissu mis dans la boîte au début afin d'avoir le poids de pancréas digéré.

# **II.4.** Purification

### II.4.1. Gradient

Les préparations ont été purifiées par séparation isopycnique par centrifugation dans un gradient discontinu d'Euro-Ficoll à l'aide d'un séparateur de cellules (COBE 2991, Lakewood, USA). Les gradients d'Euro-Ficoll étaient fabriqués selon la technique de Olack[129] à partir d'une solution mère de Ficoll d'une densité de 1,125 (Ficoll 400DL, Sigma, France) diluée avec une solution d'Eurocollins pour obtenir les densités désirées. Du sérum de veau foetal était ajouté pour obtenir une concentration finale de 2%. Pour chaque solution, la densité à 8°C était vérifiée à l'aide d'un densitomètre (DMA 35, Paar, Autriche).

# II.4.2. Test de purification

Afin d'évaluer la densité des tissus exocrine et endocrine et de déterminer les couches de gradient optimales pour chaque pancréas, un test était réalisé sur un échantillon de la préparation avant de procéder à la purification. Deux ml du digestat, resuspendu dans la solution UW, étaient mélangés à 1 ml de dithizone puis centrifugés (150g, 1 min). Le culot était resuspendu dans 4 ml d'Euro-Ficoll de densité 1.108 g/cm<sup>3</sup> et transféré dans une tube de 15 ml. Un ml d'Euro-Ficoll de densité 1.1038, 1.097, 1.091, 1.081, 1.069, 1.051, puis de Hanks étaient successivement déposés. Après centrifugation à 4°C (800G, 15 min), la présence des îlots colorés en rouge par la dithizone est facilement détectée visuellement et chaque interface peut être pipetée et diluée dans le Hanks pour évaluation précise de leur composition à l'aide du microscope inversé (Planche 2).

## II.4.3. Séparateur de cellules

Le digestat est suspendu dans 200 ml d'Euro-Ficoll de densité 1.104 g/cm<sup>3</sup> dans une poche de plastique stérile (600 ml, Fenwal Baxter, France) à 4°C puis est écoulé par gravité dans le sac du séparateur de cellules (COBE, Lakewood, USA). Lorsque le pancréas entier était utilisé, deux cycles de centrifugation étaient nécessaires car 20 ml de culot au maximum peuvent être chargés dans le sac. Le sac était alors centrifugé à 2550 tours/min, et l'air résiduel évacué. Sans interrompre la centrifugation, 150 ml de la deuxième couche d'Euro-Ficoll ou couche de

séparation puis 150 ml de la troisième couche ou couche supérieure puis 75 ml de solution de Hanks étaient injectés dans le sac à l'aide d'une pompe péristaltique. Les résultats du test permettent de choisir les densités de la couche de séparation, et de la couche supérieure à l'interface desquelles les îlots sont récupérés en fonction des impératifs de rendement ou de pureté souhaités pour la purification. Après 7 minutes de centrifugation à 2550 tours/min., les couches étaient successivement évacuées du sac par expansion du coussin du séparateur de cellules et les interfaces étaient récupérées séparément. Un échantillon permet de contrôler la présence des îlots entre la couche de séparation et la couche supérieure. Parfois des îlots moins purifiés se trouve également dans l'interface entre la couche inférieure et la couche de séparation qui est alors également recueillie. Les îlots en suspension dans l'Euro-Ficoll sont dilués (5:1) dans la solution de Hanks dans des tubes coniques de 250 ml. Après une première centrifugation (300 g, 4 min.), ils sont resuspendus dans le Hanks et centrifugés une deuxième fois (150 g, 4 min.), puis transférés dans des tubes de 50 ml centrifugés une troisième fois et suspendus dans du milieu de culture (RPMI 1640, 1g/l de glucose, sans sérum), centrifugés une quatrième fois et finalement resuspendus dans du milieu de culture (CMRL 1066, Sigma, France) contenant 10% de sérum de veau foetal, l'hydroxycortisone (0,01mM), le pyruvate (0,9mM), le nicotinamide (10mM) et des antibiotiques[130].

Trois échantillons de 25 µl étaient prélevés dans la préparation finale pour la numération des îlots. Lorsque deux couches ont été recueillies séparément, la numération était réalisée pour chacune d'entre elles. La pureté était estimée visuellement et exprimée en pourcentage d'îlots.

### II.5. Evaluation des îlots

L'évaluation des préparations d'îlots obtenues après l'isolement et la purification est indispensable avant d'envisager leur utilisation clinique[131]. Pour faciliter la comparaison des résultats des différents laboratoires, une méthodologie standardisée a été définie pour l'évaluation de l'isolement des îlots humains[132-134]. Elle comprend des critères objectifs quantitatifs (numération et appréciation du volume des îlots) et qualitatifs (morphologie, fonction des îlots).

# II.5.1. Evaluation quantitative

L'évaluation quantitative des résultats de l'isolement a été estimée à partir du nombre moyen des îlots présents dans trois échantillons prélevés dans la préparation après la digestion (50µl) et après la purification (25 µl). Après coloration de l'échantillon par la dithizone, les îlots dont la taille était supérieure à 50 µm ont été mesurés et comptés à l'aide d'un microscope inversé muni d'un micromètre. Les résultats sont exprimés sous la forme du nombre total et du nombre rapporté au poids du pancréas digéré d'îlots. Afin de rendre compte du volume de tissu endocrine obtenu, les résultats ont également été rapportés sous la forme d'équivalents d'îlots de 150 µm de diamètre ou îlots-équivalents (IE) calculés en affectant à chaque îlot un coefficient proportionnel à sa taille[133] (voir table ci dessous). L'indice d'isolement correspond au nombre d'îlots-équivalents d'îlots.

Diamètre mesuré (µ)	Volume théorique $(10^3 \mu^3)$	Facteur de conversion	
50 à 99	294	0.17	
100 à 149	1 145	0.66	
150 à 199	2 977	1.70	
200 à 249	6 185	3.50	
250 à 299	11 159	6.30	
300 à 349	18 293	10.4	
>350 à 399	27 979	15.8	

Table 1 : Facteur de conversion des îlots en équivalent d'îlots de 150µ de diamètre (IE)

### II.5.2. Morphologie

L'évaluation morphologique a été réalisée par immunohistochimie. Un échantillon de la préparation finale d'îlots était sédimenté, suspendu dans de la colle biologique (voir abstract en annexe) ou dans du collagène de queue de rat, puis après gélification, fixé dans du liquide de

Bouin (Sigma Chimie, France) et inclus dans la paraffine. Pour l'étude en immunohistochimie, des coupes de 5  $\mu$  étaient déparaffinisées avec du xylène et réhydratées. Après saturation des sites non spécifiques par une incubation avec du sérum de chèvre (10%) pendant 15 minutes, les lames étaient incubées pendant 12 heures à 4°C avec un des anticorps suivants : anticorps de lapin anti-glucagon (ICN, France), anticorps de lapin anti-somatostatine (ICN, France) et anticorps de cobaye anti-insuline (Dako, France). La révélation était réalisée à l'aide d'un kit Streptavidine-Phosphatase anti-lapin utilisant le Chromogen PhtaloRed (triaminotriméthylthiphenylméthane, Histo Mark Red, Kirkegaard & Perry Laboratories, KPL Inc. Maryland). Les noyaux étaient colorés par l'hématoxyline (méthode de Carrazzi).

### II.5.3. Viabilité

La viabilité des îlots a été évaluée qualitativement en microscopie inversée à l'issue de la purification par les colorations vitales : exclusion du bleu trypan et coloration par le rouge neutre. Plus récemment, nous avons utilisé un test de viabilité par des colorants fluorescents : coloration par le diacétate de fluorescéine (vert) et exclusion du iodure de propidium (rouge)[120]. Un échantillon de la préparation est lavé dans une solution tampon (PBS, pH 7,4) pour éliminer le rouge phénol. Les îlots, suspendus dans 80  $\mu$ l de solution sont incubés pendant 10 minutes en présence de 10  $\mu$ l de diacétate de fluoresceine (10 $\mu$ g/ml dans l'acétone) et de 10  $\mu$ l de iodure de propidium (500 $\mu$ g/ml en PBS) puis centrifugés sur une lame (750 tours/min., 3 min., cytospin, Shandon Scientific, UK). Les cellules sont examinées à l'aide d'un microscope optique équipé pour la fluorescence. Les cellules viables apparaissent colorées en vert et et les cellules non viables en rouge.

Lors des deux derniers isolements, des îlots humains ont été implantés sous la capsule rénale de souris mâles athymiques (Swiss nu/nu, IFFA CREDO, France) afin d'évaluer la survie *in vivo* des îlots greffés. Deux semaines après la greffe, une néphrectomie était effectuée et une analyse immunohistochimique du rein était réalisée après fixation dans le liquide de Bouin et inclusion en paraffine.

L'évaluation fonctionnelle des préparations a été systématique à partir de l'isolement  $n^{\circ}15$ . La fonction sécrétrice des îlots a été évaluée in vitro à l'aide d'un test de stimulation par le glucose (incubation statique).

Après une nuit de culture, 20 îlots étaient manuellement recueillis sous une loupe binoculaire et placés dans des inserts (porosité de 3,0µ, Gibco BRL, France) dans des boîtes de pétri de 35 mm avec 2 ml de milieu de Kreb's Ringer Bicarbonate (KRB) contenant 0,6 g/l (3,3mM) de glucose. Pour chaque pancréas, trois expériences ont été effectuées et la moyenne des résultats a été prise en compte. Après une période d'équilibration de 40 minutes dans l'incubateur à 37°C, le milieu est changé et les îlots à nouveau placés en incubation. Après 60 minutes, un échantillon du milieu est prélevé pour déterminer la sécrétion basale des cellules. Le milieu est alors retiré des puits qui sont ensuite rincés et à nouveau remplis avec 2 ml de KRB contenant 3,0 (16,7mM) (ou 5,0 = 25mM) g/l. Après 60 minutes, un échantillon est prélevé pour déterminer la sécrétion stimulée des îlots. Les puits sont alors à nouveau vidés, rincés et remplis avec 2 ml de milieu KRB contenant 0,6g/l glucose. Après 60 minutes, un échantillon est prélevé pour contrôler le retour au niveau basal de la sécrétion des cellules. Après l'incubation statique, les îlots étaient remis en culture une nuit pour la mesure de l'insuline totale cellulaire. Le lendemain, après deux lavages dans le Hanks sans sérum, les îlots étaient resuspendus dans de l'eau distillée et soniqués. L'extraction de l'insuline était réalisée par addition d'un tampon d'extraction (0,3% albumine bovine, 155mM NaCl, 1mM acide hydrochlorique) pendant une nuit à 4°C. Après centrifugation, le surnageant était prélevé, et congelé jusqu'au dosage de l'insuline totale. Les dosages d'insuline étaient effectués par le Service de Biochimie Clinique du CHRU de Lille (Service de Médecine Nucleaire, Docteur D'Herbornez) avec des kits SB INSI-5 de CIS biointernational (France) et B-Insuline (ERIA Pasteur, France), après étalonnage avec un test préliminaire sur chaque kit avec les étalons d'insuline humaine.

# II.6. Culture

Rôle du milieu de culture sur le fonctionnement à long terme des îlots humains à  $37^{\circ}$ C La culture des îlots en suspension dans les milieux traditionnels entraînent une perte progressive de la sécrétion d'insuline basale, la dégranulation des cellules  $\beta$  et une diminution du contenu total en insuline ainsi qu'une augmentation de la consommation d'oxygène et de l'oxydation du glucose [135]. Le but de cette étude était de comparer la viabilité, et la **fonc**tion des îlots humains cultivés durant 14 jours de culture à 37°C avec un milieu de culture conventionnel ou dans un milieu défini sans sérum contenant une substitut du sérum (Ultroser G, Gibco BRL, France).

Milieu classique		Milieu défini sans sérum	Milieu défini sans sérum (MSS)		
CMRL 1066*	<u> </u>	CMRL 1066*			
sérum de veau foetal	10%	Ultroser G	2%		
pyruvate	100mg/1	pyruvate	100 mg/l		
		sélénium de sodium	6.7 mg/l		
		éthanolamine	2 mg/l		
		transferrine humaine	5.5 mg/l		

CTT 11	^	$\sim$	• . •	1		1	1.
Ighle		( 'amna	SCITION.	dec.	milielly	de	culture
raute	<i>_</i> .	COMDO	JSIUVII	uus	IIIIICUA	uv.	Culture
		- · ·					

\* CMRL 1066 contenant du glutamate (0,075g/l), de l'hydrocortisone (0,01mM), nicotinamide (10mM)des antibiotiques: streptomycine (100 $\mu$ g/ml), pénicilline (100U/ml), gentamycine (50  $\mu$ g/ml), et un antifungique fungizone (1  $\mu$ g/ml), de l'HEPES (25mM) et du bicarbonate de sodium (2,4 mM). (Gibco BRL, France)

Après l'isolement, les îlots ont été cultivés pendant 3 heures dans du CMRL 1066 contenant 10% SVF dans des boîtes de culture non traitées (Falcon) puis recueillis sous une loupe binoculaire. Ils ont été placés sur des inserts en polycarbonate (porosité 3,0 $\mu$ ,Gibco BRL) dans des plaques à 4 puits (40 îlots d'un diamètre moyen d'environ 150  $\mu$  par puits) avec 1 ml de milieu CMRL 1066 classique avec sérum, ou de milieu défini sans sérum (MSS). Après 1, 3, 7

et 14 (20) jours, la sécrétion dynamique d'insuline, la biosynthèse d'insuline et l'insuline totale contenue dans les îlots ont été évaluées. La sécrétion d'insuline a été étudiée au cours d'épreuves d'incubation statique, (voir technique ci-dessus) réalisées avec 4 puits d'îlots pour chaque milieu.

Pour la biosynthèse de l'insuline (technique de Y. Mullen), à l'issue de l'incubation statique les îlots étaient transférés dans des microtubes et lavés à trois reprises avec de la solution de Hanks. Après addition de 70 µl de milieu de culture MEM sans leucine (ICN, France) contenant 10% de sérum de veau foetal et 50 µCi/ml de L-(4,5-3H) leucine, les îlots étaient cultivés pendant 18 h à 37°C dans une atmosphère à 95% d'air et 5% de CO2. Les îlots étaient alors rincés avec de la solution de Hanks, soniqués pendant 10 sec dans 0,3 ml d'eau distillée et centrifugés pendant 30 minutes (3000g) à 4°C. 70 µl du surnageant étaient prélevés et ajoutés à 70 µl d'un anticorp anti-insuline de porc (ERIA Pasteur, France) dont la capacité totale de liaison est de l'ordre du ng d'insuline, avec 0,5 ml de solution tampon d'immunoprécipitation (CIS biointernational, France) et incubés durant 12 heures à température ambiante. Après centrifugation (3000g, 30 minutes) et élimination du surnageant, le précipité contenant les complexes immuns insuline-anticorps était rincé à deux reprises avec de l'eau distillée puis resuspendu dans 0,5 ml de KOH (0,5M) à 37°C pendant deux heures pour la mesure de la radioactivité. La biosynthèse totale de protéines était estimée par la mesure de la radioactivité dans un échantillon de 70 µl d'homogénat après précipitation par de l'acide trichloroacétique (5%).

L'insuline totale était mesurée avec une technique RIA dans un échantillon de 10 µl de l'homogénat après extraction préalable par 40 µl de tampon d'extraction à 4°C pendant 12 heures (voir ci-dessus). L'ADN était mesuré sur un échantillon de 80 µl de l'homogénat par une technique fluorophotométrique[136]. La viabilité des îlots était évaluée de façon semiquantitative par la fluorescence après coloration avec le diacétate de fluorescéine et l'iodure de propidium.

# **II.7.** Expression des résultats et statistiques

Les résultats sont exprimés sous la forme de la moyenne et leur dispersion sous la forme de l'erreur standard de la moyenne ou d'intervalles de confiance sauf précision contraire. Les comparaisons entre deux groupes ont été effectuées à l'aide d'un test t de Student bilatéral non apparié et les comparaisons entre plus de deux groupes à l'aide d'un test de Fisher après une analyse de type ANOVA. Les calculs ont été réalisés à l'aide d'un logiciel de statistiques[137] sur un micro-ordinateur.

#### **III. RESULTATS**

#### **III.1.** Evaluation quantitative

Les résultats de l'ensemble des isolements d'îlots humains sont résumés dans la Table 3. Entre juin 1993 et juin 1995, 39 isolements d'îlots humains ont été effectués. Les donneurs (17 femmes et 22 hommes) étaient âgés en moyenne de 34,7(2,1) ans avec des extrèmes de 14 ans à 59 ans. La totalité du pancréas n'a pu être prélevée que dans 17 cas et le poids moyen du pancréas utilisé pour l'isolement était de 55,8(3,1) g. La durée moyenne de l'ischémie froide était de 9,3(1) heures et variait de 1 à 32 heures.

Le temps nécessaire pour la digestion du pancréas était en moyenne de 41,7(2,3)minutes et a varié de 22 à 93 minutes. Le rendement moyen après la digestion était de 335 617(30 189) îlots et 231 820(20 724) IE avec des extrêmes de 14 720 îlots (44 896 IE) et de 738 400 îlots (557 453 IE). Après la purification, le rendement moyen était de 228 073(24244) îlots et 132 577(12 272) IE avec des extrêmes de 10 000 îlots (8 000 IE) et de 586 000 îlots (335 500 IE). L'indice d'isolement moyen était de 71(32)%

La table 4 représente la moyenne des résultats quantitatifs des isolements lorsque différents critères ont été spécifiquement considérés. La technique du prélèvement et en particulier l'usage de la solution Eurocollins ou de la solution UW pour la perfusion *in situ* ou flush du pancréas n'a pas modifié de manière significative les résultats de l'isolement. L'allongement de la durée de conservation au-delà de 12 heures a entraîné une diminution des résultats de la digestion encore accentuée après la purification. L'injection de collagénase dans le canal de Wirsung immédiatement après le prélèvement n'a pas modifié le nombre d'îlots obtenus après la digestion mais a permis d'améliorer significativement les résultats de la purification. Lorsque les donneurs étaient âgés de moins de 30 ans, le nombre total d'îlots obtenus apparaissait légèrement inférieur à celui obtenu chez les donneurs plus âgés. L'injection de collagénase immédiatement après le prélèvement a permis d'améliorer significativement plus âgés.

purification chez ces jeunes donneurs jusqu'à un niveau supérieur à celui des donneurs de plus de 30 ans. Les résultats de l'isolement sont également apparus significativement dépendants du lot de collagénase utilisé. Le lot n°33 a donné des résultats inférieurs aux deux autres après la digestion. L'efficacité de la purification et le taux de récupération des îlots obtenus avec le lot n°25 était significativement inférieur à celui obtenu avec les deux autres lots. Si l'on considère séparément les résultats des isolements effectués au cours de la première et de la deuxième année, l'expérience acquise s'est traduite par une amélioration significative des résultats, en particulier lors de la purification.

Purification Ischémie Poids Digestion Indice Age d'isolement froide du pancréas (h) (g) îlots IE îlots/g IE/g durée(min) îlots IE îlots/g IE/g rendement (%) (%) 32 22 68 22 36 24 25 26 \$86000 33 34 35 36 37 38 62 69 moyenne 34.7 9.3 55.8 41.7 64.3 2.1 1.0 3.1 2.3 e.s.m 6.1 93 min max 5215 46 87 95 % inf 30.5 7.3 49.6 11.3 95 % sup 38.9 76.6

Table 2 : Résultats quantitatifs de l'isolement des îlots de Langerhans à partir de 39 pancréas humains consécutifs

		Digest	ion	Purification			
	n	IE x10 <sup>3</sup>	IE /g	IE x10 <sup>3</sup>	IE /g re	endement (%)	
Total	39	232(21)	4355(1006)	133(12)	2575(273)	64(12)	
Expérience							
1 <sup>ére</sup> année 2 <sup>ème</sup> année	19 20	230(33) 233(26)	4221(653) 4483(563)	101(14) 162(18) <sup>a</sup>	1850(278) 3264(414) <sup>a</sup>	51(6) 73(9)*	
Liquide de perfusion in	situ						
Eurocollins Liquide UW	26 13	222(26) 231(39)	3959(551) 4861(839)	129(16) 124(21)	2367(360) 2657(483)	65(8) 58(8)	
Ischémie froide							
<12 h >12 h	27 12	247(24) 198(40)	4843(537) 3258(575)	149(16) 96(15) <sup>b</sup>	2977(349) 1670(287) <sup>⊳</sup>	63(7) 58(9)	
Injection immédiate de c	collagéna	use (IIC)					
sans avec	23 16	242(29) 217(30)	4190(543) 4593(695)	118(16) 154(18)	2027(286) 3363(468) *	53(6) 74(10)	
Age							
>30 ans <30 ans <30 ans + IIC	14 9 14	266(29) 203(57) 205(33)	4227(520) 4133(1180) 4626(788)	130(22) 99(22) 152(21)	2080(381) 1945(457) 3499(526)°	52(7) 57(11) 77(12)	
Lot de collagénase							
lot 25 lot 33 lot 91	7 22 9	342(65) <sup>d</sup> 176(18) 289(39) <sup>d</sup>	6414(1330) <sup>d</sup> 3345(324) 5335(1041) <sup>d</sup>	95(27) 130(15) 169(26)	1939(648) 2542(342) 3156(625)	26(4) <sup>d</sup> 75(8) 57(6)	

**Table 4** : Résultats de l'isolement des îlots de Langerhans à partir de 39 pancréashumains.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne(esm). a : p<0.01 (test t de student, bilatéral et non apparié). b : p<0.05 (test t de student, bilatéral et non apparié). c : p<0.05 (test de fischer) vs <30 ans . d : p<0.05 (test de fischer) vs lot 33

## **III.2.**Test de purification

Le gradient test a permis une estimation rapide et précise de la densité des îlots et du tissu exocrine pour chaque manipulation (Planche 2). Au cours de 16 isolements consécutifs (voir publication en annexe), l'ensemble des couches du gradient test recueilli et leur pureté a été estimée de manière semi-quantitative en microscopie inversée. Nous avons confirmé que la dithizone ne modifiait pas la densité des îlots en effectuant deux gradients en parallèle avec ou sans coloration préalable par la dithizone. Dans la plupart des cas, une des interfaces (1.051/1.081 dans 9 cas sur 16 et 1.081/1.091 dans 4 cas sur 16) contenait des îlots dont la pureté était supérieure à 90% (Planche 3B-C). De plus, cette interface contenait plus de 75 % du nombre total d'îlots récupérés après la purification. Les îlots restants étaient souvent encore enchâssés dans l'exocrine et se trouvaient généralement à l'interface de 1.081/1.091 (11 cas sur 16) avec une pureté variable entre 5 et 75%, rarement à l'interface 1.091/1.096 (6 cas sur 16) avec une pureté inférieure à 30%, et dans deux cas seulement sur 16 isolements à l'interface 1.096/1.104 avec une pureté inférieure à 10 (Planche 3D). Les interfaces entre la solution de Hanks et le 1.037 et 1,037/1,051 contenaient du tissu adipeux et des fragments canalaires, vasculaires ou lymphatiques de faibles densités mais jamais d'îlots. Dans trois cas où la digestion était médiocre (patients âgés de 24 ans et 29 ans et un patient atteint de pancréatique chronique), les îlots n'apparaissaient pas libérés du tissu exocrine et aucune couche ne contenait exclusivement les îlots et le rendement final était toujours inférieur à 60 000 IE. Pour la purification de l'ensemble de la préparation, la couche de séparation et la couche supérieure ont été choisies en fonction des résultats du gradient afin d'assurer une pureté au moins égale à 75 %. La couche de séparation était 1.091 dans 8 cas, 1.081 dans 5 cas et 1.096 pour trois isolements. La couche supérieure était 1.051 sauf pour deux exceptions (1.081). La réalisation de ce test nous a permis de sélectionner pour chaque pancréas les couches de séparation utilisées pour la purification des îlots dans le séparateur de cellules (Planche 4A).

## **III.3.** Evaluation qualitative

### III.3.1. Viabilité

L'exclusion du bleu trypan et la coloration par le rouge neutre a permis de montrer la viabilité des îlots après l'isolement. En lumière fluorescente et après coloration par le diacétate de fluorescéine et l'iodure de propidium les îlots présentaient une coloration verte homogène avec seulement quelques cellules périphériques, souvent dissociées, colorées en rouge (Planche 4B).

Deux semaines après transplantation sous la capsule rénale chez la souris nude, la morphologie des îlots humains apparaîssait conservée (Planche 4C). L'analyse en immunohistochimie a confirmé la présence d'insuline.

### III.3.2. Morphologie,

Lorsqu'elle a été réalisée sur trois coupes adjacentes (Planche 5), l'analyse immunohistochimique a confirmé la prédominance des cellules  $\beta$  contenant de l'insuline au sein des îlots, ainsi que la présence de cellules  $\alpha$  contenant du glucagon réparties plutôt à la périphérie des îlots et de cellules  $\delta$  contenant de la somatostatine, moins nombreuses et disséminées au sein des îlots.

## III.3.3. Fonction des îlots

La sécrétion in vitro d'insuline a été mesurée pour chacun des pancréas lors des 19 dernières manipulations. Les résultats sont rapportés dans la Table 5. Les indices de stimulation variaient selon les pancréas entre 1,4 et 13,9 (en prennant en compte les 3-4 puits par manipulation) et sa valeur moyenne était de 4.58(0.4). Lorsque la moyenne des sécrétions basales avant et après la stimulation était prise en compte pour le calcul, la valeur moyenne de l'indice de stimulation des îlots, 4.42(0.6), n'était pas significativement modifiée.

Table 5 : Indice de stimulation des îlots humains après une nuit de culture au cours d'une incubation statique avec du glucose à 3,0g/L (16.7 mM) ou 5,0 g/L (25,5 mM).

n°	Indice de stimulation (5 g/l)
15	1,6
16	1,5
17	7,1
18	8,1
19	6,7
20	1,6
21	7,3
22	3,8
moyenne	4,7
esm	1,03
n°	Indice de stimulation (3 g/l)
23 24 25 26 28 29 32 33 34 35 36 37	2 2,1 5,6 3,1 2,6 3,6 5,1 2,5 2,9 3,6 2,1
moyenne	3.2
esm	0,4

#### III.4. Culture des îlots

La fonction des îlots au cours de la culture dans le milieu CMRL 1066 classique est représentée dans la Figure 1. Jusqu'au 3ème jour de culture, l'indice de stimulation de la sécrétion d'insuline par les îlots était identique et égal à environ 3,2. Le retour de la sécrétion d'insuline à son niveau de base après l'interruption de la stimulation démontre le caractère spécifique de la réponse des îlots à la stimulation par le glucose. La sécrétion d'insuline restait stimulable par le glucose (p<0,05, 16,7 mM vs 5,5 mM) pendant la première semaine. La valeur de l'indice de stimulation était diminuée de 20% après 7 jours. Après 14 jours de culture dans le CMRL 1066 contenant du SVF (10%) les îlots ne répondaient que faiblement au glucose ( $35\pm3.8\mu$ U/20 îlots/heure vs 48,1±5,2 après stimulation, p>0,05, 16,7 mM vs 5,5 mM) ).



**Figure 1**: Sécrétion d'insuline par les îlots humains au cours d'une épreuve de stimulation par le glucose (incubation statique) réalisée après 1, 3, 7 et 14 jours de culture dans le CMRL 1066 en présence de sérum de veau foetal (10%). Les îlots ont été incubés pendant 3 heures dans du milieu Krebs Ringer Bicarbonate contenant du glucose (3,3mM pendant 60 min., 16,7mM pendant 60 min. puis 3,3mM pendant 60 min). Moyenne (esm) de 8 manipulations. \*: p<0,01, test de fisher, 16,7 mM vs 3,3 mM.

Dans le milieu sans sérum (MSS), la stimulation des îlots par le glucose était similaire à celle obtenue dans le milieu classique au cours des 3 premiers jours de culture (Figure 2), avec un indice de stimulation d'environ 3,3. Après une semaine, l'indice de stimulation diminuait légèrement mais la sécrétion d'insuline restait stimulable par le glucose même après 20 jours (p<0,05, 16,7 mM vs 5,5 mM). La figure 3 compare les indices de stimulation de la sécrétion d'insuline pour les deux milieux. Dans le milieu classique les îlots n'apparaissaient pratiquement plus stimulables après 14 jours (indice de stimulation : 1,3). Au contraire après 14 jours de culture dans le MSS, l'indice de stimulation était significativement plus élevé (3,1, p<0,05 vs milieu classique). Après 20 jours de culture, les îlots restaient stimulables et l'indice de sécrétion étaient encore égal à 2,4. Le contenu total en insuline représenté dans la Figure 4 diminuait également moins vite dans le MSS que dans le milieu classique. Cette différence n'était pas significative après 14 jours de culture. Après 20 jours, les îlots cultivés dans le MSS contenaient encore 50% de leur taux initial d'insuline.

Quelque soit le milieu utilisé et la durée de la culture, le rapport entre la biosynthèse d'insuline et celle des protéines totales était compris entre 15 et 25%. La biosynthèse d'insuline (Figure 5A) en milieu classique augmentait légèrement après 3 jour de culture. Cependant, elle diminuait de 30% après 7 jours ( $365\pm85$  dpm/filot) et de 55% après 14 jours ( $225\pm29$ ) de culture, respectivement en milieu classique par rapport au 1er jour ( $497\pm108$ ). La biosynthèse d'insuline en milieu sans sérum augmentait après 3 jours de culture ( $805\pm189$  dpm/filot) par rapport au 1er jour ( $481\pm66$ ) et restait stable durant les 14 jours. Les différences apparentes entre le milieu classique et MSS après 7 et 14 jours n'étaient pas statistiquement significatives ( $365\pm85$  vs  $805\pm175$ , p=0,057 à 7 jours et  $225\pm29$  vs  $799\pm331$ , p=0,14 à 14 jours). La biosynthèse des protéines était toujours plus élevée dans le milieu sans sérum que dans le milieu classique, cependant ces différences n'étaient pas significative. Après 14 jours de culture la biosynthèse des protéines a diminué de 50% des valeurs initiales après 1 jour quelque soit le milieu (CMRL +SVF 1885±417 vs 930±151 et MSS  $2563\pm559$  vs  $1438\pm331$ ). La biosynthèse d'insuline après 14 jours en MSS était supérieure à celle observée en milieu classique cependant ces différences n'étaient pas significatives.



**Figure 2**: Sécrétion d'insuline par les îlots humains au cours d'une épreuve de stimulation par le glucose (incubation statique) réalisée après 1, 3, 7, 14 et 20 jours de culture dans un milieu défini sans sérum (MSS). Les îlots ont été incubés pendant 3 heures dans du milieu Krebs Ringer Bicarbonate contenant du glucose (3,3mM pendant 60 min., 16,7mM pendant 60 min. puis 3,3mM pendant 60 min). Moyenne (esm) de 8 manipulations. \*: p<0,01, test de fisher, 16,7 mM vs 3,3 mM.



**Figure 3**: Indice de stimulation de la sécrétion d'insuline au cours d'une épreuve d'incubation statique (sécrétion stimulée/sécrétion basale) par les îlots humains cultivés dans un milieu défini sans sérum (MSS) ou du CMRL 1066 en présence de sérum de veau foetal (10%). Les îlots ont été incubés pendant 3 heures dans du milieu Krebs Ringer Bicarbonate contenant du glucose (3,3mM pendant 60 min., 16,7mM pendant 60 min puis 3,3mM pendant 60 min). Moyenne (esm) de 8 manipulations. \*: p<0,05, test t de student CMRL+SVF vs MSS.



**Figure 4**: Insuline totale contenue dans les îlots humains cultivés dans un milieu défini sans sérum (MSS) ou du CMRL 1066 en présence de SVF (10%). Moyenne (esm) de 8 manipulations.



Biosynthèse des protéines (dpm/îlot)



**Figure 5**: (A)Biosynthèse de l'insuline et (B) biosynthèse des protéines totales par les îlots humains cultivés dans un milieu défini sans sérum (MSS) ou du CMRL 1066 en présence de sérum de veau foetal (10%). Moyenne (esm) de 4-5 manipulations. P>0,05, test t de student CMRL+SVF vs MSS.

### **IV. DISCUSSION**

#### IV.1. Isolement

Les pancréas humains prélevés chez des donneurs en état de mort cérébrale représentent aujourd'hui la seule source de tissu sécrétant de l'insuline disponible pour la transplantation et le traitement des diabétiques de type 1.

### IV.1.1. Rendement

La difficulté de l'isolement sélectif des îlots de Langerhans à partir du tissu pancréatique humain est longtemps restée le principal facteur limitant du développement de l'application clinique de la greffe d'îlots. Dès 1967, chez le rongeur, la digestion par la collagénase a permis la libération des îlots intacts et fonctionnels du tissu exocrine[84]. L'importance des connexions liant le tissu exocrine et les îlots ainsi que la présence et la nature (fibres collagènes, de protéoglycanes et de glycoprotéines) d'une matrice extra-cellulaire autour des îlots dépendent largement de l'espèce considérée[138]. Chez certains grands mammifères comme le chien, les îlots sont nettement distincts du tissu exocrine, entourés d'une capsule [138] ; leur isolement n'apparaît pas beaucoup plus difficile que chez le rongeur et il a été maîtrisé dès 1981[90]. Chez l'homme, par contre, les îlots sont peu encapsulés et ils apparaissent étroitement connectés au tissu exocrine[138,139]. L'amélioration et le raffinement progressifs des procédés de digestion du pancréas par la collagénase et des techniques de purification des îlots ont cependant permis d'amener les résultats de l'isolement des îlots humains jusqu'à un niveau compatible avec les impératifs de la transplantation clinique. La description récente par Ricordi d'une méthode automatisée de digestion enzymatique a permis sans en modifier le principe de simplifier la technique d'isolement des îlots humains et d'en améliorer la reproductibilité[44]. Cette technique a été rapidement adoptée par la plupart des laboratoires et a permis à une dizaine d'équipe d'obtenir des résultats similaires. La table 6 reprend les résultats de l'isolement des îlots humains rapportés dans la littérature (seules les études décrivant les résultats d'une série d'isolements consécutifs ont été

prises en compte). Malgré les progrès enregistrés, les résultats obtenus avec la technique d'isolement automatisée couplée à la purification en gradient de densité dans le séparateur de cellules ne permettent de recueillir que 20 à 50% (environ 100 à 200 000 équivalents d'îlots de  $150\mu$  de diamètre) des îlots présents dans le tissu pancréatique. De nombreux progrès restent à accomplir pour améliorer les résultats de l'isolement des îlots humains.

Le premier obstacle est la grande variabilité des résultats d'un isolement à un autre. Dans notre expérience comme pour la plupart des auteurs, ils ont varié d'un facteur 1 à 10 en fonction des pancréas. Différents facteurs peuvent expliquer cette importante variation. La détermination et la maîtrise de ces facteurs permettront probablement d'améliorer encore les résultats de l'isolement des îlots humains.

# Table 6. Résultats de l'isolement des îlots humains dans la littérature

Après digestion

Equipe	année	n	méthodeª	îlots x10 <sup>3</sup>	îlots / g	IE x10 <sup>3</sup>	IE /g	indice d'isolement
Saint-Louis[58]	1987	9	MNA	200	3492	_		<u>.</u>
Edmonton[98]	1988	20	MNA	130	1721	-	-	-
Saint Louis[44]	1988	10	MA	276	3917	-	-	-
Leicester[100]	1990	20	MNA	131	2394	-	-	-
Edmonton[140]	1991	19	MNA	365	5300	-	-	-
Saint-Louis [129]	1991	24	MA	335	5733	380	6403	1.13
Barcelone[141]	1992	41	MA	-	•		5831	- ,
Milan[142]	1993	22	MA	291	5490	307	5801	1.05
Edmonton[143]	1994	19	MA	-	-	324	4240	- /
Leicester[144]	1994	14	MA	-	-	434	4914	-
Paris[145]	1994	15	MA	-	2775	-		-
Minneapolis[146]	1994	15	MA	386	5991	208	3178	0.53
Genève[147]	1995	29	MA	283	4304	-	-	-

#### Après purification

Equipe	année	n	méthode <sup>b</sup>	<sup>2</sup> îlots x10 <sup>3</sup>	îlots / g	IE x10 <sup>3</sup>	IE /g	pureté (%)	rendement (%)
Oxford[91]	1984	10	F	44	1011	_	-	28	-
Saint-Louis[58]	1987	9	F	125	2180	-	-	60-90	63
Saint Louis[44]	1988	10	F.	164	2279	-	-	78	40-60
Edmonton[97]	1989	10	F	161	-	-	-	20-90	-
Paris[148]	1990	40	Μ	-	1500	-	-	95	-
Oxford[149]	1990	6	F	-	2340	-	-	-	40
Saint-Louis <sup>c</sup> [129]	1991	24	EF	269	4586	271	4563	90	70
Edmonton[140]	1991	19	EF	155	2250	-		45-75	42
Barcelone[141]	1992	41	SA/C	-	-	-	2044	10-90	29
Milan <sup>c</sup> [142]	1993	22	EF/C	159	3014	189	3634	61	62
Edmonton <sup>°</sup> [143]	1994	19	EF/C	-	-	200	2800	-	62
Minneapolis <sup>c</sup> [146]	1994	15	EF	119	-	-	-	-	-
Los Angeles[150]	1994	104	EF/C	147	3205	152	3293	78	-
Paris[145]	1994	15	F/C	-	1643	-	-	-	59
Omaha[151]	1994	7	EF/C	264	4687	75	1302	53	-
Philadelphia[152]	1994	23	EF/C	-	-	110	2453	74	-
Chicago[153]	1994	50	EF/C	-	-	300	-	73	-
Giessen <sup>c</sup> [154]	1994	21	N/C	-	-	-	3817	84	-
Pittsburgh <sup>c</sup> [155]	1994	8	EF/C	-	-	200	-	68	-
Genève[147]	1995	29	EF/C	85	1278	-	-	59	-

a : type de méthode utilisée pour la digestion du pancréas (MNA : méthode non automatisée. MA : méthode automatisée). b : méthodes utilisées pour la purification, type de gradient utilisé (F : Ficoll. EF : Euro-Ficoll. SA : sérum albumine bovine. N : Nicodenz), utilisation d'un séparateur de cellules (C), purification manuelle (M). c : équipe ayant obtenu la guérison d'un ou plusieurs patient(s) diabétique(s) de type 1 par la greffe d'îlots.

### IV.1.2. Caractéristiques des donneurs

Les caractéristiques cliniques des donneurs sont probablement déterminantes. Bien qu'il soit encore difficile de dégager des certitudes en raison du nombre limité de pancréas étudiés, plusieurs facteurs semblent jouer un rôle important. L'âge du donneur est souvent apparu comme un facteur limitant [153] en particulier lorsque les pancréas sont conservés durant plusieurs heures en hypothermie[142]. Chez l'homme comme chez le porc[156], la matrice de collagène entourant les îlots augmente et les contacts directs entre les îlots et le tissu exocrine diminuent avec l'âge[157]. En l'absence de précautions particulières (voir ci-dessous) les pancréas provenant de jeunes donneurs sont plus lentement et plus difficilement dissociés au cours de la digestion enzymatique. La dissociation des îlots du tissu exocrine est rarement complète et le rendement obtenu lors de la purification est inférieur (table 4). L'existence de pathologies associées (éthylisme et pancréatite chronique), d'une hyperglycémie, l'index corporel, la durée et les conditions de la réanimation du donneur ou les circonstances de sa mort semblent également jouer un rôle[150].

#### IV.1.3. Conditions du prélèvement.

Le prélèvement du pancréas est généralement effectué au cours d'un prélèvement multi-organes dont le principe impose la réfrigération in situ des organes par la perfusion artérielle d'une solution réfrigérée à 4°C. Le prélèvement du pancréas avant la perfusion in situ est difficile sur le plan pratique et s'accompagne inévitablement d'une période d'ischémie chaude particulièrement délétère pour le pancréas. Bien que cette procédure ait parfois été jugée préférable chez l'animal[158], ces résultats ne se sont pas confirmés chez l'homme[143,146,159] et la perfusion in situ est unanimement utilisée. La solution employée pour la perfusion in situ est le plus souvent une solution de type intracellulaire (riche en potassium) contenant des anions imperméants voire un colloïde (amidon ou polyéthylène glycol) afin de diminuer l'oedème cellulaire induit par l'hypothermie[160]. Dans notre étude, la perfusion aortique de la solution de conservation la plus courante (Eurocollins) ou d'une solution contenant de l'hydroxy-éthyl d'amidon (solution UW) n'a pas modifié significativement les résultats de l'isolement ni de la purification, confirmant les résultats préliminaires de l'équipe d'Edmonton[161]. L'usage de la solution UW entraîne par contre, un allongement du temps de digestion et une augmentation de la concentration de collagénase nécessaires pour la digestion[144]. Cependant lorsque la durée prévisible de la conservation hypothermique dépasse 6 heures, les résultats de plusieurs études chez l'animal[162,163] et chez l'homme[118,142,164] semblent justifier le surcoût entraîné par l'usage de la solution UW.

### IV.1.4. Conservation hypothermique du pancréas

La durée de la conservation est un facteur déterminant pour le succès de l'isolement. Dans notre étude comme dans la littérature, les résultats quantitatifs diminuent significativement avec l'allongement de la durée de conservation[150,152,153,164], confirmant les résultats observés chez l'animal[162,165]. Dans la plupart des cas, les pancréas humains doivent être conservés durant plusieurs heures avant l'isolement ; l'hypothermie à 4°C permet de réduire le métabolisme cellulaire et la consommation d'oxygène et limite les conséquences de l'ischémie. L'hypothermie s'accompagne cependant d'une réduction de l'activité de la pompe sodium/potassium et entraîne un oedème cellulaire plus ou moins réversible[166]. Dans le pancréas, cette ischémie froide est particulièrement délétère pour l'épithélium canalaire [167]. L'intégrité de l'arbre canalaire est nécessaire pour assurer une bonne diffusion au sein du tissu pancréatique de la solution de collagénase lorsqu'elle est injectée dans le canal de Wirsung. La souffrance canalaire induite par l'hypothermie pourrait expliquer l'action néfaste de la conservation sur l'isolement[167]. Munn[162] chez le chien et Ozhato chez le rongeur[167] ont décrit l'intérêt de l'injection canalaire d'une solution de conservation contenant de la collagénase préalablement à la conservation hypothermique du pancréas. Cette technique s'est révélée également utile chez l'homme[48,168] en particulier pour les pancréas de jeunes donneurs[142] chez lesquels l'efficacité de la digestion enzymatique par la collagénase est diminuée[169]. Dans notre étude, l'injection immédiate de collagénase a permis une meilleure dissociation des îlots du tissu exocrine; La diminution des fragments exocrines encore partiellement attachés aux îlots a permis une augmentation significative de leur récupération lors de la phase de purification particulièrement sensible avec les

pancréas de jeunes donneurs (table 4). Parallèlement à la diminution des résultats quantitatifs de l'isolement, l'allongement de la durée de conservation s'accompagne d'une diminution de la fonction des îlots[161,164] et prolongée au delà de 16 heures, elle s'accompagne d'une perte de leur viabilité[150]. En clinique, aucun patient n'est devenu insulino-indépendant après une transplantation avec les îlots d'un pancréas conservé plus de 8 heures[67]. La conservation du pancréas avant l'isolement ne semble donc pas devoir être prolongée au delà de 12 heures[43]. La température idéale de conservation reste à déterminer et une étude expérimentale chez le rongeur suggère qu'une conservation à 7°C voire 10 °C serait favorable pour la fonction des îlots[165]. Le tissu exocrine est plus sensible à l'action de l'ischémie froide[170] et sa souffrance entraîne la libération d'enzymes protéolytiques toxiques pour les îlots, dont l'inhibition pourrait diminuer les conséquences de la conservation[171].

### IV.1.5. Collagénase

La qualité et l'activité, variable selon les lots, de la collagénase est probablement un facteur déterminant pour le succès de l'isolement des îlots humains[172]. Dans notre expérience comme dans la littérature[89,150], le lot de collagénase utilisé est apparu significativement corrélé aux résultats de la digestion et de la purification.

## **IV. 2. Purification**

#### IV.2.1. Technique

De nombreuses techniques ont été décrites pour séparer les îlots du tissu exocrine à l'issue de la phase de digestion. La séparation isokinétique par élutriation [114,173] qui sépare les particules en fonction de leur taille ne semble pas satisfaisante pour la purification des îlots dont la taille varie de 50µ à + 500µ n'est pas différente de celle des particules exocrines dissociées. Les techniques utilisant des caractéristiques spécifiques des cellules endocrines (affinité pour certains colorants ou antigènes de surface spécifiques) permettraient en théorie d'obtenir les meilleurs résultats. Elles comprennent la séparation automatisée des îlots grâce à la cytofluorométrie de flux[115,174], la séparation magnétique à l'aide de microbilles recouvertes d'anticorps antiacineux[175,176] ou de lectines spécifiques du tissu exocrine[116]et la destruction spécifique par le laser du tissu exocrine marqué par des lectines[177]. Cependant, ces techniques décrites le plus souvent chez le rongeur se heurtent chez l'homme ou les grands mammifères à un facteur limitant d'ordre quantitatif qui, pour l'instant, semble difficile à surmonter. Chez l'homme, la technique ayant permis d'obtenir les meilleurs résultats est la séparation isopycnique par centrifugation en gradient de densité. De nombreux types de gradients ont été décrits et utilisés pour la purification des îlots comme le sucrose[85] le Ficoll[86], le dextran[178], l'albumine[179] le Percoll[58], l'Hypaque-Ficoll[180], le Metrizamide[181], et le Nycodenz[173]. Chez l'homme, la conservation hypothermique est inévitable et l'ischémie froide s'accompagne d'un oedème et d'une souffrance cellulaire. En provoquant la dégranulation des cellules[170], cette souffrance aboutit à la diminution progressive de la densité du tissu exocrine pendant les phases d'hypothermie au cours de l'isolement des îlots. L'utilisation de solutions hyperosmolaires dans les gradients de densité est donc nécessaire pour lutter contre les conséquences de l'hypothermie[110]. L'addition au Ficoll d'une solution de conservation de type Eurocollins et la description de l'Euro-Ficoll [129] a permis d'améliorer significativement les résultats de la purification des îlots humains. D'autres gradients hyperosmolaires à base de sérum-albumine bovine[110] permettent d'obtenir des résultats équivalents. Il est également possible d'optimiser

les résultats en limitant les conséquences de l'hypothermie au cours de la conservation des préparations entre la digestion et la purification. Le recueil et la conservation du digestat pancréatique dans une solution de conservation type solution UW, qui a été décrit initialement chez le chien[182] et le porc[183], améliorent significativement les résultats de la purification ultérieure chez l'homme[184]. Cet effet bénéfique de la solution UW est dû à la présence d'un anion imperméant, le lactobionate, et d'un agent colloïde, l'hydroxy-éthyl d'amidon[185].

La description de l'utilisation d'un séparateur de cellules développé par IBM pour la séparation des cellule sanguines (COBE 2991), pour la purification des îlots a facilité et simplifié la réalisation de la centrifugation[186]. La forme du sac de centrifugation diminue les effets de paroi ou "wall effects" existant dans les tubes conventionnels. La récupération des interfaces peut s'effectuer sans interrompre la rotation, évitant ainsi le " swirling effect " de la décélération. L'utilisation de sacs à usage unique permet aussi de limiter les risques de contamination.

Les solutions d'Euro-Ficoll, d'albumine ou de Nycodenz peuvent également être utilisées sous forme de gradients continus, facilement réalisés à partir de la solution mère et d'un solvant à l'aide d'un dispositif automatisé (gradient maker)[110]. Le principal avantage des gradients continus est la possibilité de placer les cellules à la partie supérieure du gradient. Les îlots sont donc dans une solution de type physiologique à faible pression osmotique et leur contact avec la solution de gradient à forte osmolarité peut être limité au minimum. Avec le séparateur de cellules, le principe du chargement supérieur permet également la purification d'une plus grande quantité de digestat au cours d'une seule manipulation. Avec un gradient discontinu, le séparateur de cellules permet de purifier au maximum 15 à 20 ml de culot et la purification des îlots d'un pancréas humain nécessite au minimum deux centrifugations. Cependant, les avantages théoriques de cette technique sont nettement diminués en raison de l'inévitable agglomération des cellules entre elles qui entraîne de nombreux îlots avec le tissu exocrine vers les couches les plus denses[110]. La majorité des équipes utilisent le gradient discontinu d'Euro-Ficoll (Table 6).

### IV.2.2. Variation des résultats

Parmi les éléments modifiant le rendement de la purification, la qualité de la dissociation des îlots au cours de la digestion est certainement un facteur critique. Lorsque les îlots sont incomplètement libérés et encore recouverts de tissu exocrine, ils sont retenus dans les couches de densité plus élevée au cours de la centrifugation. Les résultats médiocres de la purification des îlots observés chez nos jeunes donneurs, dont la dissociation enzymatique est difficile et chez qui les îlots étaient rarement parfaitement libres, illustrent bien l'importance de la digestion pour la purification. Chez les patients atteints de pancréatite chronique, la digestion du pancréas est possible et l'autotransplantation de préparations non purifiées a permis la prévention du diabète après pancréatectomie totale[41]. Par contre dans notre expérience, la purification des îlots chez de tels patients est apparue particulièrement difficile. La pauvreté en granules de sécrétion du tissu exocrine fibreux explique probablement la diminution de la densité du tissu exocrine et les faibles résultats de la purification observée chez ces patients.

#### IV.2.3. Test de purification

Quelle que soit la technique ou la nature des gradients utilisés, les résultats de la purification restent extrêmement variables d'une manipulation à l'autre[110]. Cette difficulté de la purification des îlots humains provient de la similitude des densité des îlots (1.059) et du tissu exocrine (de 1.059 à plus de 1.074) mais surtout de la variation considérable d'un pancréas à l'autre de la densité du tissu exocrine[110] et du degré de dissociation des îlots obtenus par la digestion enzymatique. En plus des conditions du prélèvement[143,184], de la conservation du pancréas[164] ou des propriétés des milieux utilisés pour l'isolement et la purification[184,185], de nombreux paramètres non maîtrisables comme les caractéristiques du donneur et l'existence de pathologies associées, les conditions de la réanimation ou le degré de dégranulation des cellules acineuses peuvent faire varier la densité et la dissociation des tissus exocrines et endocrines[187]. La détermination des caractéristiques optimales du gradient pour chaque manipulation apparaît indispensable pour optimiser les résultats de la purification des îlots humains[188]. Les tests déjà

décrits apparaissent cependant difficiles à utiliser dans le contexte de l'isolement des îlots humain et de la transplantation. La majorité des équipes ayant transplanté des patients diabétiques utilisent donc la purification dans un gradient discontinu d'Euro-Ficoll avec trois ou quatre couches constantes, 1.108/1.091/Hanks[47] ou 1.108/1.096/1.037/Hanks[48,51,101,110] et recueillent respectivement les îlots dans les interfaces 1.091/Hanks ou 1.096/1.037. La pureté des préparations obtenues varie de 95% à moins de 25% et dans de nombreux cas, cette technique entraîne une contamination importante par l'exocrine qui n'augmente que très faiblement le nombre d'îlots recueillis. Le test simple que nous avons décrit et dont la réalisation est parfaitement compatible avec les conditions de l'isolement des îlots humains[189], permet de moduler les caractéristiques du gradient pour chaque préparation et de privilégier la pureté ou le rendement en fonction des besoins.

# IV.2.4. Intérêt de la purification

Même optimisée, la purification induit la perte d'une partie non négligeable (25 à 50%) des îlots présents après la digestion. Elle est cependant jugée indispensable par la plupart des auteurs et la quasi totalité des essais cliniques de greffe d'îlots chez le diabétiques ont été effectués avec des préparations purifiés. Trois objectifs expliquent ce choix : la diminution de l'immunogénicité des îlots[190], l'amélioration de l'implantation au niveau du site receveur et surtout la réduction des risques de l'injection intraportale des îlots. L'augmentation de l'immunogénicité des préparations non purifiées a été démontrée chez le rongeur[191], mais n'a pas été confirmée chez le gros animal. C'est en fait la contamination par les cellules lymphocytaires et non le tissu exocrine lui même qui est responsable de cette accroissement de l'immunogénicité[192]. D'autre part les cellules  $\beta$  isolées même après l'élimination de tout les leucocytes passagers continuent d'induire une réaction de rejet allogénique lors de la transplantation[193], probablement par l'intermédiaire de la voie indirecte de présentation antigénique[194]. Il apparaît donc surtout essentiel d'éliminer tout fragment lymphatique lors de la dissection avant l'isolement du pancréas pour diminuer la contamination par des cellules lymphoïdes[195]. La diminution de l'implantation

des îlots lorsqu'ils sont greffés avec du tissu exocrine a été démontrée chez le rongeur après transplantation sous la capsule rénale[109] puis confirmée chez le chien[196]. Cependant, cet effet délétère du tissu exocrine, dû probablement à la libération locale d'enzymes protéolytiques, pourrait être diminué dans un site d'implantation moins confiné. Les résultats de l'autotransplantation de préparation non purifiées après pancréatectomie[41], semblent indiquer que l'effet délétère du tissu exocrine est moins marqué après injection intra-portale. Cependant chez les patients atteints de pancréatite chronique le pancréas exocrine est atrophié[197]. Les résultats obtenus chez ces patients ne semblent donc pas directement transposables à la transplantation de préparations allogéniques isolées à partir de pancréas de donneurs sains. Le principal obstacle au développement de la greffe d'îlots non purifiés reste le risque de complications mécaniques induit par l'injection d'un volume tissulaire important dans la veine porte. L'autotransplantation intrahépatique d'une préparation non purifiée s'accompagne d'une augmentation de la pression intra-portale. Elle peut parfois entraîner des troubles majeurs de l'hémostase avec coagulation intravasculaire disséminée[106,198], infarctus mésentérique[41] ou thrombose de la veine porte compliquée d'une insuffisance hépatique sévère et du décès de certains patients[107]. Bien qu'elle ait permis la guérison d'un patient diabétique avec les îlots d'un seul pancréas la greffe d'îlots allogéniques non purifiés a également déjà entraîné une thrombose de la veine porte compliquée de rupture splénique (Gores P, Communication personnelle, 1994) et une insuffisance hépatique sévère ayant nécessité une transplantation hépatique[103]. Néanmoins le développement de nouveaux sites d'implantation offrant un volume plus important comme la cavité péritonéale[199] pourrait remettre en cause la nécessité de la purification des îlots aujourd'hui admise par la plupart des auteurs [195].

## IV.3. Evaluation de l'isolement

Malgré la standardisation de l'expression des résultats de l'isolement [133], l'évaluation de la numération et de la pureté des préparations reste extrêmement dépendante de l'observateur. Les progrès de l'imagerie laisse prévoir la possibilité d'une quantification automatisée plus reproductible[200]. L'obtention d'un nombre élevé d'îlots n'est pas toujours synonyme du succès de l'isolement[150] et parallèlement à l'évaluation quantitative, l'évaluation qualitative des préparations est indispensable. Les colorations vitales développées pour d'autres types cellulaires par le rouge neutre, le bleu trypan, ou des colorants fluorescents comme le diacétate de fluorescéine, l'iodure de propidium ou l'orange d'acridine ne permettent qu'une estimation semiquantitative de la viabilité des cellules. L'utilisation de la microscopie confocale a été également proposée pour affiner cette évaluation[201]. L'étude de la fonction des îlots et de leur sécrétion d'insuline est indispensable. Plusieurs techniques de stimulation in vitro de la sécrétion de l'insuline permettent de l'évaluer. La périfusion est la plus précise et permet l'étude fine des différentes phases de sécrétion de l'insuline en réponse à des concentrations croissantes de glucose ou de divers agents stimulants (théophylline, arginine). Le retour de la sécrétion à sa valeur de base à l'issue de la stimulation confirme son caractère spécifique. La fonction des îlots est appréciée par la mesure de la quantité d'insuline sécrétée et le calcul d'un indice de stimulation qui correspond au rapport de la sécrétion maximale sur la moyenne des sécrétions basales avant et après la stimulation. Nous avons opté comme de nombreuses autres équipes pour une technique utilisant l'incubation statique des îlots avec différentes concentrations de glucose. Cette technique plus simple reflète néanmoins de façon satisfaisante la deuxième phase de la sécrétion d'insuline et elle est utilisée par de nombreuses autres équipes (Table 7). Bien que les variations des concentrations de glucose utilisées dans la solution de base  $(0,3 \ge 1 g/l)$  et lors de la stimulation (3 à 5g/l) limite la comparaison des résultats, les valeurs de l'indice de stimulation obtenues dans notre expérience sont similaires à celles rapportées dans la littérature.

Equipe	Basal	/Stim.*	Type⁵	Indice
Edmonton[99]	0,5	5,0	Р	7,1
Edmonton[97]	0,5	5,0	Р	6
Saint-Louis[202]	0,6	3,0	Р	5,5
Saint-Louis[44]	0,6	3,0	Р	5
Milan[142]	0,6	3,0	Р	4,5
Giessen[168]	0,5	3,0	Р	2,8
Saint-Louis[58]	0,5	3,0	Р	3,4
Edmonton[161]	0,5	5,0	Р	3,7
Leicester[100]	0,3	4,5	IS	3,8
Chicago[153]	0,6	3,0	IS	3,2
Barcelone[141]	1,0	3,0	IS	2,9
Leicester[144]	0,3	4,5	IS	2,6
Leicester[186]1,0	3,6	IS	2,3	
Los Angeles[150]	0,6	3,0	IS	2,1
Genève[147] 0,5	3,0	IS	1,8	

Table 7: Fonction in vitro des îlots humains dans la littérature.

.

a: concentration de glucose basale et lors de la stimulation (g/l).
b: type de stimulation (P:périfusion. IS: incubation statique).
c: Indice de stimulation (sécrétion stimulée/ sécrétion basale).

Seule l'évaluation in vivo chez le rongeur diabétique permet la confirmation de la fonction des îlots et elle a été récemment entreprise dans le laboratoire. La survie des îlots humains après transplantation chez la souris immunodéprimée a confirmé leur viabilité. L'étude de la fonction des îlots devra être poursuivie chez la souris diabétique. La fonction des îlots humains a d'autre part pu être démontrée par la correction de la glycémie chez des rats diabétiques après encapsulation dans une fibre d'AN 69 et transplantation intrapéritonéale réalisée en collaboration avec Hospal R&D, Mezieux, France (étude en cours).

Enfin, la qualité bactériologique et virale des préparations d'îlots humains devra faire l'objet d'une étude spécifique en vue de l'application clinique.

### **IV.4.** Culture

Différents milieux de culture développés pour d'autres types cellulaires peuvent être utilisés pour la culture des îlots de Langerhans: TCM 199[125,135], RPMI 1640[126], CMRL 1066[58]. Ce dernier est considéré comme le meilleur pour les îlots humains[203]. Le pH optimal pour la culture des îlots est de 7,2[204]. Les études visant à optimiser les conditions de culture les îlots chez la souris ont abouti à la description de la culture en suspension qui est couramment utilisée aujourd'hui pour les îlots humains dans le CMRL 1066 ou le RPMI 1640 contenant 10% sérum de veau foetal. Cependant, la culture s'accompagne classiquement d'une diminution rapide de la masse et de la fonction des îlots. L'addition de sérum d'origine animale [127,135,205] ou humaine (sérum du sang de cordon[206] ou adulte[127]) s'est révélée nécessaire pour prolonger la survie des îlots en culture[207]. Bien qu'elle apparaisse souhaitable, la présence de sérum entraîne également une augmentation de l'adhésion des îlots au support de culture et une tendance à la formation des monocouches[206], délétère à long terme pour la fonction des îlots[135,208] au contraire d'autres types cellulaires[208]. Les facteurs potentiellement responsables de l'action du sérum comprennent les facteurs d'adhésion, les facteurs de croissance(IGF I,II, EGF, PDGF) et les vitamines[207].

La survie et la fonction des îlots dans un milieu défini sans sérum ont déjà été démontrées chez le rongeur[209-211], et chez l'homme jusqu'à 1 mois[212]. Nous avons démontré la prolongation du contenu total en insuline, de la biosynthèse d'insuline et de sa sécrétion en cultivant les îlots humains dans un milieu défini sans sérum. Les facteurs responsables de cet effet bénéfique restent à identifier. La transferrine et le sélénium de sodium sont généralement ajoutés aux milieux sans sérum[210,213]. Le substitut du sérum "Ultroser G", contient des vitamines, de l'albumine, des facteurs d'adhésion, des facteurs de croissance, ainsi que des hormones et en particulier de l'insuline. L'importance de l'insuline pour la fonction et la croissance de nombreux types cellulaires est bien démontrée. L'insuline ne semble pas exercer de rétrocontrôle négatif sur la sécrétion d'insuline par les îlots[214] lorsqu'elle est évaluée par la mesure du peptide C[207,215]. La fonction des cellules  $\beta$  est influencée par d'autres types cellulaires présents dans l'îlot, ainsi nous ne pouvons pas exclure l'effet d'autres facteurs sur la fonction des cellules  $\beta$  qui pourrait être influencée par les autres hormones présentes dans l'îlot[207]. L'addition de composés glucidiques de type pyruvate dans un milieu de type CMRL contenant du SVF permet de maintenir la viabilité des îlots humains pendant 4 mois ainsi que leur fonction évaluée par la stimulation de la sécrétion d'insuline par la théophylline[216]. Dans un milieu similaire, nous avons observé la perte de la réponse des îlots humains au glucose seul après 14 jours. Le rôle spécifique du pyruvate dans notre milieu sans sérum reste donc à quantifier.

Le développement de milieux dépourvus de sérum et de composition parfaitement définie semble indispensable pour l'application clinique et la transplantation des îlots après la culture. Le milieu que nous avons développé et qui contient un substitut de sérum, de la transferrine, du sélénium, et de l'éthanolamine nous a permis de réduire significativement la perte de la fonction des îlots induite par la culture. Après 3 semaines de culture, le contenu en insuline des îlots humains était encore égal à 50% de sa valeur initiale. L'utilisation de milieu de cultures de ce type facilitera la conservation des préparations d'îlots humains en vue de leur application clinique.
# V. CONCLUSION

En conclusion, l'amélioration de la technique de digestion et de purification des îlots avec en particulier, la distension du pancréas immédiatement après le prélèvement par l'injection dans le canal de Wirsung d'une solution de collagénase, la diminution de la durée de l'ischémie froide, l'utilisation d'une technique automatisée de digestion, la suspension du pancréas digéré dans une solution de conservation de type intracellulaire et contenant un colloïde avant la purification, la détermination de la densité des tissus exocrines et endocrines et le choix des couches de séparation à l'aide d'un test pour chaque manipulation, la purification des îlots dans un gradient discontinu d'Euro-Ficoll nous ont permis d'optimiser les résultats de l'isolement des îlots humains. Les résultats qualitatifs obtenus aujourd'hui sont compatibles avec les impératifs de la greffe. Avec l'amélioration des conditions de culture, la possible réunion de plusieurs préparations nous permet d'envisager la greffe d'îlots de Langerhans chez des patients diabétiques de type 1 immunosupprimés.

Le probable développement des indications de la greffe d'îlots et le nombre déjà limité des donneurs d'organes rendra cependant vite insuffisant l'isolement des îlots humains à partir de pancréas de cadavres. Il apparaît donc essentiel d'explorer dès maintenant d'autres sources de tissu endocrine pour répondre aux besoins prévisibles en vue du traitement des patients diabétiques par la greffe d'îlots.

Deux voies principales peuvent être envisagées:

- l'utilisation d'îlots xénogéniques .
- l'induction de la prolifération de cellules humaines sécrétrices d'insuline en culture.

# **PLANCHES**

Isolement automatisé des îlots de Langerhans humains.

A : Dispositif de Ricordi qui permet la circulation continue de la solution de collagénase chauffée à 37°C dans la chambre de digestion contenant le pancréas grâce à une pompe péristaltique

Après une phase de recirculation (B) que permet la digestion du pancréas, le recueil du digestat s'effectue en perfusant la chambre (A) par une solution de Hanks refroidie à 4°C et contenant du sérum de veau nouveau né (10%).

B : Distension du pancréas humain par la solution de collagènase injectée dans un cathéter placé dans le canal de Wirsung.

C : Résidu de l'arbre canalaire après la digestion de la glande pancréatique.



Planche 1

Exemple d'un gradient conventionnel avec 4 couches d'EuroFicoll (à gauche) comparé au gradient test composé de multiple couches (à droite) qui permet la sélection précise de l'interface optimale pour la récupération des îlots. Les îlots déjà colorés avec la dithizone (rouge) sont visible à l'interface 1,037 / 1,096 (flèche) et contaminés par le tissu exocrine (astérisque) dans le gradient conventionnel. Dans le gradient test les îlots (flèche) sont aux interface 1,051 / 1,081 et 1,081 / 1,091 et le tissu exocrine (astérisque) est à l'interface 1,091 / 1,096. Les couches 1,051 et 1,091 seront utilisée pour la purification dans le séparateur de cellules.



Evaluation microscopique des couches de gradient test (isolement différent du celui de la planche 2) (grossissement x100)

A : Interface 1,037 / 1,051 tissu adipeux dont l'aspect géométrique est caractéristique

B : Interface: 1,051 / 1,081: îlots contaminés par des fragments canalaires de faible densité.

C: Interface: 1,081 /1,091: îlots hautement purifiés

D : Interface: 1,091 / 1,096: tissu exocrine en îlots mal digérés

Les couches 1,051 et 1,091 seront utilisées pour la purification dans le séparateur de cellules si l'on veut privilégier la pureté, et les couches 1,051 et 1,096 si l'on veut privilégier le rendement.



Planche 3

A : Ilots humains après la purification, colorés en rouge par la dithizone (barre = $50\mu m$ )

B : Viabilité des îlots humains après l'isolement mise en évidence par la technique de coloration vitale avec la diacétate de fluorescéine (colore en vert les cellules vivantes) et l'iodure de propidium (colore en rouge les cellules mortes) (barre =  $25 \,\mu$ m).

C : Coupe histologique colorée par l'hématoxyline picroindigo carmin des îlots humains greffés depuis deux semaines sous la capsule rénale d'une souris nude. (barre =  $25 \mu m$ ).



Planche 4

Immunohistochimie sur des coupes semi-adjacentes d'îlots humains isolés, fixés dans une solution de Bouin et inclus dans la paraffine (barre =  $25 \mu m$ ). A : Glucagon. B : Insuline. C : Somatostatine.



Deuxième partie :

# DEVELOPPEMENT D'UNE SOURCE XENOGENIQUE D'ILOTS DE LANGERHANS

# I. INTRODUCTION

Les progrès rapide de la lutte contre le rejet immunitaire permettent d'envisager dans l'avenir la possibilité de greffer des tissus animaux chez l'homme (xenogreffe)[217]. Pour le traitement des diabétiques, la greffe d'îlots d'origine animale permettrait de disposer d'une source illimitée de tissu endocrine.

# I.1. La xénogreffe

La faisabilité de la transplantation chez l'homme d'organes xénogéniques a déja été démontrée par la survie transitoire d'organes de singe (rein, coeur et foie) observée après leur transplantation chez quelques patients[217]. Le plus souvent cependant, la greffe d'un organe d'origine animale s'accompagne d'une intense réaction de rejet chez le receveur qui conduit à la destruction rapide du greffon. Cette réaction immunitaire ou rejet hyper-aigu est due à la présence dans le sérum humain d'anticorps préformés, dirigés contre les antigènes glycosylés de type  $Gal\alpha(1,3)Gal$ présents à la surface de l'endothélium vasculaire dans la plupart des espèces animales[218]. La greffe de cellules isolées ou des îlots de Langerhans devrait donc en théorie éviter la réaction de rejet hyper-aigu. De nombreuses approches expérimentales ont déja permis d'obtenir la survie prolongée d'îlots xénogéniques discordants. L'immunomodulation des îlots humains par la culture à basse température[219] ou le traitement par des anticorps dirigés contre les molécules du CMH[220] et les molécules d'adhésion[221,222] permet leur survie prolongée chez la souris. L'immunosuppression du receveur par des immunoglobulines antilymphocytaires permet également des résultats similaires[219,223,224]. Plus récemment, la survie prolongée d'îlots foetaux porcins a pu être montrée par la sécrétion de C-peptide porcin et l'analyse histologique transplantation patients diabétiques plusieurs mois après leur chez des immunosupprimés[225,226].

# I.2. Pancréas bioartificiel

Une autre approche permettrait l'utilisation d'îlots d'origine animale, sans nécessiter d'immunosuppression chez le receveur. Elle consiste à protéger les îlots du système immunitaire par une membrane semi-perméable laissant passer l'oxygène, le glucose et l'insuline, mais bloquant les cellules immunitaires, les immunoglobulines et la plupart des lymphokines. Différentes solutions techniques sont envisageables pour réaliser de tels pancreas bioartificiels[65]. L'utilisation d'un dispositif vascularisé implantable, relié à la circulation générale[227], permet la survie prolongée des îlots[228] mais le risque de complications thrombotiques limite son application clinique. Les îlots peuvent également être inclus individuellement dans une capsule synthétique (microencapsulation). Initialement décrite par Sun avec des capsules à base d'alginate et de polylysine, l'encapsulation des îlots permet leur fonction prolongée in vitro et in vivo[229]. La transplantation des îlots encapsulés dans la cavité abdominale permet la correction prolongée de la glycémie chez des rongeurs diabétiques[230]. Elle permet aussi de protéger les îlots de la réaction immunitaire allogénique et autoimmune[231]. voire de la réaction xénogénique contre des îlots d'espèces concordantes[232] ou discordantes[233]. Ces résultats ont pu être reproduits chez le chien[234] et récemment chez l'homme[235] avec des îlots allogéniques, mais un traitement immunosuppressur a dans ce cas été nécessaire pour prévenir la réaction inflammatoire. L'encapsulation des îlots dans une macrocapsule constitue une autre alternative. Initialement décrite par Altman avec des cellules tumorales humaines[236], la macroencapsulation permet la correction de la glycémie par la greffe d'îlots xénogéniques chez des rongeurs rendus diabétiques par la streptozotocine[237,238] ou spontanément diabétiques[239]. Les résultats encourageants obtenus avec cette technique après la greffe d'îlots allogéniques sans immunosuppression chez le chien[240] et plus récemment chez l'homme[66], permettent d'envisager son application pour le traitement du diabète par la transplantation avec des îlots d'origine animale.

# I.3. Choix de l'espèce porcine

On peut envisager l'utilisation de différentes espèces en vue de la production d'îlots de Langerhans à grande échelle. L'isolement des îlots a pu être maîtrisé chez de nombreuses espèces de rongeur comme le rat, le hamster, la souris, ou le lapin mais leur utilisation pour l'application clinique apparaît difficile en raison de leur taille et des caractéristiques spécifiques de la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  de rongeur[241]. L'isolement a également été décrit chez certains poissons[242] et chez les grands mammifères comme le singe[243], le chien[90], le boeuf[244] ou le porc[245]. Les primates constituent en théorie le meilleure idéal d'îlots xénogéniques pour la transplantaion chez l'homme, mais leur utilisation se heurtent à des considérations pratiques et éthiques difficilement surmontables. Parmi les autres grands mammifères, le porc apparaît comme le candidat idéal. C'est un animal omnivore dont l'anatomie et l'histologie pancréatiques se rapprochent de celles de l'homme. La glycémie à jeun du porc est voisine de celle de l'homme[246] et l'insuline porcine qui ne diffère de l'insuline humaine que d'un acide aminé est utilisée depuis plusieurs décennies pour le traitement des patients diabétiques. Le porc est de plus un animal domestique dont l'élevage industriel est parfaitement maîtrisé et peut s'effectuer dans des conditions évitant la contamination par des germes pathogènes. Enfin, les progrès récents des techniques de transgénèse laisse entrevoir la possibilité de manipuler certaines souches de porc en vue de la transplantation chez l'homme[217].

# I.4. Isolement des îlots porcins

Chez le porc, les îlots de Langerhans ne sont pas nettement séparés du tissu exocrine par une capsule de fibres collagènes comme chez le rongeur, le chien, et dans une moindre mesure chez l'homme[139]. Leur architecture est également plus irrégulière[157] et ils se présentent rarement sous la forme d'amas cellulaires sphériques, compacts, retrouvés dans les autres espèces. Ces

caractéristiques morphologiques spécifiques rendent la maîtrise de l'isolement des îlots particulièrement délicate chez le porc.

En 1974, Sutherland a été le premier à utiliser une modification de la technique d'isolement d'îlots de rat pour isoler les îlots porcins par digestion enzymatique et trituration et réaliser mais sans succès des autogreffes d'îlots chez le porc[247]. Une technique de microdissection a également été utilisée par Kiviluoto pour l'isolement des îlots de porc sans résultats convaincants[248]. En 1983, Wise a réussi à démontrer la fonction in vitro des îlots de porc après isolement par une méthode mécanique non enzymatique[249]. En 1986, Ricordi a décrit une nouvelle technique dérivée de celle utilisée par Horaguchi chez le chien[90] pour isoler les îlots de pancréas de porcs adultes prélevés à l'abattoir[92]. Cette technique comprenait la distension du pancréas par la collagénase injectée dans le canal de Wirsung, suivie d'une phase de digestion stationnaire à 37°C puis de filtration et de purification dans un gradient de Ficoll. Elle a permis d'obtenir 80 000 îlots (1270 îlots par gramme) dont la fonction a pu être démontrée in vitro et in vivo après transplantation chez des souris immunodéprimées[250]. Marchetti[251] l'a par la suite simplifiée mais sans en améliorer les résultats. Hesse en utilisant une technique de perfusion continue sans purification[252,253]a pu obtenir 60 à 300 000 îlots et confirmer leur fonction in vivo par l'autotransplantation après pancréatectomie. En 1990, Ricordi a adapté la technique automatisée initialement décrite pour l'isolement des îlots humains[44] pour l'isolement des îlots de porc adultes[245]. Il a ainsi obtenu plus de 250 000 îlots purifiés et confirmé leur fonction par la guérison prolongée du diabète après transplantation chez la souris immunodéprimée. Bien que de nombreuses équipes étudiant l'isolement des îlots de porcs utilisent aujourd'hui une technique automatisée [254-264], les résultats quantitatifs décrits par Ricordi ont rarement pu être reproduits. De plus, contrairement au chien chez lequel l'autotransplantation des îlots purifiés permet la correction de la glycémie chez des animaux pancréatectomisés [265], la qualité des îlots porcins purifiés n'a pas encore pu être affirmée par la transplantation chez le gros animal.

# I.5. Objectif

Le but de cette étude était l'amélioration et la maîtrise de l'isolement des îlots de Langerhans porcins et la confirmation de la qualité fonctionnelle des îlots obtenus par la transplantation chez le porc.

# **II. MATERIEL ET METHODES**

#### II.1. Prélèvement du pancréas

Les pancréas ont été prélevés aux abattoirs de Hazebroucq (Nord) chez des porcs domestiques de race Large-White provenant d'élevages industriels de la région du Nord - Pas-de-Calais, de Belgique et des Pays-Bas. En accord avec les services vétérinaires, nous avons developpé une nouvelle technique de prélèvement permettant de limiter la durée de l'ischémie chaude du pancréas[266]. Le porc est abattu par décérébration mécanique à l'aide d'un mandrin métallique. Après désinfection de la paroi abdominale, une large laparotomie est effectuée. L'induction de la mort cérébrale par décérébration mécanique nous permet d'effectuer ces opérations à coeur battant. L'ensemble des viscères abdominaux sont prélevés stérilement et en bloc après section de l'aorte et la partie splénique du pancréas est rapidement disséqué ex-vivo du bloc viscéral (moins de 4 minutes). Afin de limiter les contaminations infectieuses, le pancréas est immédiatement plongée pour une durée de 2 minutes dans une solution de saline réfrigérée à 4°C contenant un agent anti-infectieux (Bétadine, 20%)[130]. La glande est alors conservée dans une solution de conservation (Eurocollins) à 4°C jusqu'à l'isolement.

#### II.2. Isolement des îlots porcins

En raison de la grande variabilité individuelle des caractéristiques des pancréas de porcs, deux pancréas sont généralement prélevés à l'abattoir. Un fragment de 1 mm d'épaisseur de chacun des pancréas est coloré avec de la dithizone et leur aspect est évalué qualitativement à l'aide d'une loupe binoculaire. Le pancréas dont les îlots apparaissent les plus nombreux et surtout les plus compacts, avec le plus de tissu exocrine, est utilisé pour l'isolement.

#### II.2.1. Isolement

L'isolement des îlots a été réalisé à l'aide d'une technique automatisée dérivée de celle de Ricordi[245] dont le principe est identique à celui de l'isolement des îlots humains décrit dans la première partie. Plusieurs modifications ont été nécessaires chez le porc. Seule la partie splénique du pancréas (100 à 130 g) est utilisée. La distension du pancréas était réalisée par l'injection dans le canal de Wirsung de 400 ml d'une solution de collagénase de type P (Boehringer Mannheim) dont la concentration variait de 1,4 à 1,7 mg/ml et contenant du CaCl<sub>2</sub> (3,7mM). Les caractéristiques des quatre lots de collagénase utilisés pour l'isolement des îlots porcins sont rapportées dans la table. La chambre de digestion était identique à celle utilisée pour l'isolement des îlots humains mais était utilisée sans le cylindre interne afin d'obtenir un volume interne de 400  $\mu$ l. La porosité du filtre utilisé dans la chambre de digestion était de 360  $\mu$ m. L'agitation mécanique de la chambre est réduite au minimum et n'est débutée que 9 minutes après la mise en place du pancréas distendu dans la chambre. La chambre est alors agitée manuellement 10 secondes chaque minute au cours de la digestion puis 20 secondes chaque minute au cours de la phase de récupération.

A l'issue de la digestion, et après trois lavages successifs dans une solution de Hanks contenant du SVF (10%), le digestat est resuspendu dans la solution de UW pendant 20 minutes, avant la purification.

## II.2.2. Purification

Un test de purification identique à celui décrit pour les îlots humains est réalisé avec les densités suivantes: 1.112, 1.1038, 1.097, 1.091, 1.081, 1.051, et solution de Hanks) pour déterminer la densité respective des îlots et du tissu exocrine. Comme pour les îlots humains, la purification de l'ensemble de la préparation était effectuée à l'aide du séparateur de cellules (COBE 2991, COBE, Lakewood, USA) avec les couches de séparation sélectionnées lors du test. Deux cycles de purification étaient nécessaires pour purifier l'ensemble de la préparation (environ 50 à 60 ml). Lorsque la qualité de la purification obtenue lors du test était jugée insuffisante, la préparation n'était pas purifiée.

# II.3. Evaluation des îlots

L'évaluation des îlots porcins après l'isolement a été réalisée avec la même technique que celle utilisée pour l'isolement des îlots humains décrite dans la première partie[133]. Les résultats quantitatifs après la digestion et la purification ont été exprimés sous la forme du nombre d'îlots et d'équivalents d'îlots de 150  $\mu$  de diamètre ou îlots-équivalents(IE). L'évaluation de la viabilité des îlots a été réalisée par coloration avec les colorants vitaux (coloration par le rouge neutre et exclusion du bleu trypan). La morphologie des îlots après l'isolement a été étudiée par l'analyse en immunohistochimie et en microscopie électronique, des îlots et après la purification.

La fonction in vitro des îlots porcins a été évaluée pour 13 manipulations après 1, 3, 7 et 14 jours de culture. Les îlots porcins ont été cultivés dans des inserts millicell (Millipore) (20 îlots par puit) dans du milieu HAMS F12 (Sigma, France) contenant du SVF(10%), de la nicotinamide (10 mM) (Sigma, France) et des antibiotiques[130]. Comme pour les îlots humains, la secrétion d'insuline a été mesurée au cours d'épreuves de stimulation dynamique par incubation statique (glucose 0,6g/l vs 5g/l) et l'insuline totale a été mesurée après lavage, sonication et extraction.

L'intérêt de la culture des îlots de porc dans des matrices tridimensionnelles a également été étudié. Après une nuit de culture, les îlots étaient centrifugés et resuspendus dans un gel de collagène de queue de rat (QR). La morphologie des îlots a été étudiée en immunohistochimie après incorporation de Bromodéoxyuridine (BrdU) selon la technique détaillée pour les îlots humains dans la 3ème partie.

# II.4. Autogreffe des îlots chez le porc

Afin d'affirmer la qualité des préparations d'îlots porcins obtenues par notre technique d'isolement et de purification, nous avons réalisé des études de transplantation chez le porc pancréatectomisé. L'autotransplantation a permis l'évaluation spécifique de la qualité des îlots en éliminant le risque de destruction immunologique du greffon chez le receveur.

# II.4.1. Greffe

Des miniporcs adultes (Elevage Denis, Templeuve, France) ont été pancréatectomisés et greffés avec leur propre îlots après isolement. Quatre animaux contrôles ont été pancréatectomisés mais n'ont pas reçu d'îlots. Les expérimentations ont été effectuées dans le cadre des installations agréées du service commun d'animalerie du CHU de Lille dans le strict respect de la législation sur l'expérimentation animale. Au début de l'expérimentation, un cathéter central tunnelisé était placé dans la veine jugulaire interne pour permettre les prélèvements sanguins répétés. La pancréatectomie totale était réalisée en veillant à respecter la vascularisation du pancréas jusqu'à l'ablation de la glande afin de limiter au maximum la durée de l'ischémie chaude[267]. Le pancréas était immédiatement plongé dans une solution d'Eurocollins à 4°C et conservé en hypothermie jusqu'à l'isolement. En fin d'intervention un catheter placé dans la veine porte était extériorisé sur le flanc de l'animal pour permettre l'injection intraportale des îlots. L'isolement et la purification des îlots ont été réalisées à l'aide de la technique décrite ci-dessus. Pour la greffe, la préparation d'îlots purifiée était resuspendue dans 50 ml de solution de type Hams F12 contenant de la sérum albumine porcine (0,5%) et 5000 unités d'héparine. Environ 5 heures après la pancréatectomie, les îlots isolés étaient injectés dans le foie par le cathéter portal.

# II.4.2. Suivi des animaux

Tous les animaux ont reçu un traitement quotidien par des extraits pancréatiques porcins pour limiter les conséquences de l'insuffisance pancréatique exocrine et une antibiothérapie systématique par voie intraveineuse (amoxycilline, 1g/j pendant une semaine). La glycémie à jeun était mesurée tous les jours pendant 6 semaines puis une fois par mois. Une épreuve de tolérance au glucose était réalisée avant la pancréatectomie puis une semaine, un mois et 3 mois après la greffe ou une semaine après la pancréatectomie. Après l'injection intra-veineuse de 0,5 g/kg de glucose (sérum glucosé 30%), un prélèvement était réalisé après 5 min, 15 min, 30 min, 60 min, 90 min et 120 min. Le coefficient de décroissance de la glycémie était calculé entre 5 et 90 min seon la technique de Lundbaeck [268]. Lors du sacrifice des animaux greffés, une biopsie hépatique a été prélevée et fixée dans le liquide de Bouin puis incluse dans la

paraffine pour son analyse immunohistochimique après marquage à l'aide d'anticorps antiinsuline.

.

•

# **III. RESULTATS**

# **III.1.** Isolement

Depuis mars 1992, nous avons réalisé 95 isolements d'îlots porcins. Vingt sept manipulations ont été nécessaires pour développer et maitriser les techniques automatisée d'isolement, et la purification à l'aide du séparateur de cellules. La figure représente les résultats quantitatifs exprimés en îlots-équivalents des 68 manipulations suivantes.

La technique de prélèvement à coeur battant nous a permis de réduire la durée de l'ischémie chaude à moins de 4 minutes et la durée de l'ischémie froide était comprise entre 2 et 4 heures. Nous avons utilisé quatre lots différents de collagénase dont les activités enzymatiques de collagénase, de protéase, de trypsine, et de clostripain sont détaillées dans la Table 8. La concentration utilisée était choisie en fonction de l'activité de collagénase du lot (voir discussion). Le temps de digestion a varié entre 25 et 61 minutes avec un temps moyen de 39(1) minutes. Les résultats quantitatifs sont décrits dans la Figure 6. Le rendement moyen obtenu avec les 68 pancréas était de  $634 \times 10^3$  îlots ( $343 \times 10^3$  IE) soit 5912 îlots/g (3383 IE/g) après la digestion.

llots équivalents



**Figure 6**: Résultats quantitatifs de 68 isolements consécutifs d'îlots porcins. Les résultats après la digestion et après la purification sont exprimés en équivalents d'îlots de 150  $\mu$  de diamètre. Le lot de collagènase utilisé est indiqué en haut du diagramme.

Le lot de collagénase est apparu comme un facteur déterminant pour la réussite de l'isolement et de la purification et la table 9 rapporte les résultats moyens obtenus avec chacun des lots. Le meilleur des quatre lots a été le lot 25. Avec cette collagénase, les îlots isolés étaient de plus grande taille et n'apparaissaient que peu fragmentés par la digestion. Le nombre d'îlots équivalents obtenus était significativement plus élevé ainsi que l'indice d'isolement (IE/îlots) (test de Fisher, p<0,05 vs lot 20, 30, 33).

 Table 8 : Caractéristiques des quatre lots de collagénase utilisés pour l'isolement des îlots porcins.

Enzymes	Lot (mg/ml <sup>*</sup> )						
	25(1,4)	20 (1,25)	33(1,1)	30(1,5)			
Collagénase <sup>b</sup>	2,2	2,3	2,37	2,25			
Clostripain <sup>c</sup>	80,8	30,8	23,2	6,4			
Proteases <sup>d</sup>	119	95	129	69			
Trypsin°	2,6	3,75	0,4	0,3			
Ratio							
protéases/collagènase	54	41	54	31			

a: concentration de la préparation de collagènase effectivement utilisée pour l'isolement. b: unité PZ: 1 unité est l'activité qui libère en 1 min à 25°C 1mmole 4 phenylazobenzyl-oxycarbonyl-L-propyl-L-leucine de 4-phenyl- azobenzyl-oxycarbonyl-Lpropyl-L-leucyl-glycyl-L-propyl-D-arginine (Wunsch unités). c: 1 unité catalyse l'hydrolyse d'1mmol N-a-benzoyl-L-arginine ethylester (BAEE) par min à 25°C et à pH 7,6 après une activation à l'acetate de calcium, 1mmol/L et dithiothreitol, 2,5mmol/L. d: 1unité est l'activité des protéases qui provoque une augmentation de l'absorption, de 0,001 en 1 min à 25°C selon un test azocoll standard. e: avec le BAEE comme substrat: 1 unité est l'activité de l'enzyme qui hydrolyse une mmol de BAEE en 1 min à 25°C (pH 7,6).

Après digestion									
<u></u>	n	poids(g)	I x10 <sup>3</sup>	IE x10 <sup>3</sup>	I/g	IE /g	Indice <sup>d</sup>		
lot 25 lot 20 lot 33 lot 30	18 4 37 9	94(5) <sup>b,c</sup> 107(5) 114(3) 135(12)	687(86) 562(65) 594(59) 724(179)	576(79) <sup>a,b,c</sup> 196(38) 264(24) 268(37)	7616(961) <sup>b</sup> 5221(430) 5263(497) 5482(1250)	6611(1132) <sup>a,b,c</sup> 1800(283) 2320(208) 2001(288)	87(10) <sup>a,b,c</sup> 33(3) 46(3) 45(4)		
moy.(esm)	68	111(3)	634(45)	343(30)	5912(418)	3383(396)	56(4)		
95% inf 95% sup		104 117	543 724	282 404	5077 6748	2593 4173	48 65		
Après purific	cation								
	n		I x10 <sup>3</sup>	IE x10 <sup>3</sup>	I/g	IE /g	Indice <sup>d</sup>		
lot 25 lot 20) lot 33 lot 30	16 4 32 5		281(43) 359(108) 418(52) 384(98)	214(39) 122(24) 164(21) 157(32)	3261(450) 3471(1132) 3759(458) 2667(628)	2608(505) <sup>b,c</sup> 1176(266) 1434(179) 1096(208	74(10) <sup>a,b,c</sup> 41(10) 37(3) 44(4)		
moy.(esm)	57		372(34)	175(17)	3503(299)	1716(188)	48(4)		
95% inf 95% sup			305 440	141 208	2903 4103	1338 2093	42 56		

Table 9 : Influence du lot de collagénase sur les résultats de l'isolement des îlots porcins.

.

Moyenne(esm). Test de Fisher. a: p<0,05 vs lot 20. b: p<0,05 vs lot 33. c: p<0,05 vs lot 30. d: indice d'isolement (nombre d'IE / nombre d'îlots x 100)

,

# **III.2.** Purification

Les couches du gradient choisies pour la purification après la réalisation du test étaient le plus souvent 1,112 /1,097(ou 1,091)/1,051/Hanks. La purification de l'ensemble de la préparation (Planche 6B) a été réalisée pour 57 manipulations. La pureté obtenue était comprise entre 75 et 95% (Planche 6A). Le nombre moyen d'îlots obtenus après la purification était de  $372 \times 10^3$  îlots (175x10<sup>3</sup> IE) ou 3503 îlots/g (1716 IE/g). L'étape de purification a entraîné une perte d'environ 60% des îlots pour le lot 25 (au début de notre expérience de la purification), de 30% pour le lot 20 et 33, et de 50% pour le lot 30. Le nombre d'îlots par gramme de pancréas obtenu après purification était supérieur avec le lot 25, mais l'augmentation de la masse du pancréas utilisé nous a permis de maintenir le nombre d'îlots total obtenu avec les autres lots de collagénase.

# III.3. Evaluation des îlots

L'étude des préparations d'îlots porcins isolés en microscopie optique et électronique a fait l'objet d'un mémoire spécifique (Marie-Christine Vantyghem, DEA des Sciences de la Vie et de la Santé, Lille, 1994) dont les résultats ne seront pas détaillés dans cette thèse. Comme pour les îlots humains, l'évaluation morphologique en microscopie optique des îlots porcins a permis de confirmer leur nature endocrine grâce à l'immunohistochimie.

La fonction des îlots a été confirmée in vitro par la mesure de la sécrétion d'insuline après stimulation par le glucose. Après une nuit de culture, la sécrétion d'insuline était stimulée par le glucose (Figure 6), et l'indice de stimulation (sécrétion stimulée/moyenne de la sécrétion basale avant et après stimulation) variait de 1,2 à 3,59 avec un indice moyen de 1,74(0,21) (Figure 7). Après 3 jours de culture en suspension, les îlots étaient encore intacts et l'indice de stimulation était légèrement augmenté à 2,14(0,36). A partir de 7 jours, la morphologie des îlots en suspension s'altérait progressivement et, après 14 jours de culture, ils apparaissaient nettement dissociés. (Planche 7D ). Cette altération morphologique s'accompagnait d'une diminution de la sécrétion basale et de la stimulation de la sécrétion d'insuline par le glucose. L'indice de stimulation moyen après 14 jours était de 1,32(0,34).



**Figure 7**: Sécrétion d'insuline au cours d'une stimulation par le glucose (incubation statique) par les îlots porcins cultivés dans le Hams F12 contenant du SVF (10%). Les îlots ont été incubés pendant 3 heures dans du milieu Krebs Ringer Bicarbonate contenant du glucose (3,3 mM pendant 60 min., 25,6 mM pendant 60 min puis 3,3 mM pendant 60 min). Moyenne (esm) de 13 manipulations. \*: p<0,05, test de fisher, 25,6 mM vs 3,3 mM.



**Figure 8**: Indice de stimulation de la sécrétion d'insuline au cours d'une épreuve d'incubation statique (sécrétion stimulée/sécrétion basale) par les îlots porcins dans le Hams F12 contenant du SVF (10%). Les îlots ont été incubés pendant 3 heures dans du milieu Krebs Ringer Bicarbonate contenant du glucose (3,3 mM pendant 60 min., 25,6 mM pendant 60 min puis 3,3 mM pendant 60 min). Moyenne (esm) de 13 manipulations.

L'insuline totale contenue dans les îlots était diminuée de 10% après 3 jours de culture, de 40% après 7 jours et de 80% après 14 jours (Figure 8).





**Figure 9**: Insuline totale contenue dans les îlots porcins cultivés dans le Hams F12 contenant du SVF (10%). Moyenne (esm) de 13 manipulations.

La culture des îlots dans une matrice tridimensionnelle de collagène de queue de rat nous a permis de préserver leur morphologie (Planche 7B) et l'incorporation de BrdU après 14 jours a montré la prolifération de quelques cellules au sein des îlots (Planche 7C).

## **III.4.** Autogreffe

Lors des études de greffe, les couches retenues pour la purification ont été 1,112 /1,1038/1,051/Hanks afin de privilégier le rendement. La technique d'isolement a permis d'obtenir 277(45) x10<sup>3</sup> IE/pancréas avec une pureté comprise entre 50 et 75%. La quantité d'îlots transplantés était égale à 7640(630) IE/kg. Dans le groupe de contrôle, les porcs pancréatectomisés étaient tous hyperglycémiques et polyuriques dès le lendemain de la pancréatectomie (glycémie à jeun > 3.0 g/l). A partir d'une semaine, leur état clinique s'altérait rapidement avec en particulier un amaigrissement important. Tous ont été sacrifiés avant le quinzième jour lorsque leur poids avait diminué de plus de 30% (Figure 9). Un animal greffé est décédé 4 jours après la greffe d'une complication de la pancréatectomie; son autopsie a montré une occlusion mécanique de l'intestin grêle par incarcération dans une brèche mésentérique. Les trois autres porcs greffés sont devenus normoglycémiques à jeun entre une et trois semaines après la greffe. La tolérance au glucose s'est améliorée progressivement avec le temps (Figure 10). Le coefficient de décroissance du glucose au cours de l'IVGTT entre 5 et 90 rm (Table 10) bien que non normalisé était significativement amélioré chez les **a**nimaux greffés après un mois (p<0,05, test t de Student vs pancréatectomisés).

Chez un porc greffé, le cathéter a été laissé en place et a permis la mesure simultanée de l'insuline dans la veine cave (max. :  $43 \mu UI/ml$ ) et la veine porte (max. :  $23 \mu UI/ml$ ) au cours de l'IVGTT après une semaine (Figure 12), démontrant le site hépatique de la sécrétion d'insuline. Malgré le traitement substitutif par des extraits pancréatiques les animaux greffés ont lentement mais inexorablement maigri. II ont dû être sacrifiés en raison d'un amaigrissement supérieur à 30% de leur poids initial après 4, 5 et 6 mois. L'analyse histologique du foie lors du sacrifice a montré la présence d'îlots intacts implantés au niveau des espaces portes et marqués par immunohistochimie à l'aide d'anticorps anti-insuline (Planche 8).



**Figure 10**: Evolution de la glycémie à jeun et du poids après pancréatectomie, avec ou sans une autotransplantation intra-portale des îlots.( $\dagger = décès$ ). Une porc autogreffé est mort au bout de 4 jours de greffe, suite à une obstruction mécanique intervenue lors de l'intervention.

Table 10 : Coefficient de décroissance du glucose au cours d'une IVGTT (0,5 g/kg)

	pancréatectomie (n=4)	autogreffe (n=3)				
avant	1,75((	1,75(0,31)				
1 semaine 1 mois 3 mois	0,44(0,08)	0,48(0,02) 0,94(0,29)* 0,83(0,33)*				

\*: p<0,05, test t de Student bilatéral non appareillé vs pancréatectomisés.



**Figure 11**: Décroissance de la glycémie après une injection intraveineuse de glucose (0,5 g de Glc/kg) chez les porcs normaux, une semaine après la pancreatectomie et 1 et 3 mois après l'autogreffe des îlots.



**Figure 12**: Chez un porc, le cathéter dans la veine cave a été laissé en place, permettant le dosage simultané de l'insuline dans le veine jugulaire et dans la veine porte pendant l'IVGTT, après une semaine (0,5g glc/kg) démontrant la source hépatique de l'insuline secretée.

# **IV. DISCUSSION**

# **IV.1.** Isolement

#### IV.1.1. Rendement de l'isolement

Malgré les caractéristisques histologiques du pancréas de porc défavorables pour l'isolement des îlots, les techniques de digestion enzymatique par la collagénase et de purification par séparation isopycnique ont permis à plus d'une dizaine d'équipes d'obtenir des préparations d'îlots porcins purifiés (Table 11). L'utilisation de la technique automatisée de digestion et la maîtrise progressive de ces techniques nous ont permis d'obtenir des résultats quantitatifs comparables à ceux de la littérature.

Bien que l'isolement des îlots de porcs apparaisse aujourd'hui possible, cette technique n'est toujours pas standardisée et ses résultats varient de façon importante d'une équipe à l'autre. Malgré les tentatives de standardisation de l'évaluation de l'isolement chez les gros mammifères[133], l'expression de résultats différent d'une étude à l'autre rendant extrêmement difficile la comparaison des résultats. En particulier, seul le nombre brut d'îlots est parfois rapporté et il ne rend compte que très approximativement du volume réel de tissu endocrine[269,270]. En raison de la fréquente fragmentation des îlots porcins au cours de l'isolement, l'expression des résultats sous la forme d'une unité standardisée rendant compte du volume réel obtenu apparaît indispensable. L'unité habituellement utilisée est l'îlot-équivalent qui est calculé en fonction du diamètre observé des îlots en considérant sa forme sphérique[133]. Chez le porc, la forme oblongue et souvent aplatie des îlots entraîne malgré l'utilisation pour le calcul du nombre d'îlots-équivalents de la moyenne de deux diamètres perpendiculaires, une probable surestimation du volume réel[262].

Dans notre expérience comme dans celle des équipes ayant décrit les résultats d'un nombre important de manipulations consécutives, les résultats sont souvent encore aléatoires et varient d'une manipulation à l'autre. De nombreux facteurs peuvent expliquer ces variations.

.

•

Après digestion

Equipe	année	n	méthode	îlots x10 <sup>3</sup>	îlots / g	IE x10 <sup>3</sup>	IE /g	indice <sup>c</sup>
Saint-Louis[92]	1986	10	MNA	79	1251	_	-	-
Pise[251]	1988	10	MNA	6	400	-	-	-
Milan[271]	1990	15	AM	690	10390	405	6098	0.60
Saint-Louis[272]	1991	10	AM	374	6515	282	4903	0.68
Giessen[264]	1991	8	AM	209	-	-	-	-
Worcester[270]	1993	6	MNA	-	31380	-	9952	0.31
Leicester[256]	1993	7	AM	-	4014	-	5875 <sup>d</sup>	1.46
Paris[260]	1993	4	AM	301	-	-	-	-
Pise[273]	1994	10	MNA	-	3982	-	3424	0.85
Los Angeles II[274]	1994	10	AM	220	3415	335	5146	1.55
Kiel[257]	1994	12	AM	-	6795	-	-	-
Philadelphie[263]	1994	8	AM	-	-	-	2537	-
Genève[261]	1994	100	AM	149	-	-	-	-

# Après purification

Equipe	année	n	méthode⁵	îlots x10 <sup>3</sup>	îlots / g	IE x10 <sup>3</sup>	IE /g	pureté (%)
Saint-Louis[92]	1986	10	F	78	1270	-	-	20-80
Milan[271]	1990	15	F	341	5157	166	2570	90
Saint-Louis[254]	1991	10	EF	299	5203	204	3551	90
Giessen[264]	1991	6	F	62	-	_	•	80
Los Angeles I[274]	1992	24	SA	61	3925	-	1710	-
Paris[260]	1993	4	UWH	147	-	-	-	95
Los Angeles II[258]	1994	10	F	60	1244	-	-	95
Kiel[275]	1994	39	EF	-	1190	-	-	-
Pise[273]	1994	10	Н	115	2986	98	2558	80
Omaha[151]	1994	5	EF	214	3348	45	702	50-95
Genève[261]	1994	100	EF	89	2590	-	-	90

a: type de méthode utilisée pour la digestion du pancréas (MNA: méthode non automatisée. MA: méthode automatisée). b: type de gradient utilisé pour la purification (F: Ficoll). d: Indice d'isolement (nombre d'îlots / nombre d'îlots équivalents x 100)
#### IV.1.2. Caractéristiques du donneur

Les caractéristiques de l'animal jouent certainement un rôle primordial. L'importance de l'âge de l'animal donneur pour la réussite de l'isolement des îlots a été démontrée[275,276] et la grande majorité des études ont été réalisées avec des pancréas de porcs adultes. Chez les animaux âgés de plus de deux ans et pesant au moins 200 kg, les îlots de Langerhans sont mieux délimités du tissu exocrine par la présence d'une lame de tissu conjonctif qui facilite leur isolement[157]. Plus récemment, quelques équipes ont également décrit des techniques moins traumatiques pour l'isolement des îlots à partir de pancréas prélevés chez des porcs plus jeunes [273,274] en prévision de l'application à grande échelle de l'isolement des îlots porcins. Les caractéristiques génétiques des porcs utilisés sont probablement responsables au moins en partie de ces variations et le développement de races spécifiques pour l'isolement des îlots sera déterminant pour son application industriel. Dans nos régions, les porcs domestiques sont généralement de race Large-White, Landrace ou Pietrin mais le plus souvent proviennent de souches hybrides multiples dont les caractéristiques varient avec chaque élevage. Dans notre expérience, les résultats varient de façon importante y compris au sein d'un même élevage ; la provenance ou les conditions d'élevage ou de transport des animaux ne sont pas apparues déterminantes pour le résultat de l'isolement. Malgré le nombre important d'expériences effectuées, nous n'avons pas été en mesure de dégager des critères cliniques de sélection, en dehors de l'âge et de la morphologie des porcs : les porcs de grande taille, âgés de plus de deux ans et présentant un morphotype non obèse nous semblent donner les meilleurs résultats. Cette importante variation individuelle des résultats quantitatifs de l'isolement des îlots de porcs constitue un obstacle important pour l'utilisation de cet animal. Afin d'optimiser les résultats de l'isolement et d'éviter les échecs complets, particulièrement frustrants, il semble pour l'instant indispensable de sélectionner individuellement les pancréas en fonction de leur caractéristiques histologiques. En effet, le nombre et la forme des îlots dans le pancréas des porcs adultes sont extrêmement variables d'un animal à l'autre. Le test rapide après coloration d'une tranche de section prélevée au niveau de l'isthme par la dithizone, et l'examen à la loupe binoculaire que nous utilisons, permet une sélection rapide du meilleur pancréas parmi deux ou trois animaux. L'utilisation de la congélation

dans l'azote liquide permettrait si nécessaire la section fine et l'analyse microscopique extemporanée des pancréas.

#### IV.1.3. Conditions du prélèvement

Les conditions de prélèvement sont également déterminantes. La perfusion in situ n'apparaît pas souhaitable[158] et semble incompatible avec les conditions de l'abattage industriel. Par contre la réduction au minimum de la durée de l'ischémie chaude est indispensable. Son rôle délétère au cours des prélèvements d'organes est bien connu et son retentissement sur le rendement de l'isolement des îlots de porc a déja été mis en évidence[158]. Habituellement, l'abattage industriel des porcs s'effectue par un arrêt cardiocirculatoire induit par un choc électrique. Dans ces conditions, pendant tout le temps nécessaire à l'installation du porc, la laparotomie et le prélèvement pancréatique, soit au minimum 15 minutes, le pancréas se trouve en état d'ischémie chaude. Notre méthode d'abattage des animaux par induction de la mort cérébrale nous a permis d'utiliser des porcs d'abattoir en réduisant de façon considérable la durée de l'ischémie chaude.

#### IV.1.4. Technique d'isolement

La digestion enzymatique par la collagénase peut être réalisée par différentes techniques. Si les techniques manuelles de digestion enzymatique sont utilisables[92,251,277] en particulier pour les porcs plus jeunes[251,273], l'utilisation de la technique automatisée initialement décrite pour les îlots humains par Ricordi améliore les résultats quantitatifs de l'isolement des îlots porcins[256]. Il est cependant indispensable pour l'adapter au pancréas de porc de réduire au maximum l'agitation mécanique en raison de la fragilité extrême des îlots porcins[245]. Différentes modifications de cette technique ont été décrites mais ne semblent pas modifier de façon significative les résultats quantitatifs de l'isolement. L'effet bénéfique de l'utilisation d'une solution de type intra-cellulaire contenant des anions imperméants et un agent colloïde (solution UW) pour la conservation à 4°C du digestat avant la purification améliore les résultats de la

séparation isopycnique des îlots porcins[255,278]. Malgré l'effet théorique néfaste d'une haute concentration en potassium pour la survie des cellules à 37°C, l'utilisation de la solution UW pour l'ensemble des étapes de l'isolement y compris au cours de la phase de digestion a été décrite chez le chien[279]. Elle permet également d'obtenir des îlots porcins viables et stimulables in vitro[183,260]. L'utilisation d'une perfusion continue de la solution de collagènase associée à de l'élastase semble donner aussi de bons résultats[280]. L'injection canalaire de collagènase à 4°C immédiatement après le prélèvement[281] ou l'injection interstitielle de la collagénase ont également été proposées[263]. Quelques équipes continuent aussi d'utiliser une technique manuelle pour l'isolement des îlots mais obtiennent des résultats inférieurs[270,277].

#### IV.I.5. Collagénase

Plus encore que pour les îlots humains, les caractéristiques de la collagénase utilisée apparaîssent primordiales et la qualité de la digestion des îlots de porc est étroitement liée avec le lot de collagénase utilisé (Table 8). Les préparations commerciales de collagénase sont produites par un organisme vivant (Clostridium histolyticum.) et contiennent plus de 11 types de collagénase différents ainsi que de nombreuses autres enzymes (protéases, clostripain et trypsine)[172]. Leur composition est hautement variable d'un lot à l'autre. Parmi les différents composants des préparations de collagénase, la concentration de protéases [282-284] et surtout le ratio collagénase/protéases [285] semblent jouer un rôle important pour la qualité de la digestion pancréatique. Actuellement seule la confirmation empirique par la réalisation de plusieurs manipulations d'isolement permet d'affirmer la qualité d'un lot de collagènase. La possibilité d'une estimation théorique de la qualité des lots disponibles en fonction des caractéristiques de chaque lot serait cependant très intéressante. Nous avons donc comparé dans la Table 8 les caractéristiques des lots de collagénase utilisés avec celles du lot 25 qui dans notre expérience a donné les rendements les plus importants et la fragmentation des îlots la plus faible. Lorsque la concentration utilisée a été ajustée pour obtenir une concentration de collagènase dans la solution injectée de 2,2 U/ml. Les deux lots (25 et 33) qui ont eu la meilleure efficacité avaient un ratio protéases/collagénase identique de 54. L'importance de ce ratio entre les concentrations de collagènase et de protéases a déja été soulignée[285] et elle semble jouer un rôle important pour la

qualité de la digestion des îlots porcins. Récemment le rôle délétére pour l'isolement d'une concentration élevée de trypsine (>1,5 U/ml BAEE) a été également avancé et l'addition d'un inhibiteur de la trypsine à la solution de collagénase a été proposé[257]. Quelque soit le type de la collagénase utilisée, en raison des caractéristiques histologiques du pancréas porcin et l'absence de capsule nette autour des îlots, il apparaît difficile de dissocier les fibres interstitielles de collagène entourant l'îlot sans endommager également la membrane basale indispensable au maintien de la structure de l'îlot[286]. De nouvelles préparations enzymatiques doivent donc être développées spécifiquement pour l'isolement des îlots de porcs.

#### IV.2. Fonction in vitro des îlots porcins

Parallèlement à l'évaluation quantitative des résultats de l'isolement, il est indispensable de confirmer la qualité des îlots obtenus. L'analyse morphologique et immunohistochimique des îlots a confirmé leur nature endocrine et la préservation de l'ensemble des contingents cellulaires y compris les cellules  $\alpha$  situées à la périphérie des îlots et qui sont particulièrement exposées durant l'isolement.

La démonstration de la viabilité des îlots par les colorations vitales n'impliquent pas la conservation de leur fonction . Il est donc indispensable de la confirmer par des tests de stimulation de la sécrétion d'insuline in vitro. Bien que la périfusion soit utilisée par plusieurs équipes pour la réalisation de ces tests de stimulation, les résultats et la cinétique de la sécrétion d'insuline au cours de la perifusion sont très variables d'une étude à l'autre. Dans notre expérience la périfusion s'est révélée peu reproductible avec les îlots de porc. La souffrance mécanique induite au cours de la périfusion et la dissociation des îlots ont abouti fréquemment à une libération non spécifique d'insuline et à une très faible reproductibilité des résultats. Nous avons donc abandonné la périfusion au profit de l'incubation statique. L'utilisation des filtres Millicell[287] permet d'éviter tout traumatisme mécanique des îlots lors de l'échange des milieux et les résultats obtenus ( indice de stimulation moyen de 1,7 après 24 h de culture) sont comparables avec les résultats décrits dans la littérature avec les îlots porcins. Nous avons

retrouvé une augmentation de la réponse des îlots au glucose après quelques jours de culture (indice de stimulation moyen de 2,1 après 72 h de culture) comme cela a déja été montré avec les îlots humains[288] et porcins[289]. L'utilisation de différentes concentrations de glucose (de17 mM à 25 mM) est possible pour la stimulation in vitro des îlots porcins mais ne modifie pas les résultats[290]. La stimulation par le glucose des îlots porcins isolés est faible[291] et généralement inférieure à celle des îlots d'autres espèces[241] et en particulier des îlots humains. Il est probable que cette faible réponse des îlots porcins soit au moins en partie secondaire à une souffrance cellulaire. L'élévation de la sécrétion basale d'insuline in vitro pourrait réduire l'importance de la sécrétion lors d'une stimulation [291]. La perte des cellules  $\alpha$  à la périphérie des îlots au cours de l'isolement pourrait également contribuer à la réduction de la réponse des cellules  $\beta$  au glucose. En effet le glucagon participe à la régulation de la sécrétion d'insuline par l'intermédiaire de son action sur l'AMPc intracellulaire dans les cellules  $\beta$  [75]. Pipeleers a également montré la corrélation entre l'intégrité des îlots et en particulier des celulles  $\alpha$  avec la sécrétion d'insuline [74]. Isolées, les cellules b de rat sécrètent 30 fois moins d'insuline qu'au sein d'un îlot intact. La coculture avec des cellules  $\alpha$  ou l'addition de glucagon augmente la sécrétion des cellules  $\beta$  isolées d'un facteur 2 à 4[74]. Chez le porc, les cellules  $\alpha$  sont particulièrement exposées lors de l'isolement en raison de l'absence d'une capsule conjonctive péri-insulaire nette. Le rôle de leur disparition dans la faible réponse des îlots porcins au glucose a été confirmé par l'augmentation de la stimulation de la sécrétion d'insuline après l'addition de glucagon dans le milieu de culture[292].

En raison de la faible réponse des îlots de porc au glucose seul, de nombreuses équipes ajoutent systématiquement de la théophylline ou de l'arginine pour l'évaluation in vitro de leur fonction[241,254,293]. L'utilisation de ces agents stimulants permet d'explorer le versant sécrétoire de la sécrétion d'insuline mais ne rend pas compte de l'intégrité des transporteurs du glucose à la surface des cellules  $\beta$ [287].

#### IV.3. Culture des îlots porcins

La fragilité et la faible cohésion des cellules constituant les îlots de porc rendent difficile leur culture prolongée. Comme nous avons pu le confirmer dans cette étude, la culture en suspension à 37°C des îlots porcins entraîne une dispersion progressive des cellules qui devient évidente après 7 jours de culture et s'accompagne d'une diminution du contenu et de la sécrétion d'insuline. Cette altération progressive de la fonction des îlots porcins est également obervée avec des températures de culture plus basses (24°C)[293,294]. La survie et la fonction des îlots porcins semblent pouvoir être prolongées jusqu'à 3 semaines par l'addition de sérum porcin au milieu de culture[295]. L'utilisation du milieu Ham's F12 à la place du RPMI 1640 enrichi en glucose (11mM) ou du CMRL 1066 semble améliorer également la réponse des îlots au glucose[203]. La culture des îlots porcins dans des matrices tri-dimensionnelles a été récemment proposé. L'alginate permet de prolonger la survie et la fonction des îlots de porc in vitro pendant 15 jours[296] voire 1 mois[297]. Nous avons également maintenu les îlots de porc intacts et viables jusqu'à au 6 semaines à 37°C dans le collagène, cependant malgré la préservation de la sécrétion basale, ces îlots n'étaient plus stimulables par le glucose seul.

Dans les cultures en trois dimensions, l'etablissement d'un indice de secretion dans ces matrices est compliqué par leur épaisseur et leur manque de diffusion. Une incubation statique, immediatement après la mise en culture, ne donne pas de stimulations comparables à celles observées pour les cellules isolées, même après 4 heures d'incubation dans chaque milieu. Ainsi nous avons mesuré la quantité totale d'insuline dans les îlots cultivés avec des supports differents, afin de trouver une perte après 7 jours qui était maintenue stable après 14 jours. Schrezenmeir et al[297] propose une periode d'incubation de 24 heures, laquelle merite une investigation dans notre modèle d'îlots en trois dimensions.

#### IV.4. Fonction in vivo après transplantation

La viabilité et la fonction des îlots isolés sont au mieux affirmés par la transplantation in vivo et la correction de la glycémie chez des animaux diabétiques[133]. Quelques équipes ont déja obtenu la guérison de rongeurs diabétiques immunodéprimés par la greffe d'îlots de porc sous la capsule

rénale (souris traitées par anticorps anti lymphocytaire[298], rats ou souris nudes nu/nu[245,250,262,273] et souris SCID[256] rendues diabétiques par la streptozotocine). Cependant la quantité d'îlots nécessaire pour obtenir la correction de la glycémie est généralement considérable. Elle varie selon les études de 1000 à 4000 IE[262] par souris soit de 30 000 à plus de 100 000 IE/kg. La greffe chez un gros animal constitue une confirmation beaucoup plus convaincante de la bonne fonction des îlots isolés en raison des contraintes quantitatives imposées par le poids du receveur, mais elle a rarement été étudiée. Chez le porc, la survie prolongée des îlots n'a jamais pu être démontrée après une allogreffe même en utilisant plusieurs donneurs. La normoglycémie du receveur est inconstante et ne dépasse pas quelques jours [264,299]. La réimplantation des îlots après l'isolement chez un porc pancréatectomisé permet l'étude sélective de la qualité des îlots en dehors de toute réaction immunitaire. Quelques équipes ont déja réalisé des autogreffes d'îlots chez des porcs pancréatectomisés mais n'ont le plus souvent pas réussi à démontrer la fonction des îlots isolés en raison de la trop faible quantité transplantée[247,248,274]. La transplantation intrasplénique de préparations non purifiées a permis à Hesse de corriger la glycémie pendant plusieurs mois chez des porcs pancréatectomisés[252]. Mellert a également montré que la transplantation intraportale d'îlots purifiés pouvait permettre la survie prolongée et la correction partielle de la glycémie après pancréatectomie[300]. Dans cette étude l'utilisation de miniporcs adultes, âgés de plus de deux ans, nous a permis d'obtenir des résultats quantitatifs après purification compatibles avec les impératifs de la transplantation (> 200 000 IE). La transplantation d'environ 7000 IE/kg a entraîné la normalisation de la glycémie à jeun des porcs pancréatectomisés pendant plus de 4 mois. L'amélioration progressive de la fonction des îlots dans les premières semaines est couramment observée après une greffe d'îlots chez l'homme, et elle a déja été décrite avec les îlots de porcs chez la souris nude[262]. Lorsque les animaux ont été sacrifiés en raison de leur insuffisance exocrine, ils étaient toujours normoglycémiques et la présence des îlots dans le foie a pu être démontrée par l'étude histologique. La fonction prolongée des îlots de porc in vivo après autotransplantation nous a permis d'affirmer la qualité des préparations d'îlots obtenues après l'isolement et leur fonction.

#### **V. CONCLUSION**

En conclusion, l'isolement des îlots de porcs est possible avec une technique automatisée de digestion enzymatique . La correction de la glycémie chez des porcs pancréatectomisés après autotransplantation nous a permis de confirmer la qualité des îlots obtenus par cette méthode Cependant, les résultats quantitatifs de l'isolement obtenus avec les porcs domestiques restent imprévibles et l'extrème fragilité des îlots porcins limitent encore leur utilisation. La sélection de races porcines spécifiques pour l'isolement et l'optimisation des techniques de culture par exemple à l'aide de matrices tri-dimensionnelles, semblent nécessaires avant de pouvoir envisager l'utilisation des îlots porcins pour la réalisation de pancréas bio-artificiel chez les patients diabétiques.

## **PLANCHES**

Isolement et purification des îlots porcins (barre=80µm).

A : Ilots porcins colorés par la dithizone après la purification.

B : Avant la purification, les îlots colorés en rouge par la dithizone ne représentent que 2% du tissu pancréatique digéré.



Ilots porcins en culture

A : Après une nuit de culture en suspension (Ham's F-12 contenant 10% SVF) démontrant l'aspect fréquemment dissocié (en bas) des îlots de porc. Quelques cellules endocrines isolées se trouvent déjà dans le milieu (barre =  $25 \mu m$ ).

B : Après 5 jours de culture dans une matrice tridimensionnelle de collagène de queue de rat les îlots apparaissent toujours sphériques et compacts. On note la présence de quelque fibroblastes dan la matrice (barre =  $100 \mu m$ ).

C : Coupe histologique des îlots porcins cultivés en collagène de queue de rat pendant 14 jours. Immunomarquage de la bromodéoxyuridine (noyau marron) (barre =  $10 \mu m$ , hématoxyline).

D : Coupe histologique des îlots porcins cultivés 14 jours en suspension dans le Hams-F12 montrant leur dispersion progressive (les îlots ont été inclus dans de la colle biologique avant la fixation dans le Bouins et l'inclusion dans la paraffine). Immunomarquage de la somatostatine (barre =  $10 \mu m$ , hématoxyline).



Coupe histologique d'une biopsie hépatique prélevée lors de l'autopsie, 5 mois après une autogreffe d'îlots chez un porc pancreatectomisé dont la glycémie était normalisée. L'immunomarquage pour l'insuline montre la présence d'un îlot au sein d'un espace porte.

A : (barre =  $100\mu m$ , hématoxyline), B : (barre =  $25 \mu m$ ).



Troisième partie :

# NEOFORMATION IN VITRO DE CELLULES HUMAINES SECRETRICES D'INSULINE

#### I. INTRODUCTION

La transplantation de tissu endocrine pancréatique allogénique permet la correction de la glycémie chez des patients diabétiques immunosupprimés. Actuellement, le faible rendement de l'isolement des îlots à partir de pancréas de cadavres impose le plus souvent l'utilisation de plusieurs donneurs. Dans le contexte actuel de pénurie des organes humains disponibles, la possibilité d'augmenter in vitro la masse des îlots isolés ou d'induire la néoformation de cellules endocrines humaines sécrétant de l'insuline constituerait un progrès considérable.

#### I.1. Lignées cellulaires sécrétrices d'insuline

L'isolement et la greffe des cellules  $\beta$  pancréatiques explorée par Pipeleers[301], ne semble pas offrir d'avantage par rapport à la greffe des îlots. Les cellules  $\beta$  ne prolifèrent pas *in vitro* et l'approvisionnement en cellules humaines obtenues à partir de pancréas de cadavres restera, comme pour les îlots humains, un facteur limitant insoluble. Le développement de lignées cellulaires continues et stables de cellules sécrétrices d'insuline, pourraient, par contre, constituer une alternative intéressante. Si elles pouvaient rester stimulables par des concentrations physiologiques de glucose, ces cellules représenteraient une source séduisante de tissu endocrine pour la transplantation chez les patients *diabétiques*[302,303]. Les cellules tumorales humaines provenant d'insulinomes peuvent synthétiser de l'insuline *in vitro*, mais elles ne répondent pas ou faiblement au glucose[236,304]. Leur sécrétion d'insuline n'est pas régulée et la transplantation de ces cellules chez le rongeur s'accompagne d'hypoglycémie[236]. En théorie, la manipulation génétique de lignées cellulaires, grâce aux récents progrès de la biologie moléculaire, pourrait permettre l'induction d'un mécanisme de régulation de la sécrétion d'insuline[305]. En pratique, cette éventualité reste encore très incertaine en raison de la complexité du processus de contrôle de

la sécrétion de l'insuline[303]. Certains clones de cellules d'insulinome de rongeur (RIN) sont au moins en partie stimulables par le glucose mais perdent progressivement cette propriété au fur et à mesure de leur prolifération en culture[306]. Cette disparition de la stimulation est due à la diminution d'expression du transporteur de glucose (GLUT2) et de l'ARN messager de la glucokinase (enzyme limitante du métabolisme du glucose). La transfection de ces cellules avec le gène du GLUT2, permet de restaurer la réponse au glucose de ces cellules [303]. Des cellules hypophysaires sécrétrices d'ACTH ont également pu être transfectées avec les gènes de la proinsuline humaine et du GLUT2 (AtT-20ins). L'expression de ces gènes s'accompagne d'une sécrétion biphasique d'insuline humaine, en réponse à une très faible concentration de glucose[305]. Différents clones de cellules  $\beta TC$  ( $\beta$ -tumor cell) provenant de souris transgéniques, montrent une sécrétion régulée d'insuline en réponse à des concentrations infraphysiologiques de glucose[307]. La réduction de l'expression de l'hexokinase dans ces cellules BTC a également permis d'obtenir la stimulation de la sécrétion d'insuline par des concentrations de glucose physiologiques [302]. Il semble donc que l'expression conjointe et stable du GLUT2 et de la glucokinase, associée à la réduction de l'expression de l'hexokinase et du GLUT1, pourrait permettre à une lignée cellulaire une sécrétion d'insuline adaptée à la concentration du glucose. Malgré ces indéniables progrès, la fonction de telles cellules in vivo et leur capacité à normaliser la glycémie chez des animaux diabétiques restent encore à démontrer.

## I.2. La néogenèse de tissu endocrine pancréatique in vitro

L'induction de la prolifération in vitro du tissu endocrine humain disponible et la néoformation d'îlots, pourrait permettre l'augmentation de la masse de tissu disponible pour la transplantation. Deux mécanismes peuvent aboutir à l'amplification de la masse cellulaire, d'une part par l'augmentation de la taille des cellules (hypertrophie) dont l'application potentielle semble cependant limitée, et d'autre part par l'augmentation du nombre des cellules (hyperplasie). L'hyperplasie, qui apparaît comme la solution la plus réaliste pour obtenir l'amplification *in vitro* du tissu endocrine pancréatique humain, peut être envisagée par trois voies différentes : la

division ou la réplication de cellules différenciées préexistantes, la différenciation des cellules endocrines à partir d'une cellule souche précurseur, et, par la transformation ou transdifférenciation de cellules différenciées d'un autre type [308].

## I.3. Prolifération des cellules différenciées du pancréas endocrine humain

Les îlots de Langerhans adultes sont composés de cellules hautement différenciées dont l'activité mitotique est très faible [309]. Chez le rongeur, le renouvellement quotidien des cellules  $\beta$  qui est supérieur à 10% chez le foetus[310], est compris entre 3 et 10 % à la naissance[310,311], et diminue avec l'âge pour atteindre 0.5%[311] à 3% [312-314] à l'âge adulte. Les cellules  $\beta$  ne prolifèrent pas en culture dans les milieux liquides traditionnels. Quelques rapports dans la littérature font cependant état d'une prolifération des cellules  $\beta$ , en présence de prolactine et de lactogènes placentaires[315,316]. L'hormone de croissance est également mitogène pour les cellules  $\beta$  de rongeurs[207,317] mais, pour l'instant, peu d'effets ont pu être observés sur les îlots humains. Bien que le facteur de croissance des hépatocytes (HGF) semble pouvoir induire une prolifération des cellules  $\beta$  adultes humaines cultivées en monocouche [318], il n'a pas d'effet sur la croissance des îlots de Langerhans humains adultes cultivés en suspension[319]. La prolifération des îlots de rongeur a également été observée lors de la culture dans une matrice de collagène[320] ou en présence d'un facteur sécrété par l'épithélium canalaire pancréatique[321,322]. Au total, bien que l'amplification de la masse d'îlots soit devenue le thème de nombreux travaux expérimentaux, les techniques classiques de prolifération cellulaire à l'aide de facteurs de croissance, n'ont pas permis d'induire une augmentation significative de la masse de cellules endocrines pancréatiques humaines par hypertrophie ou hyperplasie[207].

#### I.4. Embryogenèse du pancréas endocrine humain

La compréhension du développement embryonnaire du pancréas et sa reproduction in vitro pourraient offrir de nouvelles perspectives pour l'induction de la néoformation de tissu endocrine.

Edouard Laguesse a été le premier à décrire le développement embryologique du pancréas à Lille en 1893[69,323,324]. C'est lui qui a, le premier, avancé que les îlots de Langerhans et les acini avaient pour origine commune l'épithélium canalaire: "La glande (pancréatique) de l'embryon est constituée d'un arbre creux indifférencié formé par un petit nombre de tubes pancréatiques primitifs sur lequel bourgeonnent et se différencient d'une part les îlots et d'autre part les acini"[325].



Figure 13: Embryogenèse du pancréas vue de profil et en coupe, d'après[326]. 1: Intestin primitif composé d'une monocouche cellulaire entourée de membrane basale; il n'existe alors que très peu de cellules mésenchymateuses. 2: Evagination dorsale de l'intestin primitif et accumulation de cellules mésenchymateuses. Les cellules à glucagon (dessinées en noir) apparaîssent au sein de la paroi épithéliale. 3: Le pancréas est maintenant bien distinct de l'intestion primitif et l'arbre canalaire s'organise en lobules. Les cellules endocrines forment des bourgeons (îlots primitifs). 4: Le nombre de digitations de l'arbre canalaire augmentent pour former le tissu exocrine et les canaux pancréatiques. (voir schéma 1)

Alors que l'origine neuroectodermique (dérivant de la crête neurale) du pancréas endocrine a longtemps été suspectée en raison des caractéristiques neurales des îlots[327], le point de départ embryologique des îlots et des acini est bien l'endoderme. La glande pancréatique dérive

initialement d'une évagination dorsale et ventrale de l'intestin primitif, formant ce que l'on appelle le diverticule primaire dorsal et ventral ou "anlagen" (encore appelé "primordia" ou "diverticula") au cours de la cinquième semaine de gestation chez l'homme. Cette évagination s'individualise progressivement pour donner naissance aux canaux pancréatiques. Les deux ébauches pancréatiques ventrale et dorsale se développent ensuite indépendamment pour former un réseau tubulaire autour de leur propre canal excréteur (canal de Wirsung et canal de Santorini). Elles fusionnent finalement au cours de la 7 semaine, l'ébauche pancréatique ventrale donnant la moitié inférieure de la tête du pancréas et l'ébauche dorsale donnant la moitié supérieure de la tête ainsi que le corps et la queue du pancréas.

Le développement du tissu pancréatique est la résultat d'interactions entre le mésenchyme et l'épithélium[328,329]. Avant l'étape d'évagination, l'épithélium de l'intestin primitif est constitué d'une seule assise cellulaire entourée d'une membrane basale et de quelques cellules mesenchymateuses (Figure 13). Au moment de l'évagination de l'ébauche dorsale, les cellules mésenchymateuses primitives situées autour de l'intestin et du pancréas, se différencient en fibroblastes pour former le stroma. Peu de temps après, les cellules endocrines de type  $\alpha$ , sécrétrices du glucagon, apparaissent dans l'épithélium de l'ébauche dorsale sous la forme de cellules protodifférenciées, exprimant les ARNm des protéines de la sécrétion exocrine et des hormones endocrines[330]. Grâce à la modification de l'axe de leur orientation lors de la division cellulaire, certaines cellules canalaires filles vont migrer de la lumière[326]. Au troisième mois, les cellules  $\alpha$  se rassemblent ainsi en amas, et forment de petits îlots bourgeonnant au niveau de l'épithélium canalaire. A la fin du troisième mois, les bourgeons qui contiennent des cellules  $\alpha$  et  $\delta$  (sécrétant de la somatostatine)[331], augmentent de taille en se répliquant entre eux. Parallèlement, le réseau canalaire s'organise et l'organisation en lobules du pancréas devient plus apparente. La répartition cellulaire dans les canaux se hiérarchise en fonction du niveau dans l'arbre canalaire, ce qui permet de distinguer, de l'amont vers l'aval, des cellules canalaires "intercalées" (intercalated), intralobulaires, interlobulaires et principales. Les acini commencent également à se développer et à s'organiser autour des lumières à la fin du troisième mois. Les canaux intercalés s'entourent d'acini, et les cellules qui les constituent deviennent

progressivement centroacineuses. Au début du quatrième mois, les cellules  $\beta$  qui apparaissent de façon d'abord dispersée dans l'épithélium intralobulaire puis intercalée, s'organisent sous la forme de noyaux compacts, s'entourant de cellules  $\alpha$  et  $\delta$  et renfermant peu de vaisseaux, pour former ce qu'on appelle les îlots primitifs. Au même moment, les granules de zymogène deviennent visibles dans les acini, bien que ceux-ci ne deviendront fonctionnels qu'à la fin du cinquième mois. Entre le cinquième et le sixième mois, les îlots perdent progressivement leur apparence compacte ("Mantelinsel") et les cellules  $\alpha$  se dégranulent alors qu'on observe une infiltration de lymphocytes[328]. A la naissance, la plupart de ces îlots de la première génération auront disparu. Les îlots, dits de deuxième génération qui persisteront après la naissance et à l'âge adulte, apparaissent à partir du quatrième mois et se forment à partir des cellules centroacineuses à l'extrémité toute proximale de l'arbre canalaire. Ils possèdent une structure moins compacte et sont sillonnés par de nombreux espaces vasculaires sinueux. L'ordre d'apparition des différents types de cellules endocrines dans les îlots sont  $\alpha$ ,  $\delta$  puis  $\beta$  et PP chez l'homme[332] et  $\beta$ ,  $\alpha$  (ou  $\alpha$  puis  $\beta$ ),  $\delta$  et PP chez le rongeur, mais il reste cependant controversé[326,333-335].



Schéma 1: Embryogenèse du pancréas

Parallèlement à la description de l'origine endodermique des îlots endocrines du pancréas et de leur développement à partir de l'épithélium canalaire, Laguesse avait également défendu une autre théorie, celle du balancement acino-insulaire. Cette théorie soutenait l'existence de formes de transition entre l'acinus et l'îlot, chaque groupe cellulaire passant successivement de l'état acineux à l'état d'îlot endocrine et réciproquement par une sorte de balancement régulier[323,336,337]. C'est ainsi que Laguesse expliquait la dégénérescence des îlots primaires provenant de l'épithélium canalaire et de l'apparition d'une seconde génération d'îlots issus d'une différenciation ou métamorphose des acini[324]. Cette idée était hautement controversée et Diamare, en 1895, affirmait la nature distincte et indépendante des tissus exocrine et endocrine du pancréas[338]. Elle a même rapidement été considérée comme complètement fausse [82,328] et les observations de structures de transition entre cellules exocrines et endocrines par Laguesse mises sur le compte de la mauvaise qualité du matériel utilisé. La réalité de ce balancement acinoinsulaire a pourtant été confirmé ultérieurement dans certaines conditions pathologiques. La transformation des cellules acineuses en cellules  $\beta$  par dédifférenciation, puis redifférenciation peut être induite par l'injection d'alloxan chez le rat[336] et le cobaye[339], l'ischémie du pancréas[340], ou l'injection de glucose[341]. L'observation de cellules de type transitionnel, contenant à la fois des granules de zymogène et de sécrétion endocrine, continue d'être régulièrement décrite dans la littérature [179,342-348]. Ce mécanisme de balancement et de transdifférenciation du tissu exocrine en cellules endocrines n'a cependant jamais pu être observé et il ne semble pas qu'il intervienne au cours de l'embryogenèse des îlots.

Les cellules endocrines dérivent donc de l'endoderme et prennent naissance lors du développement embryonnaire du pancréas au dépend de l'épithélium canalaire à partir de cellules souches épithéliales. Ces cellules souches se différencient puis prolifèrent en se regroupant pour former les îlots de Langerhans.

#### I.5. Réactivation à l'âge adulte de la voie embryonnaire de formation des îlots

Dès le début du siècle, la réactivation de cette voie embryonnaire à l'âge adulte a pu être démontrée chez l'animal après la ligature[325,349-351], la cautérisation[352] du canal de Wirsung, la pancréatectomie partielle[351], ou chez l'animal diabétique[353]. Ces conditions expérimentales provoquent toutes la régénération du pancréas par l'intermédiaire d'une différenciation de l'épithélium canalaire en îlots et en tissu exocrine, suivi d'une réplication des cellules pancréatiques différenciées, et aboutissent enfin à la néoformation d'îlots endocrines. Ces résultats qui reproduisent la voie embryonnaire de formation des îlots ont permis de conclure à la persistance dans le pancréas mature de cellules épithéliales canalaires capables de différenciation sous l'action de certains stimuli. En raison de ses implications potentielles pour le traitement du diabète insulino-dépendant, ce phénomène de néoformation d'îlots à l'âge adulte a été le sujet de nombreux travaux récents. Différents modèles expérimentaux ont permis de confirmer et de préciser les mécanismes de cette réactivation de la voie embryonnaire (voir schéma 2).





#### I.5.1. Ligature du canal pancréatique

Dès 1900, Schulze[349,351] a montré que lorsqu'on lie une partie des canaux pancréatiques chez le cobaye, le tissu exocrine dégénère alors que les îlots restent intacts. Ces résultats ont pu être répétés chez le lapin par Ssobloew[354] et par Laguesse et Gontier La Roche qui ont confirmé la persistance des îlots jusqu'à 3 mois après la ligature[350] et montrer la néoformation de nouveaux îlots sur le mode embryonnaire "Après l'atrophie des acini, l'arbre excréteur persiste reprenant dès le premier mois des caractéristiques embryonnaires analogues à ceux des tubes pancréatiques primitifs indifférenciés. Au deuxième mois, ces nouveaux tubes primitifs bourgeonnent comme chez l'embryon pour donner de nouveaux îlots primaires et de nouveaux acini avec réapparition de zymogène. Ces 'pseudo acini', donnent naissance à la deuxième génération d'îlots[325]".

Depuis, de nombreux autres investigateurs[350,354-357] ont confirmé la régénération des îlots qui s'observe après la ligature partielle du canal de Wirsung au sein d'une glande pancréatique, dont le tissu acineux est atrophié mais dont l'arbre canalaire reste intact et s'hypertrophie pour constituer rapidement les deux tiers du tissu pancréatique. La disparition des cellules acineuses semble s'expliquer par une mort cellulaire programmée ou apoptose[358]. L'expansion concomitante de l'épithélium canalaire pourrait provenir à la fois d'une dédifférenciation des cellules acineuses[359,360] et de la prolifération des cellules canalaires [356,357]. Les îlots néoformés se forment ensuite aux dépens de cet épithélium canalaire par différenciation[361]. Chez le chien la ligature du canal de Wirsung prévient le diabète après une pancréatectomie de 75%[362] Chez l'homme, la régénération des cellules endocrines observée après certains cas d'occlusion du canal pancréatique provoquée par un calcul bili**aire, un c**arcinome ou la mucoviscidose, s'accompagne d'une hypoglycémie (syndrome de Herxheimer-Mansfeld)[363].

#### I.5.2. La compression du pancréas

La compression de la tête du pancréas par le cellophane, décrite par Rosenberg et al.chez le hamster[364,365], aboutit à une fibrose des canaux pancréatiques principaux. Elle entraîne une obstruction partielle du canal, mais avec une réaction inflammatoire minime sans pancréatite. Après 5 jours, une prolifération des cellules centroacineuses peut être observée dans les canalicules proximaux et une néoformation d'îlots apparaît, après deux semaines, au niveau de ces canalicules[364]. Contrairement au modèle de ligature, cette régénération pancréatique ne s'accompagne d'aucune atrophie ni de nécrose du tissu pancréatique[365]. La compression du pancréas améliore sensiblement l'équilibre glycémique chez des rats rendus diabétiques par la streptozotocine[366]. Une substance appelée "Ilotropin" peut être extraite du pancréas en cours de régénération après compression. Son administration permet de normaliser la glycémie chez des animaux diabétiques[366,367]. L'"Ilotropin" possède également des propriétés trophiques pour l'épithélium canalaire *in vivo*[367] et *in vitro*[368] et sa caractérisation est en cours[369].

#### I.5.3. Pancréatectomie partielle.

Di Mattei a été le premier à mettre au point le modèle de pancréatectomie partielle chez le chien en 1885 et à décrire l'augmentation de l'activité mitotique du pancréas restant[370] qui fut ensuite confirmée par de nombreux travaux[371-374]

Plus récemment, Bonner-Weir a montré que l'hyperplasie du pancréas qui accompagne la pancréatectomie partielle est plus importante dans le tissu endocrine que dans le tissu exocrine[375]. Après une pancréatectomie à 90% chez le rat adulte, la réplication des cellules  $\beta$  et du tissu exocrine augmente de 3 à 4 fois la première semaine, et la prolifération des cellules  $\beta$  reste 2 fois plus élevée que la normale après 14 jours[313]. L'indice mitotique des cellules endocrines et exocrines est respectivement 10 et 4 fois plus important que dans le pancréas normal[313]. Après 8 semaines, le poids du reliquat pancréatique correspond à 27% de celui d'un pancréas normal et la masse de tissu endocrine représente 42% de la masse normale[376].

Initialement, seule une prolifération des cellules  $\beta$  avait été suspectée, mais Bonner-Weir a pu, quelques années plus tard, confirmé l'existence d'une deuxième voie de formation des cellules au cours de la régénération du pancréas [343,375,377] : la réactivation de la voie embryonnaire de formation des cellules endocrines à partir de l'épithélium canalaire, identique à celle déjà décrite près d'un siècle auparavant après ligature du canal de Wirsung[325,350]. La pancréatectomie s'accompagne d'une prolifération progressive de l'épithélium canalaire dans le canal pancréatique commun (24 à 36 heures après la pancréatectomie), dans le canal principal et les canaux interlobulaires (36ème heure), puis dans les canaux proximaux (après la 48ème heure) et enfin dans des canalicules nouvellement formés (72ème heure). Dans ces canalicules, une différenciation des cellules épithéliales en cellules endocrines et exocrines peut être observée, localisée dans ce que l'on appelle des foyers de différenciation. L'apparition temporaire des ces foyers 1,5 à 6 j après PH, suivie de leur disparition, correspond à l'observation de la croissance du reliquat pancréatique. Le rôle de l'hyperglycémie initiale, secondaire à la pancréatectomie, sur la régénération reste encore à déterminer. Elle n'est pas indispensable pour obtenir la régénération des îlots[378]. Ainsi, la régénération pancréatique après pancréatectomie partielle s'accompagne d'une augmentation de la masse du tissu endocrine, d'une part, par la prolifération des cellules  $\beta$ différenciées et, d'autre part, par la néogenèse de cellules  $\beta$  à partir de la prolifération et de la différenciation de l'épithélium canalaire.

#### I.5.4. Destruction chimique du pancréas endocrine

L'atteinte toxique du pancréas peut également conduire à la régénération du tissu pancréatique[339,356,379,380]. La destruction sélective des cellules  $\beta$  par la streptozotocine chez des rats nouveaux-nés est suivie d'une rémission spontanée après 4 jours[379]. Cette rémission s'explique par l'apparition de cellules endocrines, contenant de l'insuline, dans le parenchyme acineux ainsi que dans l'épithélium canalaire, où l'on observe des îlots endocrines bourgeonnant[376]. D'autre part, chez le hamster, après injection de fortes doses de streptozotocine, une prolifération de l'épithélium canalaire ainsi que des îlots, permet à l'animal

de survivre sauf si l'on corrige l'hyperglycémie par l'administration d'insuline[381]. L'injection d'alloxan chez le cobaye provoque également une destruction massive des cellules  $\beta$  24 h après l'injection[339]. On observe ensuite une prolifération rapide et dose-dépendante des cellules survivantes après la 48ème heure. Cependant, aucun signe d'une néogenèse des cellules  $\beta$  à partir des canalicules n'a pu être observé[382].

## I.5.6. Hyperglycemie

L'infusion continue de glucose entraîne une adaptation des cellules  $\beta$  dont le nombre et la taille augmente de 50% et le taux de réplication 4 à 5 fois[341,383]. D'autre part, l'administration d'anticorps anti-insuline[384,385] chez la souris permet une augmentation de 4 à 6 fois de l'indice de marquage de prolifération des cellules  $\beta$  après 3 jours. Chez le rat adulte, la transplantation d'insulinome de rat du New England Deaconness Hospital (NEDH) conduit à une diminution de la fonction des cellules  $\beta$  endogènes et, après explantation, à une augmentation de leur masse par hypertrophie et prolifération[386]. L'hyperglycémie protège également de l'état diabétique les animaux subissant une pancréatectomie partielle à 90% [387].

#### I.5.7. Thyroxine

L'administration de thyroxine chez le cobaye augmente la masse insulaire de 5 à 6 fois par hyperplasie et hypertrophie. Elle entraîne la néoformation d'îlots à partir de l'épithélium canalaire[388].

## I.5.8. Souris transgéniques

La souris transgénique représente un excellent modèle pour analyser le rôle des différents facteurs de croissance ou autres impliqués dans la néoformation des îlots. Le transgène étudié est, la

plupart du temps, placé sous le contrôle transcriptionnel du promoteur du gène de l'insuline humaine, ce qui permet d'obtenir une expression spécifique de ce transgène dans les cellules  $\beta$ . chez les souris BALB/c transgéniques pour l'IFNγ développée Ainsi. par Sarvetnik[16,378,389,390], la réponse immunitaire produite par cette lymphokine provoque une infiltration lymphocytaire des îlots aboutissant à leur destruction rapide et à la diminution de l'expansion des acini. Cette destruction des îlots s'accompagne d'une prolifération des cellules épithéliales canalaires qui forment un épithélium cuboïde et se réorganisent en complexes tubulaires[378]. La différenciation des cellules canalaires en cellules endocrines commence au sein même de l'épithélium. Les cellules se rassemblent ensuite pour bourgeonner sous la forme d'îlots à partir des complexes tubulaires aussi bien au niveau du pôle apical (luminal) que du pôle basal[390]. La division des cellules endocrines contribue également à la reconstitution de la masse de tissu endocrine détruit [16,389]. La reproduction de ce phénomène chez la souris SCID transgénique pour l'INFy permet d'affirmer l'indépendance de la destruction des îlots par les lymphocytes T et B, et suggère plutôt un rôle potentiel des macrophages[378].

Les souris transgénique pour le TGF- $\alpha$  présentent une métaplasie canalaire par dédifférenciation des acini et prolifération de ces cellules canalaires néoformées[391]. On note également la présence de cellules qui sont immuoréactives pour l'amylase [392] et possèdent une faible expression de l'insuline[393], caractéristiques de cellules précurseurs, protodifférenciées. Le caractère précurseur des cellules canalaires **a par ailleurs** déjà été montré par la transdifférenciation de l'épithélium canalaire en hépatocytes[378,394]. Les souris transgéniques à la fois pour le TGF- $\alpha$  et la gastrine montrent, une augmentation de la masse d'îlots à **l'âge** adulte, alors que les souris transgèniques pour la gastrine seule ont un pancréas normal. Chez ces souris, la gastrine permet de limiter la prolifération des canalicules induite par le TGF- $\alpha$  seul et de favoriser leur différenciation en cellules endocrines. D'autre part, on ne peut pas exclure une action synergique entre la gastrine et le TGF- $\alpha$  sur la différenciation des cellules souches. La co-expression chez des souris transgéniques du TGF- $\alpha$  et de la gastrine permet donc l'augmentation de la masse endocrine chez l'adulte sans hyperglycémie ni destruction tissulaire préalable. En conclusion, l'ensemble de ces travaux démontrent la possibilité d'induire dans certaines conditions expérimentales de régénération du pancréas, une néoformation de cellules endocrines pancréatiques chez l'animal adulte. Cette néogénèse de cellules endocrines semble due à la réactivation de la voie embryonnaire de formation des îlots de Langerhans par la prolifération et la différenciation de l'épithélium canalaire.

#### I.6. Nesidioblastose ou néoformation d'îlots à l'âge adulte chez l'homme

Un phénomène semblable de néoformation de cellules endocrines dans le pancréas mature est également retrouvé chez l'homme dans certaines conditions pathologiques. La "nesidioblastose" ou "adénomatose" a été définie comme une entité pathologique en 1938[395]. Il s'agit de la prolifération disséminée dans le pancréas de cellules endocrines, que ce soit sous la forme de cellules isolées ou de petits amas de cellules  $\beta$  (îlots) formés aux dépens de l'épithélium canalaire intra-acineux. Sur le plan clinique, elle s'accompagne souvent mais pas toujours[396] d'une hypoglycemie sévère, due à une hypersécrétion d'insuline. C'est une pathologie rare, le plus souvent observée chez le nouveau-né[323,397-400]. Plus récemment, la nésidioblastose a également été décrite chez l'adulte dans certaines conditions pathologiques comme le diabète[353,401,402], la pancréatite chronique[403,404] et l'adénocarcinome du pancréas [344] ou le pancréas hétérotopique[405], l'obstruction mécanique du canal pancréatique[363], les tumeurs endocrines du pancréas comme l'insulinome [345,406,407], le gastrinome [346,408-410] ou le glucagonome[411] et parfois dans le cadre d'une néoplasie endocrinienne multiple[412]. Plus rarement, elle a été décrite chez des patients atteints de la mucoviscidose[413], dans quelques cas de tératomes pancréatiques, gonadiques ou non[414], ou encore chez des patients diabétiques traités par les sulfonylurés [415]. Au cours de la nésidioblastose, on retrouve donc dans le pancréas humain une néoformation des îlots à partir de l'épithélium canalaire par réactivation de la voie embryonnaire, rigoureusement identique à celle décrite chez l'animal adulte. Bien que l'existence de la nésidioblastose soit généralement admise, son caractère pathologique a été récemment remis en cause[416] par la description de phénomènes similaires dans le pancréas sain à différents âges de la vie.

## I.7. Rôle de l'environement cellulaire pour l'embryogénèse

Contrairement à d'autres tissus, comme la glande mammaire et le rein pour lesquels c'est le mesenchyme qui détermine la cytodifférenciation de l'épithélium, l'épithélium pancréatique, comme l'épithélium thymique, se différencie quel que soit le mésenchyme auquel il est associé (salivaire, pancréatique ou rénal)[417]. Le rôle du mésenchyme pour le développement du pancréas est attribué à des facteurs solubles ainsi qu'aux composants de la matrice extracellulaire (MEC) qu'il sécrète (collagène de type I et III, fibronectine et HSPG)[417-420]. Ces composants mésenchymateux en association avec les composants de la MEC de l'épithélium, comme le collagène de type IV notamment, permettent d'orienter les cellules vers la différenciation ou la prolifération, en réponse à l'action des facteurs solubles [421]. Ainsi, la production par le mésenchyme d'enzymes de dégradation de la membrane basale (hyaluronidases) localisée au niveau de l'extrémité des lobules du pancréas, permet ainsi de favoriser localement la prolifération aux dépens de la différenciation[421]. Ce sont donc les composants de la matrice extracellulaire extracellulaire et les facteurs solubles mésenchymateux qui déterminent la prolifération, l'organisation et la différenciation des cellules épithéliales lors de l'embryogènèse du pancréas.

De même, in vitro, l'environement cellulaire, notamment le collagène et les composants de la matrice extracellulaire, régulent l'expression génétique ainsi que la fonction, la prolifération et la différenciation des cellules en réponse aux facteurs de croissance[422-424]. La culture tridimensionnelle des cellules épithéliales dans le collagène ou dans une membrane basale, induit la formation de structures glandulaires pseudo-tissulaires à partir de l'épithélium mammaire[423] prostatique[425], lignées cellulaires mammaires[426], ou de de cellules d'adénocarcinome[427,428], de lignées de cellules canalaires différenciées[429], de follicules thyroidiens [430] et d'autres tissus [424,431-433]. En ce qui concerne les îlots de Langerhans, la culture tridimensionnelle améliore la survie des îlots de rat[434] et des îlots humains[111] en

permettant leur réorganisation en structure organoïde[435,436]. Elle permet aussi la cytodifférenciation des îlots foetaux et nouveaux-nés[437,438] ainsi que la prolifération cellulaire dans les îlots adultes de rongeur[320](voir schéma 3).



Schéma 3 : Régénération des îlots in vitro

#### I.8. Objectif de l'étude

Les travaux expérimentaux sur la régénération pancréatique chez l'animal, démontre la persistance dans le pancréas adulte de cellules épithéliales canalaires susceptibles de proliférer et de se différencier en cellules endocrines à la faveur de divers stimuli. Ces cellules épithéliales précurseurs ou cellules souches, semblent être **k** point de départ de la formation du tissu endocrine que ce soit au cours du développement embryonnaire ou lors de sa réactivation à l'âge adulte.

A la lumière des observations de la nésidioblastose chez l'homme, il semble que ces cellules souches existent aussi dans le pancréas adulte humain. L'obtention de l'expansion de l'épithélium canalaire *in vitro*, suivi de sa différenciation en cellules endocrines et la détermination des conditions les favorisant, pourraient donc constituer la première étape vers la description d'une nouvelle source illimitée de tissu endocrine humain.

Le but de ce travail était la reproduction *in vitro* du phénomène de la nésidioblastose décrit *in vivo*, à partir de préparations d'îlots humains. A l'aide de la culture tridimensionnelle dans des matrices extra-cellulaires, nous avons tenté d'identifier les conditions permettant d'obtenir *in vitro* (1) la prolifération de l'épithélium canalaire et son organisation en réseaux tubulaires, et (2) la différenciation des cellules épithéliales en cellules endocrines.

#### **II. MATERIEL ET METHODES**

#### II.1. Isolement des îlots

Les préparations d'îlots humains ont été obtenues à partir de 9 pancréas prélevés chez des donneurs en état de mort cérébrale âgé de 23 à 55 ans (age moyen 37 ans), grâce à une technique automatisée de digestion enzymatique suivie d'une purification dans un gradient d'Euro-Ficoll déjà décrites dans la première partie. Lorsque la pureté des préparations était inférieure à 80%, les îlots ont été recueillis à la main sous une loupe binoculaire afin de réduire au maximum la contamination par le tissu exocrine et les fragments canalaires.

## II.2. Culture des îlots dans des matrices extra-cellulaires

Les îlots purifiés ont été cultivés dans un milieu de culture de type RPMI 1640 contenant du glucose (1g/L), du sérum de veau foetal (SVF) inactivé(10%), de la nicotinamide (10mM), des antibiotiques (100 $\mu$ U/mL de penicilline, 100 $\mu$ g/ml de streptomycine, 50 $\mu$ g/mL de gentamycine), et un antifungique (fungizone1 $\mu$ g/mL)[130] dans une étuve à 37°C, en présence de 5% CO2. Après une nuit de culture, les îlots ont été transférés dans des boîtes de plastiques (100mm) afin d'éliminer les fibroblastes qui adhérent plus rapidement que les îlots sur support plastique. Après une deuxième nuit de culture, les îlots étaient lavés avec du milieu RPMI sans sérum, comptés à l'aide d'un microscope inversé et remis en suspension à une concentration de 200 îlots/mL dans les gels suivants :

collagène de queue de rat (QR). Le gel était préparé avec 8 volumes (vol) de collagène de type I isolé à partir de queues de rats selon la technique décrite par Montesano [435], en veillant à éliminer toute contamination par les vaisseaux, 1 vol de bicarbonate de sodium (0,3M) et hydroxyde de sodium (102 mM) et 1 vol de milieu "Minimum Essential Medium" (MEM, concentré 10x), afin d'obtenir un pH neutre.

- collagène de type I bovin purifié (Vitrogen 100<sup>®</sup>, Collagen Corporation, Celtrix Luxembourg)
  préparé de la même façon que le collagène QR.
- Matrigel (Collaborative Research, Becton Dickinson, France). Le matrigel est une matrice contenant des constituants de la membrane basale obtenue à partir de tumeur d'Engelbreth Holm Swarm. Il était utilisé sous sa forme commerciale sans modification.
- agarose. L'agarose (type I, Sigma, 0,3%) était preparé comme le collagène QR en substituant par une solution simple de bicarbonate de sodium (0,3M) la solution de bicarbonate et d'hydroxyde de sodium.

Après avoir resuspendu les îlots dans les gels, des échantillons de 500  $\mu$ l étaient déposés dans les puits de boîtes en plastique de 24 puits. Après solidification des gels, 500  $\mu$ l de milieu de culture RPMI 1640 (10% ou 20% SVF) étaientt ajoutés dans chaque puit. Pour la culture, les boîtes étaient placées dans une étuve à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO2. Le milieu de culture était remplacé toutes les 48 heures.

#### II.3. Evaluation semi-quantitative de la formation des kystes

La formation des kystes dans chacune des matrices a été quantifiée après une semaine pour les 9 préparations. La formation des kystes a été quantifiée par une méthode semi-quantitative après une semaine de culture par observation au microscope inversé après coloration par la dithizone, un colorant spécifique du zinc complexé à l'insuline et colorant les îlots en rouge[128]. Pour chaque matrice, 4 puits de chacune des préparations ont été étudiés. Les résultats ont été exprimés de la façon suivante : (o) pas de kystes, (+) < 50 kystes formés, (++) 50 à 100 kystes formés, et (+++) >100 kystes formés pour 100 îlots.

#### **II.4.** Effet des facteurs solubles

Afin de déterminer l'effet de la nature et de la concentration de sérum sur les cultures, les préparations de quatre donneurs ont été cultivées dans le collagène QR en présence de 10 % ou de

20% de SVF (Gibco BRL ou Eurobio, France), de 20% de sérum de porc (Gibco BRL, France), de cheval (Gibco BRL, France), de humain Type AB (Sigma, France), ou de sérum de rat isolé à partir du sang de rat[439]. Tous les sérums étaient préalablement décomplémentés par chauffage à 56°C pendant 30 minutes. La formation des kystes a été quantifiée selon la technique décrite cidesssus après 7 jours.

#### II.5. Inhibition de la prolifération

La prolifération cellulaire nécessite la transcription de l'ADN et de la synthèse des protéines. Afin de confirmer la nature (prolifération) des phénomènes observés, les préparations de deux donneurs ont été cultivées dans du collagène QR et un milieu de culture additionné d'actinomycine D ( $0,5 \mu g/mL$ )[426], un inhibiteur de la transcription de l'ADN, dissout dans le dimethylsulfoxyde (DMSO) et un tampon phosphate (PBS), ou de cycloheximide ( $10\mu g/ml$ ), un inhibiteur de la synthèse des proteines dissout dans le PBS. Ces deux agents inhibiteurs ont été ajoutés au milieu de culture (20% SVF) immédiatement après la mise en culture des îlots dans le collagène QR. Des études préliminaires nous ont permis de vérifier que la concentration finale de DMSO dans les préparations additionnées d'actinomycine (1,1%) était sans effet sur la viabilité des îlots .

#### II.6. Quantification de la prolifération par l'incorporation de thymidine

La synthèse de l'ADN a été évaluée sur les préparations de 4 donneurs cultivées dans le collagène QR ou en suspension dans le milieu RPMI en présence de SVF (20%) sur des supports de polycrylate (Millicell CM, Millipore, France) durant 1 à 11 jours. Dix-huit heures avant le recueil des îlots, 1µCi/mL de méthyl <sup>3</sup>H thymidine (ICN Biomedicals, France) était ajouté dans le milieu de culture[440]. Pour chaque temps de culture, l'incorporation de thymidine tritiée a été évaluée dans quatre puits. Après 18h d'incorporation, les cellules étaient incubées avec du milieu de culture contenant de la thymidine froide (10mM) pendant 2h. Les gels de collagène QR étaient
dissout par l'addition de d'acide acétique 4,3M pendant 3 minutes à 37°C, puis après rinçage dans la solution de Hanks, soniqués pendant 5 secondes dans de l'eau distillé. Pour la mesure de l'incorporation de thymidine tritiée, deux échantillons de l'homogénat étaient précipités par de l'acide trichloroacétique (5%) et lavés trois fois dans de l'eau distillée. Les culots étaient finalement dissout dans en 1 ml d'hydroxyde de sodium 0,5M, et leur radioactivité était déterminée à l'aide d'un compteur à scintillation.

## II.7. Identification des structures kystique

Pour l'analyse histologique, les gels ont été recueillis et fixés dans une solution de Bouin puis inclus dans la paraffine. Les études histologiques ont été réalisées sur des coupes de 5µ déparaffinisées. Afin d'identifier la nature mésenchymateuse, endocrine, épithéliale ou canalaire des structures kystiques observées, les préparations cultivées dans le collagène QR ont été recueillies après 7 à 10 jours et étudiées par des techniques immunohistochimiques réalisées sur des sections adjacentes ou semi-adjacentes. Les dilutions d'anticorps utilisées, ont été préalablement déterminées sur des coupes de pancréas humain inclus en paraffine. Les sites antigéniques non spécifiques ont été saturés avec du sérum de chèvre (10%) non immunogénique, afin de limiter le bruit de fond lors de la coloration spécifique. Les noyaux des cellules ont été contrastés par l'hématoxyline de Carazzi. Les coupes ont été marquées à l'aide d'anticorps de lapin anti-chromogranine A (Dako, France) pour mettre en évidence les structures endocrines et notamment les îlots de Langerhans, d'anticorps monoclonal anticytokératine (antikeratin 1, Immunotech, France) pour identifier les stuctures épithéliales, d'anticorps de lapin antivimentine (Eurodiagnostic, Holland) pour identifier les fibroblastes et le mésenchyme, et d'anticorps monoclonal anti-antigène carbohydrate 19-9 humain (CIS-Biointernational) pour identifier les cellules canalaires. Après incubation avec l'anticorps primaire, les coupes ont été révélées par une technique ABC avec des réactifs du commerce comprennant un deuxième anticorps anti-souris et anti lapin biotinylé, un complexe péroxydase-streptavidine-biotinylée de raifort ABC (Dako, France), et un chromogène 3-amino-9 éthylcarbazole. Ces colorations ont été effectuées par le Service d'Anatomie Pathologie Cytologique du CHU de Lille (Directeur : Professeur M Lecomte-Houcke).

#### **II.8.** Caractérisation de la prolifération

La prolifération des structures observées a été étudiée par l'incorporation du Bromodéoxyuridine (BrdU) ajouté au milieu de culture 18 heures[441] avant le prélèvement des gels. L'incorporation du BrdU était étudiée par une technique immunohistochimique sur des coupes déparaffinisées et lavées dans de l'acide chlohydrique (0,5M, 10 min), afin de permettre l'accès de l'anticorps au noyau, et incubées avec un anticorp anti-BrdU (Dako, France) dilué au 1/20 à température ambiante pendant 3 heures. La révélation était réalisée par la technique streptavidinebiotine (ABC), effectuée à l'aide d'un kit HistoMark Streptavidin-peroxidase (Kirkegaard & Perry Laboratoires, KPL Inc., USA), révélée avec le chromogène diaminobenzidine (DAB, DAB reagent kit, KPL Inc., USA) afin de colorer le noyau des cellules proliférant en marron.

La cinétique de la prolifération cellulaire a été étudiée sur les préparations de trois pancréas, cultivées dans le collagène QR en présence de 20% SVF durant 21 jours de culture. Pour chaque préparation, deux puits ont été utilisés à chacun des temps étudiés. Après révélation du premier anticorps anti-BrdU, les coupes étaient incubées en présence d'un deuxième anticorps: anticorps de cochon d'inde anti-insuline (Dako), de lapin anti-glucagon (ICN) ou de lapin antisomatostatine (ICN) afin d'effectuer les études de double marquage. Le deuxième anticorps était révélé avec un kit (HistoMark Streptavidin-phosphatase, KPL Inc) utilisant le chromogène Phthalored (triaminotrimethylthiphenylmethane).

#### II.9. Quantification du CA19-9

La présence de CA 19-9, un marqueur de l'épithélium canalaire, a été évaluée sur les prépararations de deux donneurs après 7 jours de culture en présence de SVF 20% dans le collagène QR, dans le Matrigel, ou en suspension dans le RPMI 1640. Le collagène a été dissout avec de la collagénase (RPMI contenant 0.5% collagénase type P, Boeringer Mannheim, 0.5% BSA) et le Matrigel avec la dispase (Collaborative Research). Après dissolution des gels, les cellules ont été lavées et soniquées dans une solution de PBS contenant de l'albumine bovine (7%) et de l'EDTA(0,1mM) (4 puits pour chaque condition de culture). La quantité de CA 19-9 contenue dans les cultures a été déterminée par une technique radioimmunométrique (kit RIA CA 19-9, CIS biointernational). Les valeurs de CA19-9 sont exprimées en unités pour 100 îlots.

## **III. RESULTATS**

#### **III.1.** Formation des kystes

Deux à cinq jours après l'inclusion des préparations d'îlots dans le collagène QR (20%SVF), nous avons observé la formation de structures kystiques (Planche 9A). Deux types de kystes sont constamment observés : des kystes associés aux îlots qui se forment dans les îlots ou à leur périphérie immédiate, et des kystes indépendants qui se développent dans le gel sous la forme de sphères isolées (Planche 9D). La taille et le nombre de ces kystes augmentent avec la durée de la culture. Ces kystes ne se forment pas dans le collagène de type I purifié (Vitrogen) (Planche 9B) et dans l'agarose (Planche 9C). Par contre, dans le Matrigel (Planche 10), la formation des kystes sont observés à la périphérie des îlots ou sous la forme de sphères isolées.Après deux semaines de culture dans le Matrigel, les kystes s'anastomosent les uns aux autres pour former un réseau tubulaire complexe qui occupe rapidement l'ensemble de l'espace en désorganisant les îlots. La Table 12 résume l'évaluation semi-quantitative de la formation des kystes après sept jours de culture dans les différentes matrices.

Matrice	Formation des kystes
Collagène OR	++
Matrigel®	+++

Vitrogen 100®

Agarose

**Table 12**: Influence du type de la matrice utilisée sur laformation des kystes en présence de sérum de veau foetal (20%)

0

0

# III.2. Influence des facteurs solubles

Comme le montrent les résultats résultats résultats ans la Table 13, la formation des kystes dépend de la concentration du sérum et était supérieure avec 20% de SVF. Par contre, la formation des kystes ne éependait pas du type de sérum utilisé. Elle était identique quelle que soit la provenance (fournisseur) du sérum de veau foetal et avec les différents types de sérum adultes.

**Table 13** : Influence de la concentration et la nature du sérum surla formation des kystes dans le collagène de queue de rat

Sérum		Formation des kystes
Туре	concentration	
Fetal calf serum	10%	+
Fetal calf serum	20%	++
Pig serum	20%	++
Rat serum	20%	++
Horse serum	20%	++

# III.3. Inhibition de la prolifération

L'inhibition de la synthèse de l'ADN et des protéines par l'addition de cycloheximide et d'actinomycine D a empêché la formation des kystes dans les préparations d'îlots cultivés dans le collagène QR, même en présence de concentration élevée de SVF (20%) (Table 14)

**Table 14** : Effet de l'addition d'inhibiteurs de la synthèse del'ADN ou des protéines sur la formation des kystes dans lecollagène QR en présence de SVF (20%)

Inhibiteur	Formation des kystes
Aucun	++
Actinomycin D	0
Cycloheximide	0

## III.4. Incorporation de la thymidine tritiée

La prolifération cellulaire mesurée par l'incorporation de [ ${}^{3}$ H]-thymidine en collagène QR est augmentée 3 fois après 3 jours, 10 fois après 7 jours, et 14 fois après 11 jours de culture par rapport à la prolifération observée après 1 jour de culture (265(75) dpm / 100 îlots). Cette augmentation de la prolifération n'était pas observée dans les préparations cultivées en suspension sur les supports Millicell (Millipore). La prolifération observée dans le collagène QR était significativement supérieure à celle des cultures en suspension dès le 7ème jour (P<0,01, test t de Student). L'incorporation du BrdU a permis de confirmer la localisation de cette prolifération au niveau des kystes (voir ci dessus).



Figure 14: Incorporation de <sup>3</sup>H-thymidine (dpm pour 100 îlots) dans les préparations d'îlots humains cultivés en suspension (Millicell) ou dans le collagène de queue de rat pendant 11 jours. Moyenne(esm) de 4 préparations. \*: p<0,05, \*\*p<0,01, test t de Student suspension vs collagène.

#### **III.5.** Caractérisation des kystes

Les structures kystiques formées au cours de la culture dans le collagène QR sont composés d'une monocouche cellulaire et possèdent une lumière vide de collagène (Planche 11). Les cellules constituant la paroi de ces kystes, prolifèrent (immunomarquage positif pour le BrdU) après 3 jours de culture, cette prolifération étant retrouvée jusqu'à la fin de la période d'étude (3 semaines). En fonction de la durée de la culture et de l'expansion des structures kystiques, les cellules des kystes passaient progressivement d'une forme de type cylindrique (Planche 11B) à une forme plus alongée (Planche 11C). Par ailleurs quelques cellules de type fibroblastique marqu**ées par le** BrdU ont été également observées.

L'étude en immunohistochimie après 7 jours de culture, a permis de distinguer nettement les îlots endocrines colorés par la chomogranine A des structures kystiques (Planche 12A). La marquage des kystes par l'anticorps anti-kératine 1 affirme leur nature épitheliale (Planche 12B). Les kystes sont également positifs pour le CA19-9 démontrant ainsi leur nature canalaire (Planche 12C). L'immunomarquage pour la vimentine, un marqueur des fibroblastes, est négatif dans les kystes, et n'est positif que **pour quelques cellules dispersées** dans le gel de collagène.

#### III.6. Quantification du CA 19-9

Le CA19-9 dans les préparations d'îlots cultivées pendant 7 jours dans le collagène QR (527(54) U/100 îlots) était significativement plus élevé que dans les préparations cultivées en suspension (203(63) U/100 îlots, p<0,01 test t de Student). La quantité de CA 19-9 dans le Matrigel (393,1+55U/100 îlots) n'était pas significativement différente de celle retrouvée dans le collagène.

## **III.7.** Cytodifférenciation

L'immunomarquage par la chromogranine A permet de mettre en évidence les cellules neuroendocrines. Nous avons ainsi observé après 7 à 10 jours de culture, la présence de cellules endocrines au sein de l'épithélium canalaire dans les structures kystiques (Planche 12D). Le marquage de certaines cellules par des anticorps anti-insuline, anti- somatostatine, et anti-glucagon a confirmé et précisé leur nature endocrine (Planche 12 E). De plus, nous avons également observé la présence d'amas cellulaires évaginés au niveau du pôle apical de l'épithélium canalaire vers le collagène environnant et composés de cellules contenant de l'insuline, du glucagon (Planche 13).

Quelques cellules positives pour le BrdU étaient retrouvées au niveau de ces bourgeons mais aucune cellule marquée à la fois par le BrdU et une hormone endocrine n'a pu être observée.

## **IV. DISCUSSION**

Dans cette étude, nous avons pu montré la formation et la prolifération de structures kystiques épithéliales de nature canalaire, à partir de préparations de pancréas adulte humain cultivées dans des gels de collagène. La présence de cellules endocrines isolées au sein de la paroi de l'épithélium, ou regroupées sous la forme d'amas bourgeonnant au niveau du pôle basal de l'épithélium canalaire, reproduit *in vitro* les caractéristiques de la réactivation de la voie embryonnaire de formation des îlots observés *in vivo* dans différentes conditions expérimentales ou pathologiques. La prolifération de l'épithélium canalaire pourrait donc être la première étape de la néoformation *in vitro* de tissu endocrine pancréatique humain à partir de préparations d'îlots humains adultes.

### IV.1. Nature des kystes

L'expansion des cellules canalaires est la première étape de la néogenèse des îlots observées lors de l'embryogenèse pancréatique[328] et de la régénération du pancréas[343,364]. Les structures kystiques que nous avons observées *in vitro* à partir des préparations d'îlots humains adultes cultivées dans le collagène, présentent toutes les caractéristiques des structures épithéliales retrouvées*in vivo* au cours de la régénération du pancréas, sous l'action de différentes conditions expérimentales ou pathologiques[343,364,378]. La morphologie des structures kystiques formées dans le collagène QR rappelle celle de l'épithélium de type cuboïde des canaux interlobulaires et intralobulaires[432,442,443]. L'organisation progressive de réseaux tubulaires observée dans le Matrigel, reproduit le mode de formation de l'arbre canalaire au cours de l'embryogenèse[443] et de la nésidioblastose[329]. La nature épithéliale et canalaire de ces structures a été confirmée par l'étude immunohistochimique (cytokératine "keratin 1" et CA 19-9). L'incorporation du BrdU fréquemment observée dans les cellules de ces structures, a montré

qu'elles étaient responsables de la prolifération cellulaire, détectée dans les cultures par la mesure de l'incorporation de la thymidine tritiée.

#### IV.2. Rôle de l'environnement cellulaire

#### IV.21. Matrice extra-cellulaire

Comme, lors de la régénération du pancréas chez le rongeur[343,364], l'environnement cellulaire joue une rôle important dans la formation de ces structures kystiques, plutôt que dans celle des canaux plus larges (canal principal) possédant une épithélium de type cylindrique. L'absence de formation de kystes dans l'agarose montre que les caractéristiques physiques des matrices tridimensionnelles n'explique pas à elles seules cette prolifération. Nos résultats semblent en contradiction avec ceux d'autres chercheures[442] qui ont montré une prolifération des cellules canalaires de rat dans l'agarose contenant du SVF (10%) et de l'insuline. L'élimination de la plupart des fragments canalaires des préparations d'îlots pourrait expliquer l'absence de formation des kystes dans notre étude. De même, l'absence de formation des kystes dans le collagène de type I bovin purifié (Vitrogen 100) indique le rôle probable des facteurs permissifs présents dans le collagène préparé à partir de queues de rat[426].

L'importance de la formation des kystes dans le Matrigel indique le rôle essentiel des composants de la matrice extracellulaire (MEC) et/ou des facteurs de croissances qu'il contient pour le développement et l'organisation de l'épithélium canalaire. En plus de nombreux facteurs de croissance, le Matrigel contient des constituants de la membrane basale en particulier de la laminine, du collagène de type IV, de l'entactine, de l'héparane sulfate, et des protéoglycanes[444] dont l'action respective dans notre modèle reste à définir. Cependant, les composants de la membrane basale et en particulier le collagène de type IV sont indispensables au développement du pancréas normal *in vivo*[445] et après la ligature du canal pancréatique[446]. Dans notre modèle, les composants de la matrice pourraient agir directement en favorisant l'adhérence, la différenciation, ou la polarité des cellules, ou indirectement en

augmentant leur receptivité aux facteurs solubles contenus dans le sérum[433]. L'addition des différents composants comme la laminine de souris ( $70\mu g/ml$ )[424], le collagène de type IV de souris ( $50 \mu g/ml$  Collaborative B.), ou bien les deux combinés, aux îlots cultivés en collagéne purifié (Vitrogen 100) n'a pas abouti au développement des kystes observés en culture de collagène non purifié, même en présence de 20% SVF. Cependant, l'addition des facteurs de croissance et autres composants de la matrice extracellulaire aux cultures dans le Vitrogen 100, devrait permettre d'identifier les facteurs spécifiques contribuant à la formation de kystes.

#### IV.2.2. Rôle des facteurs solubles

L'apparition des kystes dans le collagène QR est étroitement liée à la quantité de sérum présent dans le milieu, mais l'addition de sérum dans le milieu n'est pas suffisante pour induire leur formation dans les cultures en suspension. L'absence de différence entre les divers types de sérum testés, est en faveur de l'action de facteurs sériques peu spécifiques. La formation des kystes dans le collagène QR pourrait être le résultat de l'interaction synergique des facteurs solubles présents dans les sérums animaux ou dans la préparation d'îlots elle-même (sécrétion paracrine) et des composants de la matrice extracellulaire. Nous avons récemment réussi à reproduire une formation de kystes comparables à ceux observés en 20% SVF dans un milieu plus défini (RPMI 1640) grâce à l'addition de 2,5% SVF en présence d'insuline (5 mg/l), de transferrine (5 mg/l), et selenium de sodium (1 g/l), et d'EGF. L'omission de l'EGF a abouti à une formation de kystes moins importante que celle observée en 20% SVF.

Parmi les nombreux facteurs de croissance présents dans le Matrigel (EGF, basic-FGF, NGF, PDGF, IGF1, TGFβ) et qui pourraient expliquer l'activation de la prolifération dans cette matrice, on peut évoquer le rôle probable de l'EGF, qui augmente la prolifération des cellules canalaires de rongeur[377,432], du tissu foetal de rongeur[438] et la formation des complexes tubulaires dans le cancer du pancréas chez l'homme[447] ; ou du facteur basique de croissance des fibroblastes (basic-FGF)[448]. Le facteur de croissance des hépatocytes ou HGF, présent à l'état de traces dans le Matrigel et dans les cellules, est également impliqué dans la formation de l'épithélium canalaire[449]. Enfin d'autres facteurs, notamment ceux qui augmentent le taux

d'AMP cyclique comme la toxine cholérique, sont capables d'activer le développement de kystes dans les cultures d'épithélium de rongeur[432].

## IV.3. Origine des structures kystiques (voir schéma 4)

Les complexes tubulaires observés in vitro dans notre modèle, présentent une homologie avec ceux déjà décrits in vivo dans le pancréas embryonnaire[326,392] et au cours de la régénération du pancréas[355] ou chez la souris transgénique[378,391,450], mais également avec ceux observés chez l'homme lors de la pancréatite chronique[451], et lors du développement de carcinomes pancréatiques[452,453]. Il apparaît de plus en plus que le développement des structures/réseaux tubulaires est un phénomène général, non spécifique reflétant une adaptation du pancréas exocrine, canalaire et acineux[359,451,454-456]. L'origine de ces structures reste controversée : la prolifération des cellules canalaires existantes [456] et la dédifférenciation du tissu exocrine caractérisée par la diminution de la hauteur des cellulles, l'accroissement de la taille de la lumière et la disparition des granules de zymogène[451] ont toutes deux été évoquées.

Malgré une pureté supérieure à 80%, la présence des cellules canalaires (intra ou interlobulaires) et acineuses est inévitable dans les préparations d'îlots Il est possible que les cellules canalaires présentes puissent proliférer en réponse à la sécrétion d'insuline paracrine issue des îlots ou contenue dans le sérum et/ou à l'environment permissif du collagène. Cette prolifération de l'épithélium conduirait alors à la formation de structures kystiques comme elle a déja été décrite *in vitro* [432], et expliquerait ainsi la formation de kystes indépendants des îlots. La formation des kystes, associés aux îlots pourrait résulter d'une prolifération a également été décrite *in vivo* après administration du facteur de croissance des kératinocytes ou (KGF), spécifique des cellules canalaires (457]. L'existence de cellules épithéliales au sein même des îlots adultes est controversée dans la littérature[328,329] mais affirmée par certains auteurs[458].

La deuxième possibilité pouvant expliquer l'origine des stuctures kystiques est une dé(re)différenciation du tissu exocrine in vitro. En effet, les cellules acineuses perdent rapidement leur différenciation en culture[359,459]. Leur dédifferenciation en cellules de type canalaire a déjà été rapportée chez l'animal [453,460,461] et plus récemment avec du tissu humain [462]. Le tissu acineux est inévitablement présent dans les préparations d'îlots sous la forme de fragments isolés, mais également à la péripherie des îlots de Langerhans incomplètement dissociés par la collagénase, en particulier avec les pancréas prélévés chez les jeunes donneurs. Une dédifférenciation en cellules canalaires des fragments exocrines isolés ou adhérants à la périphérie des îlots pourrait donner naissance respectivement à des kystes indépendants ou au contact des îlots. L'addition d'insuline dans les cultures de tissu exocrine de rongeur permet d'obtenir la formation de quelques petites structures kystiques à la péripherie du tissu exocrine, constituées probablement de cellules canalaires de type centroacineux[463]. Des structures kystiques similaires ont également pu être observées lors de greffes d'îlots humains ou de singe chez la souris immunodéprimée et ont été attribuées à une dédifférenciation du tissu exocrine[109]. Ces structures ont également été décrites après une greffe d'îlots humains encapsulés dans le tissu sous-cutanée[66] ou lors de la greffe d'îlots chez les souris NOD (A.Charles, communication personnelle 1995). La description chez l'homme de quelques carcinomes pancréatiques de phénotype canalaire et d'origine apparemment exocrine renforce l'hypothèse du rôle de la dédifférenciation dans la néoformation de l'épithélium canalaire[451]. Dans notre modèle cependant, la culture de tissu exocrine isolé n'a pas permis malgré la présence de sérum (SVF 20%) et d'insuline d'induire la formation des structures canalaires observées avec les préparations d'îlots.

Parallélement à la dédifférenciation des cellules exocrines, la dédifférenciation des îlots a également été avancée pour expliquer le développement de structures canalaires observées dans un adénocarcimone induit par transfection par l'oncogène "polyoma middle T" d'îlots murins [464]. Récemment la transformation phénotypique des îlots humains cultivés dans le collagène en cellules canalaires a également été observée[465].



Schéma 4: Origine des kystes

## IV.4. Cytodifférenciation in vitro

La différenciation des cellules endocines est initiée au sein de l'épithélium canalaire[326] et l'apparition des cellules endocrines primitives isolées (single primitive islets cells) dans les canalicules hyperplasiques est normalement suivie de l'évagination des îlots néoformés vers le tissu environnant [328,364,378,437,466]. La différenciation des rudiments foetaux de rongeur ou humains, constitués de mésenchyme et d'épithélium foetal est possible en culture et apparaît dépendante de l'environnement cellulaire[319,438,467]. La présence de mésenchyme foetal permet également la différenciation endocrine de cellules canalaires isolées à partir d'animaux adultes[468]. De la même manière, la différenciation de l'épithélium marmaire ou vésicale adulte peut être également reactivée en présence de mésenchyme foetal ne dépasse cependant généralement pas le stade de la protodifférenciation (caractérisé par la présence simultanée d'ARN messager de type exocrine et endocrine) in vitro[326]. La différenciation complète en cellules endocrines nécessite une étape préalable de transplantation in vivo (culture recombinante)[468].

D'autre auteurs évoquent aussi l'importance d'une stimulation par la pancréatectomie partielle ou l'hépatectomie réalisée simultanément la transplantation[469].

La présence dans notre modèle de cellules isolées contenant des hormones endocrines au sein de l'épithélium canalaire pourrait être due à une cytodifférenciation. En effet, ces cellules et les structures évaginées observées au niveau du pôle basal de l'épithélium canalaire sont rigoureuseusement similaires à celles conduisant à la néoformation d'îlots au cours de l'embryogenèse pancréatique[326] ou de la régénération du pancréas adulte in vivo[343,364,470]. La présence de cellules endocrines isolées au sein de l'épithélium canalaire dans le pancréas normal a été observé, chez le rat [471,472] et chez l'homme[473] mais elle reste rare (0,001 à 7%)[474]. Si la culture de fragments canalaires pancréatiques dans le collagène ou l'agarose peut aboutir à la formation de structures kystiques identiques à celle que nous avons observées, la présence de cellules endocrines au sein de ces structures n'a jamais été rapportée[322,442,463,475,476]. La colocalisation en immunohistochimie des marqueurs canalaires (cytokératine 19) et les hormones endocrines au sein des structures kystiques permettrait d'affirmer l'existence d'une cytodifférenciation dans notre modèle[477,478].

Les facteurs responsables de la cytodifférenciation de l'épithélium *in vivo* ont été au moins en partie identifiés[346,393,438,468]. Dans notre modèle différents facteurs dont la nature et le rôle restent à déterminer, pourraient provoquer ou favoriser la cytodifférenciation de l'épithélium canalaire . La nicotinamide (10mM) qui était ajoutée de façon courante aux milieux de culture permet d'induire une différenciation des cellules humaines foetales[467], mais ne semble pas avoir d'effet direct sur les îlots humains adultes[479]. L'IGF-1, omniprésent dans le sérum de veau foetal est présent dans les cultures d'îlots foetaux[480,481] et exprimé dans le pancréas régénérant après pancréatectomie partielle[482]. L'administration de l'IGF 1 a un effet trophique [481,483,484] ou de maturation sur le pancréas foetal greffé[485]. L'HGF, présent dans les cellules  $\alpha$ , permet d'augmenter la masse des îlots foetaux en culture [319].

## V. CONCLUSION

Bien qu'il soit encore difficile de l'affirmer, les phénomènes observés dans notre modèle semblent présenter les caractéristiques de la réactivation de la voie embryonnaire de néoformation du tissu endocrine pancréatique: une prolifération de l'épithélium canalaire et son organisation en réseaux tubulaires complexes, suivies de l'apparition de cellules endocrines isolées au sein de l'épithélium puis au sein de structures bourgeonnants au niveau du pôle basal de l'épithélium (îlots endocrines?). Quelque soit le contingent cellulaire à l'origine de ces structures épithéliales canalaires et le mécanisme de leur formation (prolifération de cellules souches canalaires ou dédifférenciation du tissu exocrine), l'induction de leur prolifération et de leur différenciation pourrait permettre de reproduire la néoformation des celulles endocrines pancréatiques ou nésidioblastose in vitro. Chez l'homme, la nésidioblastose aboutit à l'augmentation de la masse du tissu endocrine pancréatique et de sa fonction sécrétoire.

La culture des préparations de tissu pancréatique humain dans une matrice extracellulaire à base de collagène et contenant des facteurs de croissance, pourrait donc constituer un moyen nouveau d'accroître, in vitro, la masse du tissu endocrine pancréatique disponible pour la transplantation. La néoformation in vitro de cellules endocrines à partir de cultures des cellules souches pancréatiques constituerait une source illimitée de cellules humaines sécrétrices d'insuline.

# **PLANCHES**

Culture des îlots humains dans des matrices tridimensionnelles en présence de sérum de veau foetal (20%) (microscope inversée).

A : Des structures kystiques (flèche) sont apparues à la périphérie des îlots humains après 3 jours de culture dans le collagène de queue de rat (barre =  $50 \mu m$ ).

B : Culture des îlots humains 7 jours dans le collagène de type 1 purifié : Vitrogen 100 (barre =  $50 \mu m$ ).

C : Culture dans l'agarose (0,3%) démontrant la conservation de la forme sphérique du l'îlot après 15 jours de culture avec absence de fibroblaste (barre =  $10 \mu m$ ).

D : Aspect typique d'une culture dans le collagène de queue de rat après 7 jours montrant la formation des kystes associés aux îlots ou indépendants (flèche). L'épaisseur du gel empêche la mise au point simultanée de toute la préparation en microscopie inversée (barre =  $100 \,\mu$ m).



Culture des îlots humains dans le Matrigel, une matrice tridimensionnelle riche en constituants de la membrane basale, en présence de sérum de veau foetal (20%) (microscope inversée).

A : Formation de multiple structures kystique à la périphérie des îlots (ou isolées dans le gel, non visible ici) après 7 jours de culture (barre =  $100 \,\mu$ m).

B : Après >14 jours de culture dans le Matrigel contenant du SVF (20%), organisation d'un réseau tubulaire complexe par fusion (flèche) des kystes isolés (barre =  $100 \,\mu$ m).



Localisation de la prolifération dans les préparations d'îlots humains cultivés dans le collagène de queue de rat contenant du sérum de veau foetal (20%) par incorporation de Bromodéoxyuridine (barre =  $25 \mu m$ ).

A : Prolifération après 3 jours de culture présence de cellules marquées (noyaux marrons) à la périphérie d'un îlot et au sein d'un kyste formé aux dépens de l'îlot (flèche).

B : Présence de nombreuses cellules proliférantes (flèche) dans la paroi d'un kyste après 5 jours de culture. On peut noter la présence d'une lumière centrale vide de collagène (barre =  $25 \mu m$ ).

C : Cellules proliférantes au sein de la paroi d'un grand kyste après 9 jours de culture (barre =  $25 \,\mu m$ ).



Planche 11

Caractérisation immunohistochimique des structures kystiques formées dans les préparations d'îlots humains cultivés dans le collagène de queue de rat contenant du sérum de veau foetal (20%).

A : Immunomarquage de la chromogranine A (rouge) démontrant la nature endocrine des trois îlots, bien distincts des structures kystiques formées après 7 jours de culture (coupes adjacentes, (A-C : barre =  $50 \mu m$ , hématoxyline).

B : Immunomarquage de la cytokératine anti-kératine 1, localisée au niveau des 4 structures kystiques (flèches) identifiant leur nature épithéliale.

C : Immunomarquage du CA 19-9 démontrant la nature canalaire de ces structures épithéliales.

D : Présence de cellules endocrines isolées, marquées par la chromogranine A (rouge) dans la

paroi des kystes après 10 jours de culture (barre =  $50 \mu m$ , hématoxyline).

E : Paroi d'un grand kyste immunomarqué pour la somatostatine et la bromodéoxyuridine après 20 jours de culture. On peut noter la présence d'une cellule positive pour la somatostatine (flèche) et des cellules proliférantes à la périphérie du kyste (barre =  $25 \,\mu$ m, hématoxyline).





Formation et bourgeonnement d'amas cellulaires évaginés au niveau du pôle apical des kystes après 10 jours de culture dans le collagène de queue de rat contenant du sérum de veau foetal (20%).

A : Immunomarquage pour le BrdU. A proximité d'un kyste de diamètre important contenant dans sa paroi de nombreuse cellules proliférantes (tête de flèches), on observe un kyste présentant un bourgeonnement (étoile) (barre = 50  $\mu$ m, hématoxyline).

B :Agrandissement du bourgeon doublement marqué pour l'insuline (rouge) et le BrdU (flèche) (barre =  $25 \mu m$ , hématoxyline).

C : Agrandissement du bourgeon doublement marqué pour la somatostatine (marquage négatif) et le BrdU (flèche) (barre =  $10 \mu m$ , hématoxyline).

D : Agrandissement du bourgeon doublement marqué pour le glucagon (rouge) et le BrdU (flèche) (barre = 10  $\mu$ m, hématoxyline). Aucune cellule marquée à la fois par le BrdU et un hormone endocrine n'a pu être observée.



# **BIBLIOGRAPHIE**

1. Levy-Marchal C. Epidémiologie du diabète insulinodépendant de l'enfant. Médecine et Thérapeutique 1995; 1:139-142.

2. Nathan E. Long-term complications of diabetes mellitus. New England J Med 1993; 328:1676-1685.

3. Rubin RJ, Altman WM, Mendelson DN. Health care expenditures for people with diabetes mellitus. J Clin Endocrin Metab 1994; 78:809.

4. Boitard C. Les mécanismes cellulaires du diabète insulinodépendant (DID). Médecine et Thérapeutique 1995; 1:125-138.

5. Atkinson MA, McLaren NK. Islet cell autoantigens in insulin-dependant diabetes. J Clin Invest 1993; 92:1608-1616.

6. De Aizpurua HJ, Wilson YM, Harrison LC. Glutamic acid decarboxylase autoantibodies in preclinical insulin-dependent diabetes. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89:9841-9845.

7. Dotta F, Previti M, Lenti L, et al. GM2-1 pancreatic islet ganglioside: identification and characterization of a novel islet-specific molecule. Diabetologia 1995; 38:1117-1121.

8. Bonifacio E. Quantification of islet-cell antibodies and prediction of insulin-dependant diabetes. Lancet 1990; 335:147-149.

9. Dobersen MJ, Scharff JE, Ginsberg-Fellner F, Notkins AL. Cytotoxic autoantibodies to beta cells in the serum of patients with insulin-dependent diabetes mellitus. New England J Med 1980; 303:1493-1498.

10. Katz JD, Benoist C, Mathis D. T helper cell subsets in insulin-dependant diabetes. Science 1995; 268:1185-1187.

11. Conrad B, Weldmann E, Trucco G, et al. Evidence for superantigen involvement in insulin-dependant diabetes mellitus etiology. Nature 1994; 371:351-354.

12. Bougnères P, Caillat-Zucman S. Gènes de susceptibilité au diabète de type 1. Médecine et Thérapeutique 1995; 1:143-152.

13. Atkinson MA, MacLaren NK. The pathogenesis of insulin dependant diabetes mellitus. New England J Med 1994; 331:1428-1436.

14. Karjalainen J, Martin JM, Knip M, et al. A bovine albumin peptide as a possible trigger of insulin-dependent diabetes mellitus. New England J Med 1992; 327:302-307.

15. Clements GB, Galbraith DN, Taylor KW. Coxsackie B virus infection and onset of childhood diabetes. Lancet 1995; 346:221-223.

16. Sarvetnick N, Shizuru J, Liggit D, et al. Loss of pancreatic islet tolerance induced by b-cell expression of interferon-g. Nature 1990; 346:844-847.

17. Colman PG, Stewart V, Kean J, et al. Comparison of two commonly used standard IVGTT's. Diabetes Care 1992; 15:1053-1055.

18. Eisenbarth GS, Gianani R, Pugliese A, Verge CF, Pietropaolo M. Prediction and prevention of type I diabetes. Transplant Proc 1994; 26:361-362.

19. Keller RJ, Eisenbarth GS, Jackson RA. Insulin prophylaxis in individuals at high risk of type 1 diabetes. Lancet 1993; 341:927-928.

20. Lewis CM, Canafax DM, Sprafka JM, Barbosa JJ. Double-blind randomized trial of nicotinamide on early-onset diabetes. Diabetes Care 1992; 15:121-123.

21. Kostraba JN, Cruickshanks KJ, Lawler-Heavner J, et al. Early exposure to cow's milk and solid foods in infancy, genetic predisposition, and risk of IDDM. Diabetes 1993; 42:288-295.

22. Reichard P, Nilsson BY, Rosenqvist U. The effect of long-term intensified insulin treatment on the development of microvascular complications of diabetes mellitus. New England J Med 1993; 329:304-309.

23. DCCT Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependant diabetes mellitus. New England J Med 1993; 329:977-986.

24. Krolewski AS, Laffel LMB, Krolewsji M, Quinn M, Warram JH. Glycosylated hemoglobin and the risk of microalbuminuria in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. New England J Med 1995; 332:1251-1255.

25. Saudek CD, Selam JL, Pitt HA, Jeandidier N. A preliminary trial of the programmable implantable medication system for insulin delivery. New England J Med 1989; 321:574-579.

26. Bell DSH. Insulin pump therapy for the 90s. The Endocrinologist 1994; 4:270-278.

27. Lefebvre P. Le diabète vaincu avant l'an 2000. médecine/sciences 1991; 7:208-210.

28. Sutherland DER. Pancreas transplants. Br J Surg 1994; 81:2-4.

29. Robertson RP, Sutherland DER. Pancreas transplantation as therapy for diabetes mellitus. Annu Rev Med 1992; 43:395-415.

30. Elahi D, McAloon-Dyke M, Clark BA, et al. Sequential evaluation of islet cell responses to glucose in the transplanted pancreas in humans. Am J Surg 1993; 165:15-22.

31. Fioretto P, Mauer SM, Bilous RW, Goetz FC, Sutherland DER, Steffes MW. Effects of pancreas transplantation on glomerular structure in insulin-dependent diabetic patients with their own kidneys. Lancet 1993; 342:1193-1196.

32. Ramsay RC, Goetz FC, Sutherland DER, Mauer SM, Robinson LL, Robertson RP. Progression of diabetic retinopathy after pancreas transplantation for IDDM. New England J Med 1988; 318:208-214.

33. Kennedy WR, Navarro X, Goetz FC, Sutherland DER, Najarian JS. Effects of pancreatic transplantation on diabetic neuropathy. New England J Med 1990; 322:1031-1037.

34. Larsen JL, Stratta RJ, Ozaki CF, Taylor RJ, Miller SA, Duckkworth WC. Lipid status after pancreas-kidney transplantation. Diabetes Care 1992; 15:35-42.

35. Sollinger HW, Ploeg RJ, Eckhoff DE, et al. Two hundred consecutive simultaneous pancreas-kidney transplants with bladder drainage. Surgery 1993; 114:736-744.

36. Pyke D. Pancreas transplantation. Acta Diabetol Lat 1991; 7:15-14.

37. Kahn CR. Diabetes and the endocrine pancreas . Curr Opin Endocrinol Diabetology 1994; 219-220.

38. Mintz DH, Alejandro R. Islet cell transplantation: A historical perspective. In: Ricordi C, ed. Pancreatic Islet Cell Transplantation. Austin: R.G. Landes Company, 1992:1-6.

39. Ballinger WF, Lacy PE. Transplantation of intact pancreatic islets in rats. Surgery 1972; 72:175-186.

40. Sutherland DER, Matas AJ, Goetz FC, Najarian JS. Transplantation of dispersed pancreatic islet tissue in humans; autografts and allografts. Diabetes 1980; 29(1):31-44.

41. Farney AC, Najarian JS, Nakhleh RE, et al. Autotransplantation of dispersed pancreatic islet tissue combined with total or near total pancreatectomy for treatment of chronic pancreatitis. Surgery 1991; 110:427-439.

42. Pyzdrowski KL, Kendall DM, Halter JB, Nakhleh RE, Sutherland DER, Robertson RP. Preserved insulin secretion and insulin independence in recipients of islet autografts. New England J Med 1992; 327:220-226.

43. London NJM, Robertson GSM, Chadwick DR, Johnson PRV, James RFL, Bell PRF. Human pancreatic islet isolation and transplantation. Clin Transplant 1994; 8:421-459.

44. Ricordi C, Lacy PE, Finke EH, Olack BJ, Scharp DW. Automated method for isolation of human pancreatic islets. Diabetes 1988; 37:413-420.

45. Tzakis AG, Ricordi C, Alejandro R. Pancreatic islet transplantation after upper abdominal exenteration and liver replacement. Lancet 1990; 336:402-405.

46. Scharp DW, Lacy PE, Santiago JV, et al. Insulin independence after islet transplantation into type 1 diabetic patient. Diabetes 1990; 39:15-18.

47. Scharp DW, Lacy PE, Santiago JV, et al. Results of our first nine intraportal islet allografts in type 1 insulin-dependent diabetic patients. Transplantation 1991; 51:76-85.

48. Warnock GL, Kneteman NM, Ryan EA, Rabinowitch A, Rajotte RV. Long-term follow-up after transplantation of insulin-producing pancreatic islets into patients with type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. Diabetologia 1992; 35:89-95.

49. Alejandro R, Burke G, Shapiro ET, et al. Long-term survival of intraportal islet allografts in type I diabetes mellitus. In: Ricordi C, ed. Pancreatic islet cell transplantation. Austin: R.G. Landes Company, 1992:410-413.

50. Gores PF, Najarian JS, Stephanian E, Lloveras JJ, Kelley SL, Sutherland DER. Insulin independence in type 1 diabetes after transplantation of unpurified islets from single donor with 15-deoxyspergualin. Lancet 1993; 341:19-21.

51. Socci C, Falqui L, Davalli AM, et al. Fresh human islet transplantation to replace pancreatic endocrine function in type 1 diabetic patients. Acta Diabetol Lat 1991; 28:151-157.

52. Hering BJ, Watz B, Bretzel RG, Schultz AO, Vietke R, Federlin K. Newsletter n°4. International Islet Transplant Registry 1994; 4:

53. Alejandro R. Transplantation of islets of Langerhans in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. Scand J Gastroentero 1995; 30 (suppl. 208):125-128.

54. Armitage JO. Bone marrow transplantation. New England J Med 1994; 330:827-835.

55. Hoffer BJ, Horne GV. Survival of dopaminergic neurons in fetal-tissue grafts. New England J Med 1995; 332:1163-1164.

56. Mankin HJ. Chondrocyte transplantation. One answer to an old question. New England J Med 1994; 331:940-941.

57. Kedinger M, Haffen K, Grenier J, Eloy R. In vitro culture reduces immunogenicity of pancreatic endocrine islets. Nature 1977; 270:736-738.

58. Scharp DW, Lacy PE, Finke E, Olack B. Low-temperature culture of human islets isolated by the distention method and purified with Ficoll or Percoll gradients. Surgery 1987; 102:869-879.

59. Hardy MA, Reemtsma K, Lau HT. Induction of indefinite rat islet allograft survival with direct ultraviolet irradiation and pretransplant cyclosporine. Diabetes 1985; 29(1):31-44.

60. Faustman D, Hauptfeld V, Lacy PE, Jopseph D. Prolongation of murine islet allograft survival by pretreatment of islets with antibody directed to Ia determinants. Proc Natl Acad Sci USA 1981; 78:5156-5158.

61. Roark JH, Posselt AM, Campos L, et al. Prolongation of rat pancreatic islet allograft survival by anti-cd2 monoclonal antibody treatment. Transplantation 1992; 54:1098-1099.

62. Posselt AM, Barker CF, Tomaszewski JE, Markmann JF, Choti MI, Naji A. Induction of donor-specific unresponsiveness by intrathymic islet transplantation. Science 1990; 249:1293-1295.

63. Posselt AM, Odorico JS, Barker CF, Naji A. Promotion of pancreatic islet allograft survival by intrathymic transplantation of bone marrow. Diabetes 1992; 41:771-775.

64. Qian T, Schachner R, Brendel M, Shen Kong S, Alejandro R. Induction of donor-specific tolerance to rat islet allografts by intrathymic inoculation of solubilized spleen cell membrane antigens. Diabetes 1993; 42:1544-1546.

65. Reach G. Bioartificial pancreas. Transplant Proc 1994; 26:397-398.

66. Scharp DW, Swanson CJ, Olack BJ, et al. Protection of encapsulated human islets implanted without immunosuppression in patients with type I or type II diabetes and in nondiabetic control subjects. Diabetes 1994; 43:1167-1170.

67. Hering BJ, Browatzki CC, Schultz AO, Bretzel RG, Federlin K. Islet transplant registry report on adult and fetal islet allografts. Transplant Proc 1994; 26:565-568.

68. Skandalakis LJ, Rowe JS, Gray SW, Skandalakis JE. Surgical embryology and anatomy of the pancreas. Surg Clin N Am 1993; 73:661-691.

69. Laguesse GE. Structure et développement du pancréas d'après les travaux les plus récents. J Anat Physiol 1894; 30:591-608.

70. Bonner-Weir S. The microvasculature of the pancreas, with emphasis on that of the islets of Langerhans. Anatomy and functional implications. In: Go VLW, Dimagno EP, Gardner JD, Lebenthal E, Reber HA, Scheele GA, eds. The Pancreas Biology, Patholbiology, and Disease. 2nd ed. New York: Raven Press, Ltd, 1993:759-768.

71. Ogilvie RF. A quantitative estimation of the pancreatic islet tissue. Q J Med 1937; 6:287-300.

72. Kaihoh T, Takayu ki M, Nolonaki S, Takahashi T. The site and number of Langerhans islets correlated in their endocrine function : a morphometry on immunostained serial sections of adult human pancreata. Tohoku J Exp Med 1986; 149:1-10.

73. Weir GC, Bonner-Weir S. Islets of Langerhans: the puzzle of intraislet interactions and their prevalence to diabetes. J Clin Invest 1990; 85:983-984.

74. Pipeleers D, Intveld P, Maes E, Van De Winkel M. Glucose-induced insulin release depends on functional cooperation between islet cells. Proc Natl Acad Sci USA 1982; 79:7322-7325.

75. Schein P, Cooney D, Vernon L. Protection against streptozotocin induced diabetes. Cancer Res 1967; 27:2324-2326.

76. Bagtens D, Mailaisse--Lagae F, Perrelet A, Orci L. Endocrine pancreas: three dimensional reconstruction shows two types of islets of Langerhans. Science 1979; 206:1323-1325.

77. Williams JA, Goldfine ID. The insulin-acinar relationship. In: Go VLW, Dimagno EP, Gardner JD, Lebenthal E, Reber HA, Scheele GA, eds. The Pancreas Biology, Pathobiology and Disease. 2nd ed. New York: Raven press, 1993:789-802.

78. Owyang C. Endocrine changes in pancreatic insufficiency. In: Go VLW, Dimagno EP, Gardner JD, Lebenthal E, Reber HA, Scheele GA, eds. The Pancreas Biology, Pathobiology, and Disease. 2nd ed. New York: Raven Press, Ltd, 1993:803-814.

79. Walker ET, Barr PJ, Rutter WJ. Cell specific expression of the rat insulin gene: evidence for the role of two distinct 5' flanking elements. Science 1985; 230:912-916.

80. Bendayan M. Secretion d'insuline: parcours intracellulaire et cheminement extracellulaire. médecine/sciences 1993; 9:563-570.

81. Caroll PB. Anatomy and physiology of islets of Langerhans. In: Ricordi C, ed. Pancreatic islet cell transplantation. Austin: R.G.Landes Compagny, 1992:7-18.

82. Bensley RR. Studies on the pancreas of the guinea pig. Am J Anat 1911; 12:297-388.

83. Hellerstrom C. A method for the microdissection of intact pancreatic islets of mammals. Acta Endocrin 1964; 45:122-132.

84. Moskalewski S. Isolation and culture of the islets of Langerhans of the guinea pig. Gen Comp Endocr 1965; 5:342.

85. Lacy PE, Kostianovsky M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. Diabetes 1967; 16:35.

86. Lindall A, Steffes M, Sorensen R. Immunoassayable insulin content of subcellular fractions of rat islets. Endocrinology 1969; 85:218-223.

87. Ashcroft SJH, Bassett JM, Randle PJ. Isolation of human pancreatic islets capable of releasing insulin and metabolizing glucose in vitro. Lancet 1971; 1:888-889.

88. Scharp DW. Isolation and transplantation of islet tissue. World J Surg 1984; 8:143-151.

89. Scharp DW, Downing R, Merrell RC, Greider M. Isolating the elusive islet. Diabetes 1980; 29 (suppl.1):19-30.

90. Horaguchi A, Merrell RC. Preparation of viable islet cells from dogs by a new method. Diabetes 1981; 30:455-458.

91. Gray DWR, McShane P, Grant A, Morris PJ. A method for isolation of islets of Langerhans from the human pancreas. Diabetes 1984; 33:1055-1061.

- 92. Ricordi C, Finke EH, Lacy PE. A method for the mass isolation of islets from the adult pig pancreas. Diabetes 1986; 35:649-653.
- 93. Gray DWR, Warnock GL, Sutton R. Successful autotransplantation of isolated islets of Langerhans in the cynomolgus monkey. Br J Surg 1986; 73:850-853.
- 94. Alejandro R, Mintz DH, Noel J, et al. Islet cell transplantation in type I diabetes mellitus. Transplant Proc 1987; 19:2359-2361.
- 95. Kuhn F, Schultz HJ, Lorenz D. Morphological investigations in human islet of Langerhans isolated by the velcro-technic. Biomed Biochim Acta 1985; 44:49-53.
- 96. Lacy PE, Scharp DW. Human islet transplantation in patients with type I diabetes. Annu Rev Med 1986; 37:33-40.
- 97. Warnock GL, Ellis DK, Cattral M, Untch D, Kneteman NM, Rajotte RV. Viable purified islets of Langerhans from collagenase-perfused human pancreas. Diabetes 1989; 38(suppl. 1):136-139.
- 98. Warnock GL, Ellis D, Rajotte RV, Dawidson I, Baekkeskov S, Egebjerg J. Studies of the isolation and viability of human islets of Langerhans. Transplantation 1988; 45:957-963.
- 99. Warnock GL, Gray DW, McShane P. Survival of cryopreserved isolated adult human pancreatic islets of Langerhans. Transplantation 1987; 44:75-78.
- 100. London NJM, Lake SP, Wilson J, et al. A simple method for the release of islets by controlled collagenase digestion of the human pancreas. Transplantation 1990; 49:1109-1113.
- 101. Ricordi C, Tzakis AG, Carroll PB, et al. Human islet isolation and allotransplantation in 22 consecutive cases. Transplantation 1992; 53:407-411.
- 102. London NJM, James RFL, Robertson GSM, et al. Human islet transplantation: The Leicester experience. In: Ricordi C, ed. Pancreatic Islet Cell Transplantation. Austin: R.G. Landes Company, 1992:454-461.
- 103. Shapiro AMJ, Lakey JRT, Rajotte RV, et al. Portal vein thrombosis after transplantation of partially purified pancreatic islets in a combined human liver/islet allograft. Transplantation 1995; 59:1060-1063.
- 104. Atiya A, Mullen Y, Stock P, Passaro E, Brunicardi FC. The University of California islet transplant consortium clinical islet transplant experience. Surgery 1995; (in press)
- 105. Mirkovitch V, Campiche M. Intrasplenic autotransplantation of canine pancreatic tissue maintenance of normoglycaemia after total pancreatectomy. J Surg Res 1977; 9:173-190.
- 106. Mittal VK, Toledo-pereyra LH, Sharma M, et al. Acute portal hypertension and disseminated intravascular coagulation following pancreatic islet autotransplantation after subtotal pancreatectomy. Transplantation 1981; 31:302-303.

- 107. Toledo- Pereyra LH, Rowlett AL, Cain W, Rosenberg JC, Gordon DA, MacKenzie GH. Hepatic infarction following intraportal islet cell autotransplantation after near total pancreatectomy. Transplantation 1984; 38:88-89.
- 108. Gotoh M, Maki T, Porter J, Satomi S, Monaco AP. Effect of contaminating lymph nodes, ductal and vascular tissue, and exocrine tissue on the survival of purified pancreatic islet allografts. Transplant Proc 1986; 18:1848-1850.
- 109. Gray DWR, Sutton R, McShane P, Peters M, Morris PJ. Exocrine contamination impairs implantation of pancreatic islets transplanted beneath the kidney capsule. J Surg Res 1988; 45:432-442.
- 110. London NJM, James RFL, Bell PRF. Islet purification. In: Ricordi C, ed. Pancreatic Islet Cell Transplantation. Austin: R.G. Landes Company, 1992:113-123.
- 111. Lucas-Clerc C, Massart C, Campion JP, Launois B, Nicol M. Long-term culture of human pancreatic islets in an extracellular matrix : morphological and metabolic effects. Mol Cell Endocrinol 1993; 94:9-20.
- 112. Cugnenc PH, Bethoux JP, Altman JJ, et al. Implantation d'îlots pancréatiques en site artériolaire épiploïque; note préliminaire à propos de 3 cas. Chirurgie (Paris) 1992; 116:268-274.
- 113. Dobroschke J, Langhoff G, Seked AS. Isolation of human islet of Langerhans. In: Federlin K, Bretzel RG, eds. Islet isolation, Culture and Cryopreservation. New York: Thieme-Stratton, 1981:32-39.
- 114. Scharp DW, Lacy PE, Ricordi C, et al. Human islet transplantation in patients with type 1 diabetes. Transplant Proc 1989; 21:2744-2745.
- 115. Gray DWR, Gohde W, Carter N, Heiden T, Morris PJ. Separation of pancreatic islets by fluorescence-activated sorting. Diabetes 1989; 38(suppl.1):133-135.
- 116. Winoto-Morbach S, Ulrichs K, Leyhausen G, Muller-Ruchholtz W. New principle for large-scale preparation of purified human pancreas islets. Diabetes 1989; 38:146-149.
- 117. Pretlow TG, Pretlow TP. Sedimentation of cells: an overview and discussion of artifacts. In: Pretlow TG, Pretlow TP, eds. Cell Separation: Methods and Selected Applications. San Diego: Academic Press, 1982:41-60.
- 118. Jindal R, Gray D. Preservation and storage of pancreatic islets. Transplantation 1994; 57:317-321.
- 119. Kneteman NM, Alderson D, Scharp DW, Lacy PE. Long-term cryogenic storage of purified adult human islets of Langerhans. Diabetes 1989; 38:386-396.
- 120. London NJM, Contractor H, Lake SP, Aucott GC, Bell PRF, James RFL. A fluorometric viability assay for single human and rat islets. Horm Metab Res 1990; 25 (suppl):82-87.
- 121. Lakey JRT, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV. Effects of pre-cryopreservation culture on human islet recovery and in vitro function. Transplant Proc 1994; 26:820.
- 122. Delfino VDA, Gray DWR, Leow CK, Shimizu S, Ferguson DJP, Morris PJ. A comparison of four solutions for cold storage of pancreatic islets. Transplantation 1993; 56:1325-1330.
- 123. Simeonovic CJ, Bowen KM, Kotlarski I, Lafferty KJ. Modulation of tissue immunogenicity by organ culture. Comparison of adult islets and fetal pancreas. Transplantation 1980; 30:174-179.
- 124. Rabinovitch A, Alejandro R, Noel J, Brunschwig JP, Ryan US. Tissue culture reduces Ia antigen-bearing cells in rat islets and prolongs islet allograft survival. Diabetes 1982; 31(suppl):48-54.
- 125. Andersson A, Borg H, Groth CG, et al. Survival of isolated human islet of Langerhans maintained in tissue culture. J Clin Invest 1976; 57:1295-1301.
- 126. Andersson A. Isolated mouse pancreatic islets in culture: effects of serum and different culture media on the insulin production of the islets. Diabetologia 1978; 14:397-404.
- 127. Nielsen JH, Brundstedt J, Andersson A, Frimodt-Moller C. Preservation of beta cell function in adult human pancreatic islets for several months in vitro. Diabetologia 1979; 16:97-100.
- 128. Latif ZA, Noel J, Alejandro R. A simple method of staining fresh and cultured islets . Transplantation 1988; 45:827-829.
- 129. Olack B, Swanson C, McLear M, Longwith J, Scharp D, Lacy PE. Islet purification using Euro-Ficoll gradients. Transplant Proc 1991; 23:774-776.
- 130. Marchetti P, Scharp DW, Longwith J, et al. Prevention of contamination of isolated porcine islets of Langerhans. Transplantation 1992; 53:1364-1366.
- 131. Scharp DW. Islet quality control testing and the islet isolation laboratory. In: Ricordi C, ed. Pancreatic Islet Cell Transplantation. 1892-1992. Austin: R.G. Landes Company, 1992:82-88.
- 132. Ricordi C, Gray DWR, Hering BJ, et al. Islet isolation assessment in man and large animals. Acta Diabetol Lat 1990; 27:185-195.
- 133. Ricordi C. Quantitative and qualitative standards for islet isolation assessment in humans and large mammals. Pancreas 1991; 6:242-244.
- 134. Bretzel RG, Alejandro R, Hering BJ, Van Suylichem PTR, Ricordi C. Clinical islet transplantation: Guidelines for islet quality control. Transplant Proc 1994; 26:388-392.
- 135. Andersson A, Hellerstrom C. Metabolic characteristics of isolated pancreatic islets in tissue culture. Diabetes 1972; 21(Suppl.2):546-554.
- 136. Karsten U, Wollenberger A. Improvements in the ethidium bromide method for direct fluorometric estimation of DNA and RNA in cell and tissue homogenates. Anal Biochem 1977; 77:464-470.
- 137. Haycock K, Roth J, Gagnon J, Finger WF, Soper C. Statview. Berkeley: Abacus Concepts, 1992:1-125.
- 138. Van Deijnen JHM, Hulstaert CE, Wolters GHJ, Van Schilfgaarde R. Significance of the peri-insular extracellular matrix for islet isolation from the pancreas of rat, dog, pig, and man. Cell Tissue Res 1992; 267:139-146.
- 139. Van Deijnen JHM, Van Suylichem PTR, Wolters GHJ, Van Schilfgaarde R. Distribution of collagens type I, type III and type V in the pancreas of rat, dog, pig and man. Cell Tissue Res 1994; 277:115-121.

- 140. Warnock GL, Seelis REA, Kneteman NM, Rajotte RV. Studies of the Isolation and transplantation of Human Islets in adult humans. Transplant Proc 1991; 23:787-788.
- 141. Vives M, Sarri Y, Conget I, et al. Human islet function after automatic isolation and bovine serum albumin gradient purification. Transplantation 1992; 53:243-245.
- 142. Socci C, Davalli AM, Vignali A, et al. A significant increase of islet yield by early injection of collagenase into the pancreatic duct of young donors. Transplantation 1993; 55:661-663.
- 143. Kneteman NM, Lakey JRT, Kisilisik TA, Ao Z, Warnock GL, Rajotte RV. Cadaver pancreas recovery technique. Impact on islet recovery and in vitro function. Transplantation 1994; 58:1114-1117.
- 144. Robertson GSM, Chadwick D, Thirdborough S, et al. Human islet isolation-A prospective randomized comparison of pancreatic vascular perfusion with hyperosmolar citrate or University of Wisconsin solution. Transplantation 1993; 56:550-553.
- 145. Wind P, Race JM, Legrelle M, et al. Isolement, purification, et cryoconservation d'îlots de Langerhans humains. Diabete Metab 1994; 20:20.(abstract)
- 146. Casanova D, Xenos E, Lloveras JJ, et al. Comparison of human islet isolation from the stored and nonstored pancreas with two different protocols using UW Solution. Transplant Proc 1994; 26:588.
- 147. Andereggen E, Deng S, Janjic D, et al. Human islet and cryopreservation. Horm Metab Res 1995; 27(suppl):50.(abstract)
- 148. Cugnenc PH, Bethoux JP, Tessier C, et al. Human islet isolation: A 40 pancreas experience. Horm Metab Res 1990; 25(suppl):34-35.
- 149. Sutton R, Hammonds P, Hughes D, Clarck A, Gray DWR, Morris PJ. Human pancreatic islet isolation with increased incubation temperatures and variable density gradients. Transplant Proc 1990; 22:758-759.
- 150. Benhamou PY, Watt PC, Mullen Y, et al. Human islet isolation in 104 consecutive cases factors affecting success. Transplantation 1994; 57:1804-1810.
- 151. Weide LG, Damon-Burke M, Warkentin PI. Semiclosed system for human and porcine islet isolation using the COBE 2991 cell processor with the triple bag processing sets. Transplant Proc 1994; 26:608-609.
- 152. Ketchum RJ, Nicolae M, Jahr H, et al. Analysis of donor age and cold ischemia time as factors in cadaveric human islet isolation. Transplant Proc 1994; 26:596-597.
- 153. Zeng Y, Torre MA, Karrison T, Thistlethwaite JR. The correlation between donor characteristics and the success of human islet isolation. Transplantation 1994; 57:954-958.
- 154. Brandhorst H, Hering BJ, Brandhorts D, Federlin K, Bretzel RG. Impact of cold ischemia and timing of intraductal collagenase distension on human islet yeld, purity, viability, and survival in low temperature culture. Transplant Proc 1994; 26:590-591.
- 155. Behboo R, Caroll PB, Ukah F, et al. One-hour of hypothermic incubation in Eurocollins . improves islet purification. Transplant Proc 1994; 26:645.
- 156. Socci C, Ricordi C, Davalli A. Selection of donors significantly improves pig islet isolation yield. Horm Metab Res 1990; 25 (suppl):32.

- 157. Ricordi C. The automated method for islet isolation. In: Ricordi C, ed. Pancreatic islet cell transplantation. Austin: R.G. Landes Company, 1992:99-113.
- 158. Ricordi C, Socci C, Davalli AM, et al. Effect of pancreas retrieval procedure on islet isolation in the swine. Transplant Proc 1990; 22:442-443.
- 159. Lakey JRT, Kizilisik TA, Rajotte RV, Ao Z, Warnock GL, Kneteman NM. Prospective evaluation of two techniques for human pancreas recovery before islet isolation. Transplant Proc 1994; 26:589.
- 160. Korbutt GS, Pipeleers DG. Cold storage of rat pancreas before purification of islet b-cells. Diabetes 1992; 41:299-307.
- 161. Kneteman NM, Warnock GL, Evans MG, Dawidson I, Rajotte RV. Islet isolation from human pancreas stored in UW solution for 6 to 26 hours. Transplant Proc 1990; 22:763-764.
- 162. Munn SR, Kaufman DB, Fiels MJ, Viste AB, Sutherland DER. Cold-storage preservation of the canine and rat pancreas prior to islet isolation. Transplantation 1989; 47:28-31.
- 163. Zheng T, Lanza RP, Soon-Shiong P. Prolonged pancreas preservation using a simplified UW solution containing polyethylene glycol. Transplantation 1991; 51:63-66.
- 164. Lakey JRT, Rajotte RV, Warnock GL, Kneteman NM. Human pancreas preservation prior to islet isolation: cold ischemic tolerance. Transplantation 1995; 59:689-694.
- 165. Lakey JRT, Wang LCH, Rajotte RV. Optimal temperature in short-term hypothermic preservation of rat pancreas. Transplantation 1991; 51:977-981.
- 166. Belzer FO, Southard JH. Principles of solid organ preservation by cold storage. Transplantation 1988; 45:673-678.
- 167. Ozhato H, Gotoh M, Monden M. Intraductal injection of collagenase solution at the time of harvesting : a possible solution for preservation and collagenase digestion. Transplant Proc 1990; 22:782-783.
- 168. Brandhorst H, Hering BJ, Brandhorst D, Federlin K, Bretzel RG. Impact of cold ischemia and timing of intraductal collagenase distension on human islet yield, purity, viability, and survival in low temperature culture. Transplant Proc 1994; 26:590-591.
- 169. Ricordi C, Alejandro R, Zeng Y, et al. Human islet isolation and purification from pediatric-aged donors. Transplant Proc 1991; 23:783-784.
- 170. Schwartz BD, Traverso W. Morphological changes in pancreatic fragments prepared for transplantation by collagenase treatment. Transplantation 1984; 38:273-280.
- 171. Gullo L, Priori P, Scarpignato C, Baldoni F, Mattioli G, Barbara L. Effect of Somatostatin 14 on pure human pancreatic secretion. Dig Dis Sci 1987; 32:1065-1070.
- 172. Van Schilfgaarde R, Wolters GHJ, Vos-Scheperkeuter GH, Van Suylichem PTR. Requirements for selective enzymatic pancreatic dissociation. Transplant Proc 1994; 26:393-394.
- 173. Hering BJ, Muench K P, Schelz J, . The evaluation of neutral density separation utilizing ficoll-sodium diatrizoate and nycodenz and centrifugal elutriation in the purification of bovine and canine islet preparation. Horm Metab Res 1990; 25(suppl):57-63.

- 174. Jiao L, Gray WR, Gohde W, Flynn GJ, Morris PJ. In vitro staining of islets of Langerhans for fluorescence-activated cell sorting. Transplantation 1991; 52:450-452.
- 175. Fujioka T, Terasaki PI, Heintz R, et al. Rapid purification of islets using magnetic microspheres coated with anti-acinar cell monoclonal antibodies. Transplantation 1990; 49:404-407.
- 176. Davies JE, James RFL, London NJM, Robertson GSM. Optimization of the magnetic field used for immunomagnetic islet purification. Transplantation 1995; 59:767-771.
- 177. Brunicardi FC, Oh Y, Shevlin L, et al. Laser destruction of human islet pancreatic tissue. Transplant Proc 1994; 26:3354-3355.
- 178. Hehmke B, Kohnert KD, Odselius R. The use of a new dextran gradient medium for rapid isolation of functionally intact neonatal rat pancreatic islets. Diabetes Research 1986; 3:13-16.
- 179. Lake SP, Anderson J, Chamberlain J, Gardner SJ, Bell PRF, James RFL. Bovine serum albumin density gradient isolation of rat pancreatic islets. Transplantation 1987; 43:805-808.
- 180. Tze WJ, Wong FC, Tingle AJ. The use of hypaque-ficoll in the isolation of pancreatic islets of rats. Transplantation 1976; 22:201-205.
- 181. Raydt G. Isolation of functionally intact pancreatic islets by centrifugation in metrizamide gradients. Z Phys Chem 1977; 358:1369-1373.
- 182. Van Der Burg MPM, Gooszen HG, Ploeg RJ, et al. Comparison of islet isolation techniques in dogs : Over 90% purified islets using UW solution. Transplant Proc 1990; 22:795-796.
- 183. Arbet-Engels C, Darquy S, Capron F, Reach G. Use of an intracellular solution (University of Wisconsin) for all steps of the isolation of pancreatic islets. Transplant Proc 1992; 24:2791-2792.
- 184. Robertson GSM, Chadwick D, Contractor H, et al. Storage of human pancreatic digest in University of Wisconsin solution significantly improves subsequent islet purification. Br J Surg 1992; 79:899-902.
- 185. Robertson GSM, Chadwick DR, Davies J, et al. The effectiveness of components of University of Wisconsin solution in improving human pancreatic islet purification. Transplantation 1994; 57:346-354.
- 186. Lake SP, Bassett D, Larkins A. Large-scale purification of human islets utilizing discontinuous albumin gradients on IBM 2991 cell separator. Diabetes 1989; 38(suppl 1):143-146.
- 187. Webster PD, Black O, Mainz DL, Singh M. Pancreatic acinar metabolism and function. Gastroenterology 1977; 73:1434-1449.
- 188. Lake SP, Chamberlain J, Walczak K, Bell PRF, James RFL. A test gradient system for optimizing density gradient isolation of pancreatic islets. Transplantation 1989; 48:354-357.
- 189. Kerr-Conte J, Pattou F, Xia Y, Proye C, Lefebvre J. Simple dithizone-stained multilayer test for selection of density gradient before human islet mass purification. Transplant Proc 1994; 26:4013-4015.

- 190. Gray DWR. The role of exocrine tissue in pancreatic islet transplantation. Transplant Int 1989; 2:41-45.
- 191. Gotoh M, Maki T, Satomi S, Porter J, Monaco AP. Immunological characteristics of purified pancreatic islet grafts. Transplantation 1986; 42:387-390.
- 192. Gores PF, Mayoral J, Field MJ, Sutherland DER. Comparison of immunogenicity of purified and unpurified pancreatic islet grafts. Transplantation 1986; 41:529-531.
- 193. Pipeleers DG, Pipeleers-Marichal M, Vanbrabandt B, Duys S. Transplantation of purified islet cells in diabetics rats. II. Immunogenicity of allografted beta-cells. Diabetes 1991; 40:920-938.
- 194. Stock PG, Ascher NL, Chen S, Field J, Bach FH, Sutherland DER. Evidence for direct and indirect pathways in the generation of the alloimmune response against pancreatic islets. Transplantation 1991; 52:704-709.
- 195. Gores PF, Sutherland DER. Pancreatic islet transplantation: is purification necessary? Am J Surg 1993; 166:538-542.
- 196. Hesse UJ, Sutherland DE, Gores PF, Sitges-Serra A, Najarian JS. Comparison of splenic and renal subcapsular islet autografting in dogs. Transplantation 1986; 41:271.
- 197. Steer ML, Waxman I, Freedman S. Chronic pancreatitis. New England J Med 1995; 332:1482-1490.
- 198. Mehigan DG, Bell WR, Zuidema GD, Eggleston JC, Cameron JL. Disseminated intravascular coagulation and portal hypertension following pancreatic islet autotransplantation. Ann Surg 1980; 191:287-291.
- 199. Wahoff DC, Sutherland DER, Hower CD, Lloveras JK, Gores PF. Free intraperitoneal islet autografts in pancreatectomized dogs. Impact of islet purity and posttransplantation exogenous insulin. Surgery 1994; 116:742-750.
- 200. Feetterhoff TJ, Wile KJ, Coffing D, Cavanagh T, Wright MJ. Quantitation of isolated pancreatic islets using imaging technology. Transplant Proc 1994; 26:3351.
- 201. Amin MR, Rigel d'Lagey C, Ockleford CD, London NJM, Bell PRF, James RFL. Optimisation of the conditions for the use of confocal laser scanning microscopy to study islet viability following culture in vitro. Horm Metab Res 1995; 27:52.(abstract)
- 202. Hopcroft DW, Mason DR, Scott RS. Insulin secretion from perifused rat pancreatic pseudoislets. In Vitro Cell Dev B 1985; 21:421-420.
- 203. James RFL, Holmes MA, Chadwick DR, Bell PRF, London NJM. Tissue culture of rat, porcine and human islets of Langerhans: a comparison of ten different media. Horm Metab Res 1995; 26:69.(abstract)
- 204. Brunstedt J, Nielsen JH. Long-term effect of pH on b-cell function in isolated islets of Langerhans in tissue culture. Diabetologia 1980; 15:181-185.
- 205. Hales CN, Milner DG. Cations and the secretion of insulin from rabbit pancreas in vitro. J Physiol 1968; 199:177-187.
- 206. Goldman H, Colle E. Human pancreatic islets in culture : effects of supplementing the medium with homologous and heterologous serum. Science 1976; 19:1014-1016.

- 207. Nielsen JH. Growth and function of the pancreatic B-cell in vitro: Effects of glucose, hormones and serum factors on mouse, rat and human pancreatic islets in organ culture. Acta Endocrin 1985; Suppl 266(105):1-38.
- 208. Kaiser N, Corcos AP, Tur-Sinai A, Ariav Y, Cerasi E. Monolayer culture of adult rat pancreatic islets on extracellular matrix: long term maintence of differentiated function. Endocrinology 1988; 123:834-835.
- 209. Kinard F, De Clercq L, Billen B, Amory B, Hoet JJ, Remacle C. Culture of endocrine pancreatic cells in protein-free chemically defined media. In Vitro Cell Dev B 1990; 26:1004-1010.
- 210. Clark ZA, Chick WL. Islet cell culture in defined serum-free media. Endocrinology 1990; 126:1895-1903.
- 211. Ling Z, Pipeleers DG. Preservation of glucose-responsive islet B-cells during serum-free culture. Endocrinology 1994; 134:2614-2621.
- 212. Behboo R, Carroll PB, Memarzadeh S, et al. Improved long-term culture of functional human islets in serum-free medium. Transplant Proc 1994; 26:3301-111.
- 213. Bottenstein J, Hqyashi I, Hutchings S, et al. The growth of cells in serum-free hormone-supplemented media. Methods in Enzymology 1979; 58:94-109.
- 214. Schatz H. Insulin. Biosynthese und sekretion . Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1976:
- 215. Nielsen JH. Human islets in tissue culture. In: Federlin K, Bretzel RG, eds. Islet isolation, culture and cryopreservation. Stuttgart: Georg Thieme, 1981:69-80.
- 216. Rastellini C, Cicalese U, Stenko RT, Starzl TE, Rao AS. Long term culture of viable human pancreatic islets in pyruvate rich culture medium. Transplant Proc 1995; (in press)
- 217. Nowak R. Xenotransplants set to resume. Science 1994; 266:1148-1151.
- 218. McEnzie IFC, Vaughan HA, Sandrin MS. How important are anti-Gala(1,3)Gal antibodies in pig-to-human xenotransplants? Xeno 1994; 2:107-109.
- 219. Ricordi C, Lacy PE, Sterbenz K, Davie JM. Low temperature culture of human islets or in vivo treatment with L3T4 antibody produces a marked prolongation of islet human-to-mouse xenograft survival. Proc Natl Acad Sci U S A 1987; 84:8080-8084.
- 220. Faustman D, Coe C. Prevention of xenograft rejection by masking donor HLA class I antigens. Science 1991; 252:1700-1702.
- 221. Lenschow DJ, Zeng Y, Thistlethwaite JR, et al. Long-term survival of xenogenic pancreatic islet grafts induced by CTLA4Ig. Science 1992; 257:789-792.
- 222. Zeng Y, Gage A, Montag A, Rothlein R, Thistlethwaite JR, Bluestone JA. Inhibition of transplant rejection by pretreatment of xenogeneic pancreatic islet cells with anti-ICAM-1 antibodies. Transplantation 1994; 58:681-689.
- 223. Kowalski ,L., Falqui L, Lacy PE, Scharp DW. Production of marked prolongation of survival of canine islet xenografts in mice by antilymphocyte sera and L3T4 antibody. Transplantation 1991; 51:1094-1097.

- 224. Goss JA, Finke EH, Wayne Flye M, Lacy PE. Induction of immune unresponsiveness to concordant islet xenografts by intrahepatic preimmunization and transient immunosuppression. J Clin Invest 1994; 93:1312-1314.
- 225. Groth CG, Korsgren O, Tollemar J, et al. Transplantation of porcine fetal pancreas to diabetic patients. Lancet 1994; 344:1402-1404.
- 226. Groth CG, Korsgren O, Tibell A, et al. Transplantation of porcine fetal pancreas to diabetic patients. Xeno 1994; 2:102-106.
- 227. Maki T, Ubhi H, Sanchez-Farpon H, et al. Successful treatment of diabetes with the biohybrid artificial pancreas in dogs. Transplantation 1991; 51:43-51.
- 228. Maki T, Lodge JPA, Carretta M, et al. Treatment of severe diabetes mellitus for more than one year using a vascularized hybrid artificial pancreas. Transplantation 1993; 55:713-718.
- 229. Lim F, Sun AM. Microencapsulated islets as a bioartificial endocrine pancreas. Science 1980; 210:908-910.
- 230. Clayton HA, London NJM, Bell PRF, James RFL. The transplantation of encapsulated islets of Langerhans into the peritoneal cavity of the biobreeding rat. Transplantation 1992; 54:558-560.
- 231. Fan MY, Lum ZP, Fu XW, Levesque L, Tai IT, Sun AM. Reversal of diabetes in BB rats by transplantation of encapsulated pancreatic islets. Diabetes 1990; 39:519-522.
- 232. Lum ZP, Tai IT, Krestow M, Norton J, Vacek I, Sun AM. Prolonged reversal of diabetic state in NOD mice by xenografts of microencapsulated rat islets. Diabetes 1991; 40:1511-1516.
- 233. Chen CF, Chern HT, Leu FJ, Chang TM, Shian LR, Sun AM. Xenotransplantation of microencapsulated canine islets into diabetic rats. Artif Organs 1994; 18:193-197.
- 234. Soon-Shiong P, Feldman E, Nelson R, et al. Long-term reversal of diabetes by the injection of immunoprotected islets. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90:5843-5847.
- 235. Soon-Shiong P, Heintz RE, Merideth N, et al. Insulin independence in a type 1 diabetic patient after encapsulated islet transplantation. Lancet 1994; 343:950-951.
- 236. Altman JJ, Houlbert D, Callard P, et al. Long-term plasma glucose normalization in experimental diabetic rats with macroencapsulated implants of benign human insulinomas. Diabetes 1986; 35:625-633.
- 237. Lacy PE, Hegre OD, Gerasimidi-Vazeou A, Gentile FT, Dionne KE. Maintenance of normoglycemia in diabetic mice by subcutaneous xenografts of encapsulated islets. Science 1991; 254:1782-1784.
- 238. Lanza RP, Beyer AM, Sttrauk JE, Chick WL. Biohybrid artificial pancreas. Long-term function of discordant islet xenograft in streptozotocin rats. Transplantation 1993; 56:1067-1072.
- 239. Lanza RP, Borland KM, Staruk JE, Appel MC, Solomon BA, Chick WL. Transplantation of encapsulated canine islets into spontaneously diabetic BB/Wor rats without immunosuppression. Endocrinology 1993; 131:637-642.
- 240. Lanza RP, Borland KM, Lodge P, et al. Treatment of severely diabetic pancreatectomized dogs using a diffusion-based hybrid pancreas. Diabetes 1992; 41:886-889.

- 241. Cosimi S, Marchetti P, Giannarelli R, et al. Insulin release in response to glucose from isolated mouse, rat, porcine, bovine, and human pancreatic islets. Transplant Proc 1994; 26:3421-3422.
- 242. Wright JR. Experimental transplantation using principal islets of teleost fish. In: Ricordi C, ed. Pancreatic islet cell transplantation. Austin: R.G.Landes Company, 1992:336-351.
- 243. Gray DWR. Islet isolation and transplantation techniques in the primates. Surg Gynecol Obstet 1990; 170:225-232.
- 244. Giannarelli R, Marchetti P, Cosimi S, Coppelli A, Lorenzetti M, Navalesi R. Large-scale preparation, in vitro function and xenotransplantation of bovine pancreatic islets. Transplant Proc 1995; 26:3410-3411.
- 245. Ricordi C, Socci C, Davalli AM, et al. Isolation of the elusive pig islet. Surgery 1990; 107:688-694.
- 246. Miller ER, Ullrey DE. The pig as a model for human nutrition . Annu Rev Nutr 1987; 7:361-382.
- 247. Sutherland DER, Steffes QW, Bauer GE, McManus D, Noe BD, Najarian JS. Isolation of human and porcine islets of Langerhans and islet transplantation in pigs. J Surg Res 1974; 16:102-111.
- 248. Kiviluoto T. Transplantation of pancreatic microfragments in totally pancreatectomized pigs. Eur Surg Res 1985; 17:119-127.
- 249. Wise MH, Yates A, Gordon C, Johnson RWG. Subzero preservation of mechanically prepared porcine islets of Langerhans: response to a glucose challenge in vitro. Cryobiology 1983; 20:211-218.
- 250. Ricordi C, Lacy PE. Renal subcapsular xenotransplantation of purified porcine islets. Transplantation 1987; 44:721-722.
- 251. Marchetti P, Zappella A, Giannarelli R, et al. Isolation of islets of Langerhans from the adult pig pancreas. Transplant Proc 1988; 20:707-708.
- 252. Hesse UJ, Danis J, Weyer J, Meyer G, Saad S. In vitro and in vivo studies for isolation, transplantation and function of islets of Langerhans in pigs (in german). Langenbecks Arch Chir 1990; 375:259-265.
- 253. Hesse UJ, Danis J, Meyer J, Saad S, Pichlmaier H. Preparation and transplantation of pancreatic islet tissue in Landrace pigs and the Munich miniature swine troll. Transplant Proc 1990; 22:793.
- 254. Finke E, Marchetti P, Falqui L, et al. Large scale isolation, function, and transplantation of islets of Langerhans from the adult pig pancreas. Transplant Proc 1991; 23:772-773.
- 255. Chadwick DR, Robertson GSM, Rose S, et al. Storage of porcine pancreatic digest prior to islet purification. The benefits of UW solution and the roles of its individual components. Transplantation 1993; 56:288-293.
- 256. Toomey P, Chadwick DR, Contractor H, Bell PRF, James RFL, London NJM. Porcine islet isolation: prospective comparison of automated and manual methods of pancreatic collagenase digestion. Br J Surg 1993; 80:240-243.

- 257. Heiser A, Ulrichs K, Müller-ruchholtz W. Isolation of porcine pancreatic islets: low trypsin activity during the isolation procedure guarantees reproducible high islet yields . Histopathology 1994;
- 258. Takei S, Teruya M, Grunewald A, Garcia R, Chan EK, Charles MA. Isolation and function of human and pig islets. Pancreas 1994; 9:150-156.
- 259. Strehl M, Haberstroh J, Finke M, et al. Morphology and function of pig islets of Langerhans after flow cytometry. Transplantation 1991;
- 260. Arbet-Engels C, Darquy S, Capron F, Reach G. Isolation of islets of Langerhans from the rat and pig pancreas using a modified UW solution from organ storage to islet purification. Diabete Metab 1993; 19:590-596.
- 261. Buhler L, Deng S, Mage R, Bubloz C, Rohner A, Morel Ph. Pig islet isolation: new aspects. Transplant Proc 1994; 26:628-629.
- 262. Davalli AM, Ogawa Y, Scaglia L, et al. Function, mass; and replication of porcine and rat islets transplanted into diabetic nude mice. Diabetes 1995; 44:104-111.
- 263. Al Abdullah IH, Kumar MSA, Abouna GM. Combined intraductal and interstitial distension of human and porcine pancreas with collagenase facilates digestion of pancreas and may improve islet yield. Transplant Proc 1994; 26:3384.
- 264. Mellert J, Hopt UT, Hering BJ, Bretzel RG, Federlin K. Influence of islet mass and purity on reversibility of diabetes in pancreatectomized pigs. Transplant Proc 1991; 23:1687-1689.
- 265. Alejandro R, Cutfield RG, Shienvold FL, et al. Natural history of intrahepatic canine islet cell autografts. J Clin Invest 1986; 78:1339-1348.
- 266. Kerr-Conte J, Pattou F, Hober C, et al. Induction of cerebral death in slaughterhouse pigs facilitates pancreas harvesting for islet isolation. Transplant Proc 1994; 26:614-615.
- 267. Morel P, Kaufmann DB, Matas AJ, et al. Total pancreatectomy in the pig for islets transplantation: Technical alternatives. Transplantation 1991; 52:11-15.
- 268. Lundbaeck K. Intravenous glucose tolerance as a tool in definition and diagnosis of diabetes mellitus. Br Med J 1962; 1:1507-1513.
- 269. Calafiore R, Cacinaro F, Basta G, et al. The massive separation of adult porcine islets of Langerhans. Horm Metab Res 1990; suppl25:30-31.
- 270. Downing R, Heald KA, Jay TR. Porcine islet isolation: prospective comparison of automated and manual methods of pancreatic collagenase digestion (letter). Br J Surg 1993; 80:1215.
- 271. Ricordi C, Socci C, Davalli AM, et al. Application of the automated method to islet isolation in swine. Transplant Proc 1990; 22:784-785.
- 272. Marchetti P, Finke EH, Gerasimidi-Vaseou A, Falqui L, Scharp DW, Lacy PE. Automated large-scale isolation, in vitro function and xenotransplantation of porcine islets of Langerhans. Transplantation 1991; 52:209-213.
- 273. Marchetti P, Giannarelli R, Villani G, et al. Collagenase distention, two-step sequential filtration, and histopaque gradient purification for consistent isolation of pure pancreatic islets from the market-age (6-month-old) pig. Transplantation 1994; 57:1532-1535.

- 274. Yamaguchi T, Mullen Y, Watanabe Y, Nomura Y, Cass D, Brunicardi C. Isolation and function of islets from young adult pig pancreas. Transplant Proc 1992; 24:1010-1012.
- 275. Heiser A, Ulrichs K, Müller-ruchholtz W. Influence of porcine strain, age and pH of the isolation medium on porcine pancreatic islet isolation success. Transp Proc 1994; 26:618-620.
- 276. Ricordi C, Socci C, Davalli AM, et al. Swine islet isolation and transplantation. Horm Metab Res 1990; 25(suppl):26-30.
- 277. Heald KA, Hail CA, Downing R. Comparison of porcine pancreatic ductal and interstitial collagenase injection in porcine islet isolation. Diabetic Med 1995; 9(suppl 2):37.
- 278. Contractor HH, Bhalla R, James R, Robertson GSM, Chadwick D, London NJM. Effect of University of Wisconsin solution and its components on the collagenase digestion of the porcine and the human pancreas. Transplant Proc 1994; 26:587-588.
- 279. Van Der Burg MPM, Gooszen HG, Ploeg RJ, et al. Pancreatic islet isolation with UW solution : A new concept. Transplant Proc 1990; 22:2050-2051.
- 280. Califiore R, Calcinaro F, Basta G. A method for the massive separation of highly purified, adult porcine islets of Langerhans. Metabolism 1990; 39:175-181.
- 281. De Nittis P, Socci C, Piemonti L, et al. Prospective study on early collagenase injection effects in pig islet isolation. Horm Metab Res 1995; 27:51.(abstract)
- 282. Wolters GHJ, Vos-Scheperkeuter GH, Deijnen JHM, vanSchilfgaarde R. An analysis of the role of collagenase and protease in the enzymatic dissociation of the rat pancreas for islet isolation. Diabetologia 1992; 35:735-737.
- 283. Wolters GHJ, Van Suylichem PTR, Van Deijnen JHM, Van Schilfgaarde R. Factors influencing the isolation process of islets of Langerhans. Horm Metab Res 1990; Suppl 25:20-26.
- 284. McShane P, Sutton R, Gray DWR, Morris PJ. Protease activation in pancreatic islet isolation by enzymatic digestion. Diabetes 1989; 38(Suppl 1):126-127.
- 285. Van Schilfgaarde R, Wolters GHJ, Vos-Scheperkeuter GH, Van Suylichem PTR. Influence of the collagenase/protease ratio and concentrations on pancreatic tissue dissociation. Transp Proc 1994; 26:393-394.
- 286. Vos-Scheperkeuter GH, Vonk MWA, Wolters GHJ, Van Schilfgaarde R. Collagen degradation by three clostridium histolyticum collagenase fractions with different substrate specificities. Transp Proc 1994; 26:641-642.
- 287. Rabuazzo AM, Davalli AM, Buscema M, et al. Glucose transport phosphorylation, and utilization in isolated porcine pancreatic islets. Metabolism 1995; 44:261-266.
- 288. Ketchum RJ, Nicolae M, Jahr H, Naji A, Barker CF, Brayman KL. In vitro assessment of human islets for transplantation: a comparison of glucose-stimulated insulin secretion from short-term-cultured (<48 hours) versus long-term-cultured (>72 hours) human islets. Transplant Proc 1994; 26:586.
- 289. Bertuzzi F, Davalli AM, Socci C, et al. In vitro function of adult pig islets: effects of culture in different media. Cell Transplant 1992; 1:103.(abstract)
- 290. Pearce RM. The development of the islands of Langerhans in the human embryo. Am J Anat 1903; 2:444-454.

- 291. Crowther NJ, Gotfredsen CF, Moody AJ, Green IC. Porcine islet isolation, cellular composition and secretory response. Horm Metab Res 1989; 21:590-595.
- 292. Bertuzzi F, Socci C, Berra C, et al. Effects of glucagon and octreotide on pig islet insulin release in response to glucose: an in vitro study. Transplant Proc 1994; 26:623-624.
- 293. Marchetti P, Swanson C, McLear M, et al. In vitro function and xenotransplantation of long-term (3 weeks) cultured porcine islets of Langerhans. Transplant Proc 1992; 24:637.
- 294. Marchetti P, Scharp DW, Finke EH, et al. Factors affecting in vitro and in vivo function of isolated porcine islets. Transplant Proc 1994; 26:3419-3420.
- 295. Tai J, Tsang A, Tze WJ. Effects of serum and medium supplements, pH, and temperature on the viability of cultured porcine islets. Transplant Proc 1994; 26:818-819.
- 296. Calafiore R, Falorini A, Basta G, et al. Effects of three-dimensional gel matrices on cultured maintenance of adult porcine pancreatic islets. Horm Metab Res 1994; 26:63.(abstract)
- 297. Schrezenmeir J, Hering BJ, Gerö L, et al. Long-term function of porcine islets and single cells embedded in barium-alginate matrix. Horm Metab Res 1992; 25:204-209.
- 298. Marchetti P, Scharp DW, Pfiffner K, et al. Cryogenic storage of isolated, purified porcine pancreatic islets. Transplantation 1994; 57:340-346.
- 299. Deng S, Bühler L, Andereggen E, et al. Islet isolation from slaugterhouse pig pancreata : evidence of in vitro and in vivo function. Transplant Proc 1994; 26:3396-3398.
- 300. Mellert J, Hering BJ, Hopt UT, et al. Exchange of pancreata and islets between centers for experimental islet transplantation in the pig. Transplant Proc 1991; 23:2435-2436.
- 301. Pipeleers DG, Pipeleers-Marichal M, Hannaert JC, et al. Transplantation of purified islet cells in diabetic rats. I. Standardization of islet cell grafts. Diabetes 1991; 40:908-917.
- 302. Knaack D, Fiore DM, Surana M, et al. Clonal insulinoma cell line that stably maintains correct glucose responsiveness. Diabetes 1994; 43:1413-1417.
- 303. Ferber S, Schnedl WJ, Beltran del Rio H, Irminger JC, Halban P, Newgard CB. Molecular strategy for the treatment of diabetes. Transplant Proc 1994; 26:363-365.
- 304. Thivolet CH, Demidem A, Haftek M, Durand A, Bertrand J. Structure, function, and immunogenicity of human insulinoma cells. Diabetes 1988; 37:1279-1286.
- 305. Hughes SD, Johnson JH, Quaade C, Newgard CB. Engineering of glucose stimulated insulin secretion and biosynthesis in non-islet cells. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89:688-692.
- 306. Clarck SA, Burnham BL, Chick WL. Modulation of glucose-induced insulin secretion from a rat clonal b-cell line. Endocrinology 1990; 127:2779-2788.
- 307. Poitout V, Stout LE, Armstrong MB, Walseth TF, Sorenson RL, Robertson RP. Morphological and functional characterization of bêta TC-6 cells an insulin-secreting cell line derived from transgenic mice. Diabetes 1995; 44:306-313.
- 308. Logothetopoulos J. Islet cell regeneration and neogenesis. In: Steiner DF, Freinkel N, eds. Handbook of Physiology & Endocrinology. Washington DC: American Society of Physiology, 1972:67-76.

- 309. Finegood DT, Scaglia L, Bonner-Weir S. Dynamics of beta-cell mass in the growing rat pancreas. Estimation with a simple mathematical model. Diabetes 1995; 44:249-256.
- 310. Swenne I. The role of glucose in the in vitro regulation of cell cycle kinetics and proliferation of fetal pancreatic B-cells. Diabetes 1982; 31:754-760.
- 311. Blum B, Haggestad C, Lazarow A. DNA synthesis in pancreatic tissue from fetal and young post natal rats. Anatom Rec 1963; 145:309.(abstract)
- 312. Swenne I. Effects of aging on the regenerative capacity of the pancreatic B-cell of the rat. Diabetes 1983; 32:14-19.
- 313. Brockenbrough JS, Weir GC, Bonner-Weir S. Discordance of exocrine and endocrine growth after 90% pancreatectomy in rats. Diabetes 1988; 37:232-236.
- 314. Hellman B, Hellerström C, Petersson B, Sweden U. Postnatal growth of the endocrine and exocrine parts of the rat pancreas. Diabetes 1961; 10 n°6:470-475.
- 315. Brelje TC, Parsons JA, Sorenson RL. Regulation of islet b-cell proliferation by prolactin in rat islets. Diabetes 1994; 43:263-273.
- 316. Swenne I, Eriksson U. Diabetes in pregnancy : Islet cell proliferation in the fetal rat pancreas. Diabetologia 1982; 23:525-528.
- 317. Nielsen JH, Linde S, Welinder BS, Bilestrup N, Madsen OD. Growth hormone is a growth factor for the differentiated pancreatic  $\beta$ -cell. Mol Endo 1989; 13:165-173.
- 318. Karatzas T, Strumph P, Ionelle J, et al. Short exposure to hepatocyte growth factor stimulates adult human pancreatic B-cell proliferation. Transplant Proc 1995; (in press)
- 319. Otonkoski T, Beattie GM, Rubin JS, Lopez AD, Baird A, Hayek A. Hepatocyte growth factor/Scatter factor has insulinotropic activity in human fetal pancreatic cells. Diabetes 1994; 43:947-953.
- 320. Metrakos P, Yuan S, Qi SJ, Duguid WP, Rosenberg L. Collagen gel matrix promotes islet cell proliferation. Transplant Proc 1994; 26:3349-3350.
- 321. Metrakos P, Yuan S, Agapitos D, Rosenberg L. Intercellular communication and maintenance of islet cell mass Implications for islet transplantation. Surgery 1993; 114:423-428.
- 322. Metrakos P, Yuan S, Agapitos D, Rosenberg L. Paracrine signaling (duct-> islet) in the pancreas and maintenance of islet cell mass- Potential implications for islet transplantation. Transplant Proc 1994; 26(2):637-638.
- 323. Laguesse GE. Sur la formation des îlots de Langerhans dans le pancréas. C R Soc Biol 1893; 45:819.
- 324. Laguesse E. Recherches sur l'histogenie du pancréas chez le mouton. J Anat Physiol 1896; 32:171-175.
- 325. Laguesse GE, Gontier de LaRoche A. Les îlots de Langerhans dans le pancréas du cobaye après ligature. C R Soc Biol 1902; 854-857.

- 326. Pictet R, Rutter WJ. Development of the embryonic endocrine pancreas. In: Steiner DF, Freinkel N, eds. Handbook of Physiology & Endocrinology. Washington DC: American Society of Physiology, 1972:25-66.
- 327. Le douarin NM, On the origin of pancreatic endocrine cells. Cell 1988; 53:169-171.
- 328. Liu HM, Potter EL. Development of the human pancreas. Arch Pathol 1962; 74:53-66.
- 329. Conklin JL. Cytogenesis of the human fetal pancreas. Am J Anat 1962; 111:181-193.
- 330. Han JH, Rall L, Rutter WJ. Selective expression of rat pancreatic genes during embryonic development. Proc Natl Acad Sci USA 1986; 83:110-114.
- 331. Dubois PM,, Paulin.C, Assan.R, Dubois.M.P. Evidence for immunoreactive somatostatin in the endocrine cells of human foetal pancreas. Nature 1975; 256:731-732.
- 332. Hahn von dorsche H, Reiher H, Hahn H-J. Phases in the early development of the human islet organ. Anat anz 1988; 166:69-76.
- 333. Teitelman G. Cellular and Molecular analysis of pancreatic islet cell lineage and differentiation. Recent Prog Horm Res 1991; 259-297.
- 334. Gittes GK, Rutter WJ. Onset of cell-specific gene expression in the developing mouse pancreas. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89:1128-1132.
- 335. Teitelman G, Alpert S, Polak JM, Martinez A, Hanahan D. Precursor cells of mouse endocrine pancreas coexpress insulin, glucagon and the neuronal proteins tyrosine hydroxylase and neuropeptide Y, but not pancreatic polypeptide. Dev 1993; 118:1031-1039.
- 336. Hughes W. An experimental study of regeneration in the islets of Langerhans with reference of the theory of balance. Horm Res 1956; 37:190-195.
- 337. Laguesse E. Sur l'évolution des ilôts endocrines dans le pancréas de l'homme adulte. Archives d'Anatomie Microscopique 1910; 11:1-93.
- 338. Diamare . . Boll Soc Nat Napoli 1895; 9:10.
- 339. Johnson DD. Alloxan administration in the guinea pig a study of the regenerative phase in the islands of Langerhans. Endocrinology 1950; 47:393-398.
- 340. Adams DJ, Harrison RG. The vascularization of the rat pancreas and the effect of ischaemia on the islets of Langerhans. J Anat 1953; 87:257-261.
- 341. Woerner CA. Studies of the islands of Langerhans after continuous intravenous injection of dextrose. Anatom Rec 1938; 71:33-57.
- 342. Melmed RN, Benitez CJ, Holt SJ. Intermediate cell of the pancreas 1. Ultrastructural characterization. J Cell Sci 1972; 11:449-475.
- 343. Bonner-Weir S, Baxter LA, Schuppin GT, Smith FE. A second pathway for regeneration of adult exocrine and endocrine pancreas. A possible recapitualation of embryonic development. Diabetes 1993; 42:1715-1720.
- 344. Eusebi V, Capella C, Bondi A, Sessa F, Vezzadini P, Mancini AM. Endocrine-paracrine cells in pancreatic exocrine carcinomas. Histopathology 1981; 5:599-613.

- 345. Bani D, Bani Sacchi T. Further evidence for the presence of intermediate and mixed endocrine cells in the human pancreas undergoing nesidioblastosis. Arch Ital Anat Embriol 1986; 91(1):71-82.
- 346. Bani Sacchi T, Bani D, Biliotti G. Nesidioblastosis and islet cell changes related to endogenous hypergastrinemia. Virchows Arch B 1985; 48:261-276.
- 347. Melmed RN. Intermediate cells of the pancreas: An appraisal. Gastroenterology 1979; 76:196-201.
- 348. Sétalo G, Blatniczky L, Vigh S. Development and growth of the islets of Langerhans through acino-insular transformation in regenerating rat pancreas. Acta Biologica Academiae Scientiarum Hungaricae 1972; 23:309-325.
- 349. Schulze W. Die Bedeutung der Langerhan'sschen Inseln im Pankreas. Archiw fur mik anat 1900; 56:491-497.
- 350. Gontier la Roche MAA. Modifications histologiques du pancréas après exclusion partielle chez le cobaye. Lille: Thèse de Médecine, 1903:1-142.
- 351. Kyrle J. Uber die Regenerationsvorgange im tierischen Pankreas. Archiw fur mik anat 1908; 72:141.
- 352. Ukai S. Regenerationsphenomene nach Kauterisation und Verwundung. Mitt Allerg Pathol 1926; 3:1.
- 353. Weichselbaum A. Uber die regeneration der Langerhans' schen Inseln in menschlichen Pancreas. Sitzungsberichte Akad Wiss Wien 1908; 3:117-211.
- 354. Ssobolew LM. Zur normalen und pathologischen morphologie des innern secretion der bauchs peicheldruse. Arch Path Anat Klin Med 1902; 168:191.
- 355. Edstrom E, Falkmer S. Qualitative and quantitative morphology of rat pancreatic islet tissue five weeks after ligation of the pancreatic ducts. Acta Soc Med Upsala 1967; 72:376-390.
- 356. Boquist L, Edstrom C. Ultrastructure of pancreatic acinar and islet parenchyma in rats at various intervals after duct ligation. Virchows Arch A 1970; 349:69-79.
- 357. Walker NI, Winterford CM, Kerr JFR. Ultrastructure of the rat pancreas after experimental duct ligation. 2.duct and stromal cell proliferation, differentiation, and delection. Pancreas 1992; 7:420-434.
- 358. Walker NI. Ultratstructure of the rat pancreas after experimental duct ligation: The role of apoptosis and intraepithelial macrophages in acinar cell delection. Am J Pathol 1987; 126:439-451.
- 359. Bockman DE. Cells of origin of pancreatic cancer: Experimental animal tumors related to human pancreas. Cancer 1981; 47:1528-1534.
- 360. Zeligs JD, Janoff A, Dumont AE. The course and nature of acinar cell death following pancreatic ligation in the guinea pig. Am J Pathol 1975; 80:203-226.
- 361. Zweens J, Bouman PR. Neoformation of insulin-producing islets following ligation of the pancreatic ducts in normal and alloxan-diabetic rats. Acta Physiol Pharmacol Neerl 1967; 14:529-531.

- 362. Traverso LW, Bockman DE, Pleis SK, Dail DH. Nesidioblastosis as a mechanism to prevent fibrosis-induced diabetes after pancreatic duct obstruction. Pancreas 1993; 8:325-329.
- 363. McBee JW, Lanza FL, Erickson EE. Hypoglycemia due to obstruction of pancreatic excretory ducts by carcinoma. Arch Pathol 1966; 81:287-319.
- 364. Rosenberg L, Brown RA, Duguid WP. A new approach to the induction of duct epithelial hyperplasia and nesidioblastosis by cellophane wrapping of the hamster pancreas. J Surg Res 1983; 35:63-72.
- 365. Rosenberg L, Vinik AI. Induction of endocrine cell differentiation: a new approach to management of diabetes. J Lab Clin Med 1989; 114:75-83.
- 366. Rosenberg L, Brown RA, Duguid WP. Effect of experimental nesidioblastosis on streptozocin-induced diabetes. Surg Forum 1983; 34:48-51.
- 367. Rosenberg L, Clas D, Duguid WP. Trophic stimulation of the ductal/islet cell axis: a new approach to the treatment of diabetes. Surgery 1990; 108:191-197.
- 368. Rosenberg L, Vinik AI. In vitro stimulation of hamster pancreatic duct growth by an extract derived from the "wrapped" pancreas. Pancreas 1993; 8(2):255-260.
- 369. Pittenger GL, Vinik AI, Rosenberg L. The partial isolation and characterization of ilotropin, a novel islet-specific growth factor. Advances Exp Med Biol 1992; 321:123-130.
- 370. Di Mattei E. Degli effete della irritazione sugli elementi glandulari del pancreas. Giornale Reale Acad Mad Torino Ser 1885; 3:476-483.
- 371. Foglia VG. Characteristics of diabetes in the rat. Rev Soc Argent Biol 1944; 20:21-37.
- 372. Fahr Th. Diabetes studien. Virchows Arch A 1914; 215:247-252.
- 373. Lehv M, Fitzgerald PJ. Pancreatic acinar cell regeneration: regeneration after surgical resection. Am J Pathol 1968; 53:513-535.
- 374. Pearson KW, Scott D, Torrance B. Effects of partial surgical pancreatectomy in rats: pancreatic regeneration. Gastroenterology 1977; 72:469-473.
- 375. Bonner-Weir S, Trent DF, Weir GC. Partial pancreatectomy in the rat and subsequent defect in glucose induced insulin release. J Clin Invest 1983; 71:1544-1554.
- 376. Bonner-Weir S. Regulation of pancreatic beta-cell mass in vivo. Recent Prog Horm Res 1994; 49:91-104.
- 377. Bonner-Weir S. Two pathways of B-cell growth in the regenerating rat pancreas: implications for islet transplantation. Diab Nutr Metab 1992; 5:21.
- 378. Gu D, Sarvetnick.N. Epithelial cell proliferation and islet neogenesis in IFN-g transgenic mice. Development 1993; 118:33-46.
- 379. Lazarow A. Spontaneous recovery from alloxan diabetes in the rat. Diabetes 1952; 1:363-372.
- 380. House EL. A histological study of the pancreas, liver and kidney both during and after recovery from alloxan diabetes. Am J Physiol 1958; 62:189-201.

- 381. Pour PM, Duckworth W, Kazakoff K. Insulin therapy prevents spontaneous recovery from streptozotocin-induced diabetes in Syrian hamsters. Virchows Arch A 1990; 417:333-341.
- 382. Jacob.S. Reneration of the islets of Langerhans in the guinea pig. Cell Tissue Res 1977; 181:277-286.
- 383. Leahy JL, Cooper HE, Deal EA, Weir GC. Chronic hyperglycemia is associated with impaired glucose influence on insulin secretion: A study in normal rats using chronic in vivo glucose infusions. J Clin Invest 1986; 77:908-915.
- 384. Moloney PJ, Coval M. Antigenicity of insulin diabetes induced by specific antibodies. Biochem J 1955; 59:179-185.
- 385. Logothetopoulos J, Bell EG. Histological and autoradiographic studies of the islets of mice injected with insulin antibody. Diabetes 1995; 15:205-211.
- 386. Miyaura C, Chen L, Appel M, et al. Expression of reg/PSP, a pancreatic exocrine gene: relationship to changes in islet B-cell mass. Mol Endo 1991; 5:226-234.
- 387. Martin JM, Gregor WH, Lacy PE, Evens RG. The effect of hyperglycemia upon islet regeneration in rats. Diabetes 1963; 12:538-544.
- 388. Florentin P, Watrin J. Action de la thyroxine sur le pancréas du cobaye. Soc de biol de Nancy 1920; 21 avril:372-374.
- 389. Sarvetnick N, Liggitt D, Pitts SL, Hansen SE, Stewart TA. Insulin -dependent diabetes mellitus induced in transgenic mice by ectopic e xpression of class II MHC and interferon-g. Cell 1988; 52:773-782.
- 390. Gu D, Sarvetnick N. A transgenic model for studying islet development. Recent Prog Horm Res 1994; 49:161-165.
- 391. Bockman DE, Merlino G. Cytological changes in the pancreas of transgenic mice overexpressing transforming growth factor-a. Gastroenterology 1992; 103(6):1883-1892.
- 392. Sandgren EP, Luetteke NC, Palmiter RD, Brinster RL, Mee DC. Overexpression of TGFa in transgenic mice: induction of epithelial hyperplasia, pancreatic metaplasia, and carcinoma of the breast. Cell 1990; 61:1121-1135.
- 393. Wang TC, Bonner-Weir S, Oates PS, et al. Pancreatic gastrin stimulates islet differenciation of transforming growth factor alpha-induced ductular precursor cells. J Clin Invest 1993; 92:1349-1356.
- 394. Rao MS, Yeldandi AV, Reddy JK. Stem cell potential of ductular and periductular cells in the adult rat pancreas. Cell Differentiation Dev 1990; 29:155-163.
- 395. Laidiaw GF. Nesidioblastoma, the islet tumor of the pancreas. Am J Pathol 1938; 2:125-134.
- 396. Farley DR, van Heerden JA, Myers JL. Adult pancreatic nesidioblastosis. Unusual presentation of a rare entity. Ann Surg 1994; 129:329-332.
- 397. Hollande E, Giron B, Lehy T, Accary JP, Roze C. In vitro secretion of gastrin, insulin, and glucagon in tissue cultures of pancreas from a child with neonatal intractable hypoglycemia. Gastroenterology 1976; 71:255-262.

- 398. Rahier J, Sempoux C, Jaubert F, et al. Pancréatectomie partielle ou subtotale dans l'hypoglycémie hyperinsulinique du nouveau-né: contribution du pathologiste. IVème Congres de l'association Francophone de Chirurgie Endocrinienne 1995; 15 juin:5.(abstract)
- 399. Glaser B, Moshe P, Carmi R, Lieberman E, Landau H. Pesistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy ("nesidioblastosis") : autosomal recessive inheritance in 7 pedigrees. Am J Med Genet 1990; 37:511-515.
- 400. Leduc EH, Jones EE. Acinar-islet cell transformation in mouse pancreas. J ultrastructure research 1968; 24:165-169.
- 401. MacCallum WG. Hypertrophy of the islands of Langerhans in diabetes mellitus . Am J M Sc 1907; 133:432-440.
- 402. Gepts W, DeMey J. Islet cell survival determined by morphology and immunocytochemical study of the islets of Langerhans in juvenile diabetes mellitus. Diabetes 1978; 27(supp1):251-261.
- 403. Bommer G, Friedl U, Heitz PhU, Klöppel G. Pancreatic PP cell distribution and hyperplasia. Immunocytochemical morphology in the normal human pancreas, in chronic pancreatitis and pancreatic carcinoma. Virchows Arch A 1980; 387:319-331.
- 404. Fexinos J, Bugat R. Les cellules mixtes au cours des pancréatites chroniques. Etudes ultrastructural. Pathol Biol (Paris) 1972; 20:765-774.
- 405. Risaliti A, Pizzolitto S. Nesidioblastosis arising from heterotopic pancreas and presenting with hypertension a clinical, immunohistochemical and ultrastructural study. Ann chir 1989; 43:459-464.
- 406. Sacchi TB, Bani D, Biliotti G. The endocrine pancreas in patients with insulonima: an immunocytochemical and ultrastructural study of the nontumoral tissue with morphometrical evaluations. Int J Pancreatol 1989; 5:11-28.
- 407. Gousward WB, Houthoff HJ, Koudstall J. Nesidioblastosis and endocrine hyperplasia of the pancreas: a secondary phenomen. Human pathol 1986; 17:46-54.
- 408. Creutzfeldt W, Arnold R, Creutzfeldt C, Track NS. Pathomorphologic, biochemical and diagnostic aspects of gastrinomas (Zollinger Ellison syndrome). Human pathol 1975; 6:47-76.
- 409. Brown RE, Still WJS. Nesidioblastosis and the Zollinger-Ellison syndrome. Am J Dig Dis 1968; 13:-32768.
- 410. Zollinger RM, Ellison EH. Primary peptic ulceration of the jejunum associated with islet cell tumors of the pancreas. Ann Surg 1955; 142:709-723.
- 411. Bani D, Biliotti G, Sacchi TB. Morphological changes in the human endocrine pancreas induced by chronic excess of endogenous glucagon. Virchows Arch B 1991; 60:199-206.
- 412. Vance JE, Stoll RW, Kitabchi AE, Buchanan KD, Hollander D, Williams RH. Familial nesidioblastosis as the predominant manifestation of multiple endocrine adenomatosis. Am J Med 1972; 52:211-227.
- 413. Brown RE, Madge GE. Cystic fibrosis and nesidioblastosis. Arch Pathol 1971; 92:5357.
- 414. Resnick JM, Manivel JC. Immunohistochemical characterization of teratomatous and fetal neuroendocrine pancreas. Arch Pathol Lab Med 1994; 118:155-159.

- 415. Chines A, Fogelfeld L, Zaidel L, Feigl D. Nesidioblastosis in adults. Israel J Med Sci 1989; 25:450-453.
- 416. Goudswaard WB, Houthoff HJ, Koudstaal J, Zwierstra RP. Nesidioblastosis and endocrine hyperplasia of the pancreas. Human pathol 1986; 17:46-54.
- 417. Golosow N, Grobstein C. Epithelio-mesenchymal interaction in pancreatic morphogenesis. Dev Biol 1962; 4:242-255.
- 418. Ronzio RA, Rutter WJ. Effects of a partially purified factor from chick embryos on macromolecular synthesis of embryonic pancreatic epithelia. Dev Biol 1973; 30:307-320.
- 419. Richardson KE, Spooner BS. Mammalian pancreas development: regeneration and differentiation in vitro. Dev Biol 1977; 58:402-420.
- 420. Hirai Y, Takebe K, Takashina M, Kobayashi S, Takeichi M. Epimorphin : a mesenchymal protein essential for epithelial morphogenesis. Cell 1992; 69:471-481.
- 421. Ingber DE. Extracellular matrix as a regulator of epithelial polarity, cell growth, and tissue pattern. In: Go VLW, Dimagno EP, Gardner JD, Lebenthal E, Reber HA, Scheele GA, eds. The Pancreas Biology, Pathobiology, and Disease. 2nd ed. New York: Raven press, 1993:369-380.
- 422. Gospodarowicz D, Greenburh G, Birdwell CR. Determination of cellular shape by the extracellular matrix and its correlation with the control of cellular growth. Cancer Res 1978; 38:4155-4171.
- 423. Yang J, Richards J, Bowman P, et al. Sustained growth and three-dimensional organization of primary mammary tumor epithelial cells embedded in collagen gels. Proc Natl Acad Sci U S A 1979; 76:3401-3405.
- 424. Yamanari H, Suganuma T, Iwamura T, Kitamura N, et al. . Extracellular matrix components regulating glandular differentiation and the formation of basal lamina of a human pancreatic cancer cell line in vitro. Exp Cell Res 1994; 211:175-182.
- 425. Kawamura H, Ichihara I. Primary culture of epithelial cells derived from the rat ventral prostate: formation of three-dimensional acinus-like structure in collagen gel. Prostate 1987; 10:153-161.
- 426. Hall HG, Farson DA, Bissell MJ. Lumen formation by epithelial cell lines in response to collagen overlay: a morphogenetic model in culture. Proc Natl Acad Sci USA 1982; 79:4672-4676.
- 427. Kirkland SC. Polarity and differentiation of human rectal adenocarcinoma cells in suspension and collagen gels cultures. J Cell Sci 1988; 91:615-621.
- 428. Pignatelli M, Bodmer WF. Genetics and biochemistry of collagen binding-triggered glandular differentiation in a human colon carcinoma cell line. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85:5561-5565.
- 429. Renzo MFD, Poulsom R, Olivero M, Comoglio PM, Lemoine NR. Expression of the met/hepatocyte growth factor receptor in human pancreatic cancer. Cancer Res 1995; 55:1129-1138.
- 430. Toda S, Sugihara H. Reconstruction of thyroid follicles from isolated porcine follicle cells in three-dimentional collagen gel culture. Endocrinology 1990; 126:2027-2034.

- 431. Kawamura Y, Yoshida K, Nakanuma Y. Methods in laboratory investigation: Primary culture of rabbit gallbladder epithelial cells in collagen gel matrix. Lab Invest 1994; 61:350-356.
- 432. Githens S, Schexnayder JA, Desay K, Patke CL. Rat pancreatic interlobular duct epithelium: isolation and culture in collagen gel. In Vitro Cell Dev B 1989; 25:679-685.
- 433. Toda S, Yonemitsu N, Hikichi Y, Sugihara H, Koike N. Differentiation of human thyroid follicle cells from normal subjects and Basedow's disease in three-dimensional collagen gel culture. Pathol Res Pract 1992; 188:874-882.
- 434. Chao SH, Peshwa MV, Sutherland DER, Hu WS. Entrapment of cultured pancreas islets in three-dimensional collagen matrices. Cell Transplant 1992; 1:51-60.
- 435. Montesano R, Mouron P, Amherdt M, Orci L. Collagen matrix promotes reorganization of pancreatic endocrine cell monolayers into islet-like organoids. J Cell Biol 1983; 97:935-939.
- 436. Ohgawara H, Mochizuki N, Taira T, et al. Maintenance of embedded pig pancreatic pseudo-islets in a collagen gel matrix : study of the effect of hydrocortisone, a collagenase inhibitor, and nicotinamide on collagenolysis and the morphogenesis of pancreatic islet-cells in collagen gel matrix. In Vitro Cell Dev B 1990; 26:348-352.
- 437. Amory B, Mourmeaux JL, Remacle C. In vitro cytodifferentiation of perinatal rat islet cells within a tridimensional matrix of collagen. In Vitro Cell Dev B 1994; 24:91-99.
- 438. Sanvito F, Herrera P-L, Huarte J, et al. TGF-B1 influences the relative development of the exocrine and endocrine pancreas in vitro. Development 1994; 120:3451-3462.
- 439. Michalopoulos G, Houck KA, Lutteke NC. Control of hepatocyte replication by two serum factors. Cancer Res 1984; 44:4414-4419.
- 440. Sandler S, Andersson A. Long-term effects of exposure of pancreatic to nicotinamide in vitro on DNA synthesis, metabolism and B-cell function. Diabetologia 1986; 29:199-202.
- 441. DeVroede MA, In'tVeld PA, Pipeleers DG. Dexoyribonucleic acid synthesis in cultured adult rat pancreatic B cells. Endocrinology 1990; 127:1510-1516.
- 442. Githens S, Holmquist DRG, Whelan JF, Ruby JR. Morphological and biochemical characteristics of isolated and cultured pancreatic ducts. Cancer 1981; 47:1505-1512.
- 443. Githens S. Development of duct cells. In: Lebenthal E, ed. Human Gastrointestinal Development. New York: Raven Press, 1989:669-683.
- 444. Kleinman HK, McGarvey ML, Liotta LA, Robey PG, Tryggvason K, Martin GR. Isolation and characterization of type IV procollagen laminin and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. Biochem 1982; 21:6188-6193.
- 445. Haglund C, Roberts PJ, Nordling S, Ekblom P. Expression of laminin in pancreatic neoplasms and in chronic pancreatitis. Am J Surg Pathol 1984; 8:669-676.
- 446. Cortie C, Catala J. Regenerative process of endocrine cells consecutively after pancreatic duct ligation in a new model of N.I.D.D. diabetes. European Tissue Culture Society 1993; 61.(abstract)

- 447. Korc M, Chandrasekar B, Yamanaka Y, Friess H, Buchler M, Beger HG. Overexpression of the epidermal growth factor receptor in human pancreatic cancer is associated with concomitant increases in the levels of epidermal growth factor and transforming growth factor alpha. J Clin Invest 1992; 90:1352-1360.
- 448. Friess H, Yamanika Y, Buchler M, et al. Increased expression of acidic and basic Fibroblast Growth factors in chronic pancreatitis. Am J Pathol 1994; 14:117-128.
- 449. Tsarfaty I, Resau JH, Rulong S, Keydar I, VanWoude F. The met proto-oncogene receptor and lumen formation. Science 1992; 257:1258-1261.
- 450. Jhappan C, Stahle C, Harkins RN, Fausto N, Smith GH, Merlino GT. TGF- $\alpha$  overexpression in transgenic mice induces liver neoplasia and abnormal development of the mammary gland and pancreas. Cell 1990; 61:1137-1146.
- 451. Bockman DE, Boydston WR, Anderson MC. Origin of tubular complexes in human chronic pancreatitis. Am J Surg 1994; 144:243-249.
- 452. Lieber M, Nelson-Rees W, Kaplan M, Todaro G. Establishment of a continuous tumorcell line (PANC-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. Int J Cancer 1975; 15:741-747.
- 453. Resau JH, Cottrell JR, Hudson EA, Trump BF, Jones RT. Studies on the mechanisms of altered exocrine acinar cell differentiation and ductal metaplasia following nitrosamine exposure using harmster pancreatic explant organ culture. Carcinogenesis 1985; 6:29-35.
- 454. Klöppel G, Bommer G, Rückert K, Seifert G. Intraductal proliferation in the pancreas and its relationship to human and experimental carcinogenesis. Virchows Arch A 1980; 387:221-233.
- 455. Parsa U, Longnecker DS, Scarpelli DG, Pour P, Reddy JK, Lefkowitz M. Ductal metaplasia of human exocrine pancreas and its association with carcinoma. Cancer Res 1985; 45:1285-1290.
- 456. Pour PM. Mechanism of pseudoductular (tubular) formation during pancreatic carcinogenesis in the hamster model; an electron-microscopic and immunohistochemical study. Am J Pathol 1988; 130:335-344.
- 457. Yi ES, Yin S, Harclerode DL, et al. Keratinocyte growth factor induces pancreatic ductal epithelial proliferation. Am J Pathol 1994; 145:80-85.
- 458. Makino T, Usuda N, Rao S, Reddy JK, Scarpelli DG. Transdifferentiation of ductular cells into hepatocytes in regenerating hamster pancreas. Lab Invest 1990; 62:552-560.
- 459. Parsa I, Marsh WH, Sutton AL, Butt KM. Effects of dimethylnitrosamine on organcultured adult human pancreas. Am J Pathol 1981; 102:403-411.
- 460. Arias AE, Bendayan M. Differentiation of pancreatic acinar cells into duct-like cells in vitro. Lab Invest 1993; 69:518-530.
- 461. De Lisle RC, Logsdon CD. Pancreatic acinar cells in culture: expression of acinar and ductal antigens in a growth-related manner. Eur J Cell Biol 1990; 51:64-75.
- 462. Vila MR, Lloreta J, Real FX. Normal human pancreas cultures display functional ductal characteristics. Lab Invest 1994; 71:423-431.

- 463. Duguid WP, Rosenberg L. Isolation and culture of intralobular ducts from the hamster pancreas. Histopathology 1995;
- 464. Yoshida T, Hanahan D. Murine pancreatic ductal adenocarcinoma produced by in vitro transduction of polyoma middle T oncogene into islets of Langerhans. Am J Pathol 1994; 145:671-685.
- 465. Yuan S, Paraskevas S, Duguid WXP, Rosenberg L. Phenotypic transformation of isolated human islets in collagen matrix culture. Transplant Proc 1995; (in press)
- 466. Lazarow A, Wells LJ, Carpenter AM, Hegre OD, Leonard RJ, McEvoy RC. Islet differentiation, organ culture, and transplantation. Diabetes 1973; 22:877-912.
- 467. Otonski T, Beattie GM, Mally MI, Ricordi C, Hayek A. Nicotinamide is a potent inducer of endocrine differentiation in cultured human fetal pancreatic cells. J Clin Invest 1993; 92:1459-1466.
- 468. Dudek RW, Lawrence IE, Hill RS, Johnson RC. Induction of islet cytodifferentiation by fetal mesenchyme in adult pancreatic ductal epithelium. Diabetes 1991; 40:1041-1048.
- 469. Jindal RM, Sidner RA, Miller GA, Filo RS. Proliferation of rat pancreatic ductal epithelial cells in vitro and in response to partial hepatectomy and pancreatectomy in vivo. Transplant Proc 1995; (in press)
- 470. Esmatjes E, ferrer JP, Oppenhaimer F, Vilardell J, Casamitjana R. Cyclosporine's effect on insulin secretion in patients with kidney transplants. Transplantation 1991; 52(3):500-503.
- 471. Bertelli E, Regoli M, Bastianini A. Endocrine tissue associated with the pancreatic ductal system: A light and electron microscopic study of the adult rat pancreas with reference to a new endocrine arrangement. Anatom Rec 1994; 239:371-378.
- 472. Bendayan M. Presence of endocrine cells in pancreatic ducts. Pancreas 1987; 2:393-397.
- 473. Swartz FJ, Carstens HB. An islet of Langerhans located within the epithelium of a human pancreatic duct. Histol Histopath 1986; 1:111-117.
- 474. Chen J, Baithun SI, Pollock DJ, Berry CL. Argyrophilic and hormone immunoreactive cells in normal and hyperplastic pancreatic ducts and exocrine pancreatic carcinoma. Virchows Arch A 1988; 413:399-405.
- 475. Githens S, Holmquist DRG, Whelan JF, Ruby JR. Characterization of ducts isolated from the pancreas of the rat. J Cell Biol 1980; 85:122-135.
- 476. Trautmann B, Schlitt HJ, Hahn EG, Löhr M. Isolation, culture, and characterization of human pancreatic duct cells. Pancreas 1993; 8:248-254.
- 477. Bouwens L, Braet F, Heimberg H. Identificatin of rat pancreatic duct cells by their expression of cytokeratins 7, 19, and 20 in vivo and after isolation and culture. J Histochem Cytochem 1995; 43:245-253.
- 478. Bouwens L, Wang R, De blay E, Pipeleers DG, Klöppel G. Cytokeratins as markers of ductal cell differentiation and islet neogenesis in the neonatal rat pancreas. Diabetes 1994; 43:1279-1283.
- 479. Sandler S, Hellerstrom C, Eizirik DL. Effects of nicotinamide supplementation on human pancreatic islet function in tissue culture. J Clin Endocrin Metab 1993; 77:1574-1576.

- 480. Hill DJ, Swenne I, Wirdnam K, Milner RDG. Somatomedin-C in human fetal pancreas. Cellular localization and release during organ culture. Diabetes 1987; 36:465-471.
- 481. Rabinovitch A, Quigley C, Russel T, Patel Y, Mintz D. Insulin and Multiplication Stimulating Activity (an Insulin-like Growth Factor) stimulates islet B-cell replication in neonatal rat pancreatic monolayer cultures. Diabetes 1982; 31:160-164.
- 482. Smith FE, Rosen KM, Villa-Komaroff L, Weir GC, Bonner-Weir S. Enhanced insulinlike growth factor I gene expression in regenerating rat pancreas. Proc Natl Acad Sci U S A 1991; 88:6152-6156.
- 483. Sieradzki J, Fleck H, Chatterjee AK, Schatz H. Stimulatory effect of insulin-like growth factor-I on (3H) thymidine incorporation, DNA content, insulin biosynthesis and secretion of isolated pancreatic rat islets. J Endocrinol 1988; 117:59-62.
- 484. Eckhoff DE, Sollinger HW, Hullet DA. Selective enhancement of b cell activity by preparation of fetal pancreatic proislets and culture with insulin growth factor I. Transplantation 1991; 51(6):1161-1165.
- 485. Adams GA, Wang X, Lee LK, Piercy CE, Alfrey EJ, Dafoe DC. Insulin-like growth factor-1 promotes successful fetal pancreas transplantation in the intramuscular site. Surgery 1994; 116:751-757.

# ANNEXES

# Induction of Cerebral Death in Slaughterhouse Pigs Facilitates Pancreas Harvesting for Islet Isolation

J. Kerr-Conte, F. Pattou, C. Hober, A. Ple, M. Riguier, C. Proye, and J. Lefebvre

HE MASS ISOLATION of pig islets has been de-I scribed<sup>1</sup>; however, to date only a few teams in the world have succeeded in isolating porcine islets in a reproducible fashion.<sup>2,3</sup> Among the numerous factors affecting pig islet isolation, prolonged warm ischemia time (WIT; > 10 minutes) associated with the habitual slaughtering process (electric shock-induced cardiac arrest) has a direct effect on islet isolation yield.<sup>4</sup> The best isolation results are obtained from pancreata harvested from live animals.<sup>1,2,5</sup> The aim of this study was to propose an alternative to the habitual slaughtering process, which improves pig pancreas procurement for islet isolation by providing a minimum WIT, compatibility with slaughterhouse conditions, and conformity with ethical and veterinary regulations. In this study we evaluate the isolation of islets after pancreas harvesting from slaughterhouse pigs after the induction of cerebral death.

#### MATERIALS AND METHODS

Twenty pancreata were harvested at the local slaughterhouse from adult Large White pigs (150-200 kg) using a technique developed in accordance with veterinary authorities. Cerebral death was first induced with a metal slug shot to the forehead. followed by rapid mechanical decerebration. Heart-beating, cerebrally dead animals were then suspended by the back paw to facilitate exenteration. A sterile dissection of the pancreatic tail was rapidly performed ex vivo, and the gland was cooled in Eurocollins after a brief disinfection in Betadine (20% solution).6 Isolation of pig islets was performed according to the semiautomated method previously described, with the following modifications. After extensive dissection, the blood-free splenic portion of the pancreas was distended with 300 mL of a heated (32°C) solution of Hanks' solution containing 3.7 mmol/L CaCl, and collagenase (Boehringer Mannheim Type P, 1.4 mg/mL). Mechanical agitation was initiated after 9 minutes of the digestion phase (recirculation) and was performed for 10 seconds every minute (one oscillation/2 s, 12 cm), and 20 s/minutes during the dilution phase. The temperature was regulated at 37°C by way of a 50°C water bath. The digestion phase was halted when large numbers (10-15) of free islets were observed in three consecutive digestate samples taken at 1-minute intervals. After centrifugation of the suspension, the final digestate was suspended in the University of Wisconsin solution for 45 minutes before mass purification using discontinuous Euroficoll gradient centrifugation in the COBE 2991 (COBE Inc, Lakewood, Colo). To optimize purification, a Euroficoll test gradient (1.112, 1.104, 1.097, 1.091, 1.091, 1.081, 1.051, 1.051, and 1.037 g/cm<sup>2</sup>, Hanks') was performed for each manipulation to select the densities to be used in the COBE 2991. Purified islets were cultivated in RPMI-1640 1 g/L glucose with 10% fetal calf serum, 10 mmol/L niacinamide, and antibiotics as described.6 Samples (50  $\mu$ L) were taken from the final digestate resuspended in University of Wisconsin solution and after digestate purification in order to quantitatively assess the islets.7 Functional (perifusion)



Fig 1. Pig islets after purification.

and morphological (immunohistochemistry) characteristics of the purified islets were evaluated after 72 or 0 hours of culture. respectively. In perifusion experiments, the stimulation index was calculated as insulin secretion after stimulation with 3.0 g/L glucose or 3.0 g/L glucose plus theophylline (10 mmol/L) compared with basal secretion in the presence of 0.6 g/L glucose in a Krebs Ringer bicarbonate solution (0.5% bovine serum albumin).8 All results are reported as means  $\pm$  SEM.

#### RESULTS

After induction of cerebral death, the animals remained heart beating until the moment of exenteration. In all 20 isolations, WIT beginning only at evisceration was 2 to 4 minutes in duration. Cold ischemia time was approximately 2 hours in duration. The results obtained from 20 consecutive isolations are presented in Table 1. The isolation of 564,000  $\pm$  88,624 islets corresponding to 7186  $\pm$  914 islets/g was obtained. The total number of islet equivalents (IE; islet of 150  $\mu$ m) was 490.860  $\pm$  70,770 total IE (5579  $\pm$ 686 IE/g), with an isolation index of 1.01, demonstrating

From the Clinique Chirurgicale Adulte Est, Laboratoire d'Endocrinologie Expérimentale (Centre Oscar Lambret), Laboratoire de Culture Cellulaire, Centre Hospitalier et Universitaire de Lille, France.

Address reprint requests to J. Kerr-Conte, Laboratoire de Culture Cellulaire, Faculté de Médicine, 1 place de Verdun, 59045 Lille, France.

<sup>© 1994</sup> by Appleton & Lange 0041-1345/94/\$3.00/+0

Table 1. Results of Pig Islet Isolation and Purification

	Islets	lsiets/g	IE	IE/g	Index
Isolation (n = 20)	564,610 ± 88,624	7,186 ± 914	490,860 ± 70,770	5,579 ± 686	1.01 ± 0.16
Purification (n = 12)	261,180 ± 47,987	3,377 ± 597	242,340 ± 46,208	3,416 ± 606	0.96 ± 0.08

Values are means ± SEM.

IE, 150 µm islet equivalent.

that the isolated islets were intact (60 to 500 mm) and not fragmented (< 50 mm). After purification of the totality of the digestate with COBE 2991 (last 12 isolations), 261,180  $\pm$  47,987 islets were recovered (46%) or 242,340  $\pm$  46,208 IE (49% IE) were recovered. Purity of the preparation varied from 80% to 95% (Fig 1). The isolation index after purification of 0.96 demonstrates recovery of intact islets. The islets showed positive immunohistochemical reactivity for insulin, glugacon, somatostatin, and pancreatic polypeptide. Stimulation secretion studies demonstrated a variable basal insulin secretion between isolations (77.8  $\pm$ 17.9  $\mu$ U insulin/min/200 IE, n = 5 manipulations). The response of islets cultivated for 72 hours to glucose (3.0 g/L) in a Kreb's Ringer bicarbonate solution varied between 1.2- and 3.8-fold higher than the basal rate (mean stimulation index 1.38  $\pm$  0.4, n = 5). In contrast, 3.0 g/L glucose plus theophylline resulted in a biphasic stimulation with 1.5- to 5.8-fold greater insulin secretion than with basal levels (mean  $1.7 \pm 0.9$ , n = 5).

#### DISCUSSION

The first successful islet isolation results were obtained after pancreas procurement from living heart-beating animals (WIT 0 minutes; 690,000 islets/pancreas and 405,000 IE).<sup>1</sup> Prolonged WITs (18 to 20 minutes) have been shown to directly reduce the isolation yield to approximately 20% of those found in living donors.<sup>4</sup> Using the same islet isolation technique, other groups<sup>3</sup> have reported WIT in the range of 8 to 15 minutes, with islet isolation yields of 374.612 total islets (281,922 IE) or 54% (69% of IE) of the results achieved with 0 hours WIT. In this study, using an alternative technique for slaughtering pigs, the induction of cerebral death before pancreas harvesting, we succeeded in decreasing WIT to <4 minutes and obtained islet isolation results equivalent (82% total islets and 120% IE) to those reported with 0 hours WIT.

The induction of brain death before pig pancreas harvesting successfully reduced WIT (<4 minutes), was easily performed in slaughterhouse conditions, and was in accordance with ethical concerns. The procurement of pancreata under these conditions allowed us to achieve consistent quantitative and qualitative mass pig islet isolation. Definitive assessment of islet quality after allotransplantation in pigs is currently underway in our laboratory.

#### REFERENCES

1. Ricordi C. Socci C. Davalli AM, et al: Surgery 107:688, 1990 2. Ricordi C. Socci C. Davalli AM, et al: Horm Metab Res 125(suppl):26, 1990

3. Marchetti P. Finke EH, Gerasimidi-Vazeou A, et al: Transplantation, 52:209, 1991

4. Ricordi C, Socci C, Davalli AM, et al: Transplant Proc 22:442, 1990

5. Ricordi C. Socci C. Davalli AM. et al: Transplant Proc 22:784, i990

6. Marchetti P, Scharp DW, Longwith J, et al: Transplantation 53:1364, 1992

7. Ricordi C. Gray DWR. Hering BJ, et al: Acta Diabetol Lat  $27{:}185,\, \mathrm{i}990$ 

8. Scharp DW, Lacy PE, Finke E, et al: Surgery 102:869, 1987

615

# Simple Dithizone-Stained Multilayer Test for Selection of Density Gradient Before Human Islet Mass Purification

J. Kerr-Conte, F. Pattou, Y. Xia, C. Proye, and J. Lefebvre

**I** SOPYKNIC centrifugation in Euro-Ficoll discontinuous gradients is commonly used for human islet purification. The habitually described method uses three or four defined density layers (1.108 g/mL, 1.091 Hanks balanced salts [HBSS] or 1.108, 1.096, 1.037 HBSS with islet recovery in the 1.091/HBSS or 1.096/1.037 interfaces, respectively.<sup>1-4</sup> The major drawback to this method is the great variability in islet purity from one donor to another. Indeed densities of islet and exocrine tissue are a function of diverse conditions (eg, donor status, preservation time, digestion quality).<sup>5</sup>

In this study, we describe a dithizone-stained, multilayer test gradient allowing rapid visual determination of human islet density and consequently, a more accurate selection of density layers for mass purification of individual preparations in the Cobe 2991.

#### MATERIALS AND METHODS

Pancreata were obtained from brain dead patients during multiorgan harvesting procedures (n = 16 consecutive pancreata). Pancreata have been perfused in situ and preserved with University of Wisconsin (UW) or Euro-Collins solution. UW was implemented when preservation time exceeded 10 hours. Following dissection and distension with a collagenase solution (collagenase Type P 2.25 to 4 mg/mL. Boehringer Mannheim, 3.7 mmol/L CaCl<sub>2</sub>), pancreata were digested in the presence of DNase (250 U/mL) with an automated method as previously described by Ricordi et al.6 The final digest was resuspended in UW solution until purification (25 minutes).7 An aliquot of digestate (1 mL) was placed in a conical transparent tube (15 mL), colored with dithizone (1 mL, 0.5 mg/mL), and centrifuged (1 minute, 80g). The pellet was resuspended in 1.108 (4 mL) Euro-Ficoll and six successive Euro-Ficoll layers (1 mL) of previously measured density-1.104, 1.096, 1.091, 1.081, 1.051, 1.037 and HBSS-were deposited. Following centrifugation (15 minutes, 800g) the layers containing colored islets were visually detected and harvested with a Pasteur pipette for rapid purity assessment in an inverted microscope. Results of this test gradient further allowed the determination of the optimal Euro-Ficoll layers for mass purification of the preparation in the Cobe 2991. Prior to and after purification, isolation vields were determined from two 50-µL samples and are expressed in islet and islet equivalent (IE). The percentage of recovery of IE after purification (total IE after purification/total IE before purification  $\times$  100) was determined. Following purification, islets were placed in RPMI 1640 (1 g/L glucose) containing 10% heat inactivated bovine fetal serum with antibiotics. After 24 hours of culture, viability was assessed in vitro by insulin secretion following a static incubation in RPMI 1640 (0.5% bovine serum albumin [BSA]) with different glucose concentrations (5.0 g/L vs 0.6 g/L), expressed in the form of a stimulation index.

#### RESULTS

Human islet isolation program in our laboratory started in June 1993. The first 16 pancreata were harvested from donors age  $38 \pm 3$  years old (range 22 to 59). Cold ischemia time averaged 12.4  $\pm$  1.7 hours (3 to 32). Results of the test gradient performed in these 16 consecutive experiments are reported in Fig 1. No islets were seen in layers HBSS/1.037 and 1.037/1.051, which contained only fat and/or low density ductal tissue. In all cases with the exception of three poor digestions (a 24 and 29-year-old donor and a donor with chronic pancreatitis), one of the interfaces-1.051/1.081 (9/16) or 1.081/1.091 (4/16)-demonstrated excellent islet purity (>90%) and accounted for nearly all islets purified. The remaining islets, often embedded in exocrine, were found in 1.081/1.091 (11 of 16) with purity varying from 5%to 75%, but rarely in 1.091/1.096 (6 of 16) with a purity always inferior to 30%, and only 2 of 16 in 1.096/1.103 with a purity inferior to 10 °c. When islets were predominantly found in the 1.081/1.091, generally few islets were found in the 1.037/1.051 laver with fat/ductal fragments. The top and bottom layers of the interfaces were choosen for mass islet purification with respect to the test gradient results to obtain the highest purity. The top layer of the interface was 1.051 in all procedures but two (1.081): the bottom layer was 1.091 in eight. 1.081 in five. and 1.096 in three. Confirmation that coloration of human islets with dithizone did not alter their inherent density was determined using parallel test gradients with digestate alone, and following coloration. Mean yield  $\pm$  SEM of isolation before purification was  $318 \pm 37 \times 10^3$  islets (5367 ± 624 islets/g) and  $245 \pm 33 \times 10^3$  IE (4296 ± 672 IE g). After purification it was  $188 \pm 32 \times 10^3$  islets (3112 ± 476 islets/g) and 115 ±  $15 \times 10^3$  IE (1893 ± 285 IE/g). Islet recovery index was  $55 \pm 6\%$  (range 12% to 99%). Purity of the final preparation was superior to 85% in all cases that had satisfying test gradients. In the three instances of poor digestion where no optimal layer was determined in the test gradient, purity

© 1994 by Appleton & Lange 0041-1345/94/\$3.00/+0

Transplantation Proceedings, Vol 26, No 6 (December), 1994: pp 3413-3415

3413

From the Laboratoire d'Endocrinologie Expérimentale (J.K.-C., Y.X., J.L.), Clinique Chirurgicale Adulte Est (F.P., C.P.), and Laboratoire de Culture Cellulaire (J.K.-C.), Centre Hospitalier et Universitaire de Lille, Lille, France.

Supported by grants from the Commission Mixte du CHU de Lille, the Fondation de la Recherche Médicale, and the Fondation de l'Avenir.

Address reprint requests to J. Kerr-Conte, Laboratoire de Culture Cellulaire, Centre Hospitalier et Universitaire de Lille, 1 Place de Verdun, 59045 Lille, France.



**Fig 1.** Test gradients performed before mass purification in 16 consecutive human islet isolation (X: low density ductal fragments. -: islets, o: exocrine tissue).

was inferior to 50% and yield was under 60.000 IE. Static incubation with high glucose confirmed insulin secretion and viability of purified islets (mean stimulation index  $\pm$ SEM: 2.6  $\pm$  0.5, n = 5).

#### DISCUSSION

Islet purification prior to transplantation has been experimentally shown to reduce their immunogenicity<sup>8</sup> and to increase islet implantation following grafting.9 Purification of islet preparations also increases the safety of the transplantation.<sup>5</sup> Therefore purification is used before clinical transplantation in all centers with the exception of one.<sup>10</sup> Among the different islet purification techniques available. isopyknic centrifugation in Euro-Ficoll discontinuous gradient has been used in most successful clinical islet transplantation trials.<sup>1-4</sup> Habitually three<sup>2</sup> or four<sup>1,3,4</sup> different density layers are systematically used: 1.108/1.091/HBSS and 1.108/1.096/1.037/HBSS with islet recovery, respectively, in the 1.096/1.037 and 1.091/HBSS. However, the reported purity of the preparations described in the abovementioned studies varies between donors and may range from 25% to 95%.11 The density of islet and exocrine tissue is altered by different conditions such as donor status or age,<sup>12</sup> harvesting,<sup>13</sup> or preservation<sup>14</sup> conditions, which can influence the digestion quality and therefore the purification yield. Poor digestion and a high rate of embedded islets with increased density lead invariably to poor purification. As shown in this study, the density of islet and exocrine tissue as well as their purity at each interface are variable in each donor pancreas and thus fixed density lavers cannot be

blindly applied. Continuous test gradient for each preparation has been proposed for discontinuous BSA gradients.<sup>5</sup> A similar continuous test gradient is not relevant for Euro-Ficoll discontinuous gradients because of osmotic variation.5 Because of the impracticality of multiple discontinuous test gradients.<sup>15,16</sup> no test gradient is habitually performed.1-4 However, the multilayer test gradient described here has allowed us to precisely determine the islet density for each isolation. In addition, staining of the preparation prior to introduction of Euro-Ficoll facilitates easy retrieval of numerous interfaces and rapid assessment of purity in an inverted microscope. This simple and rapid technique was easily performed during the isolation procedure and allows selection of layers of the islet recovery interface-top layer (1.037 or 1.051) to avoid contamination with fat and ductal tissue and bottom laver to privilege purity (1.081 or 1.091) or yield (1.091 or 1.096)-therefore tailoring the mass purification results to each preparation according to the desired application: optimize the purity for experimental studies or maximize the vield for transplantation.

#### REFERENCES

1. Ricordi C. Tzakis AG, Carroll PB, et al: Transplantation 53:407, 1992

Scharp DW, Lacy PE, Santiago JV, et al: Diabetes 39:15, 1990
Socci C, Falqui L, Davalli AM, et al: Acta Diabetol 28:151, 1991

4. Warnock GL, Kneteman NM, Ryan EA, et al: Diabetologia 35:89, 1992

5. London NJM, James RFL, Bell PRF: In: Ricordi C (@J)

16

#### HUMAN ISLET PURIFICATION

Pancreatic Islet Cell Transplantation. Austin: RG Landes, 1992, p 113

 Ricordi C, Lacy PE, Finke EH, et al: Diabetes 37:413, 1988
Robertson GS, Chadwick D, Contractor H, et al: Br J Surg 79:899, 1992

8. Gotoh M, Maki T, Satomi S, et al: Transplantation 42:387, 1986

9. Gray DWR, Sutton R, McShane P, et al: J Surg Res 45:432, 1988

10. Gores PF, Najarian JS, Stephanian E, et al: Lancet 341:19, 1993

11. Tzakis AG, Ricordi C, Alejandro R: Lancet 336:402, 1990 12. Ricordi C, Alejandro R, Zeng Y, et al: Transplant Proc

23:783, 1991 13. Socci C, Davalli AM, Vignali A, et al: Transplantation

55:661, 1993 14. Robertson GSM, Chadwick D, Thirdborough S, et al: Trans-

plantation 56:550, 1993 15. Lake SP, Chamberlain J, Walczak K, et al: Transplantation

48:354, 1989

16. Vives M, Sarri Y, Conget I, et al: Transplantation 53:243, 1992

Abstract Form for the 40th Meeting of the European lissue Culture Society, Rennes (France), 4-8 July 1993

ISLET OF LANGERHANS TRANSPLANTATION STUDIES: EMBEDDING OF CELL AGGREGATES IN BIOLOGICAL GLUE. J.Kerr-Conte, F.Pattou, C.Hober, C.Proye, B.Boilly, J.Lefebvre. Laboratoires d'Endocrinologie Expérimentale (Centre Oscar Lambret - CHRU) et de Biologie du Développement (UST Lille I) 59037 LILLE, France

Existing histological techniques for processing cellular aggregate cell types (islets of Langerhans diameter 50-500 $\mu$ ) include cellular dissaggregation with cytocentrifugation, the squash technique, and paraffin embedding with cell aggregrate sectioning. The former two require small cell numbers but disrupt the native cellular structure making precise morphological studies difficult. The routine, automated paraffin embedding procedures necessitate a minimum (3 mm) cellular pellet. This manditory cell mass requirement limits the variety of culture studies one can perform on non-proliferating cell types following a given isolation (600-1000 islets/ rat), and demands the use of large dishes or the combination of several wells, that often make expensive growth factor studies financially unfeasible. Methods: In these studies small quantities of cells (10-30 cultured islets) in one well (of a 24 well dish) were fixed (aqueous Bouin, 24h), washed twice (ddH2O), and the cellular pellet was mixed with a small volume (30-50µl) biological glue (Biocol\*, Bio-Transfusion, France). Following clot solidification, an additional 100 µl of Biocol\* was added to the clot to achieve the critical size required. Clots were then processed with the routine, automated histological procedures. Biocol\* clots were resistant to all steps including dehydration, xylene treatment, paraffin embedding, and sectioning. Double immunohistochemical markage techniques were performed. Results: Rat and fragile pig islets remained intact, and specific cell populations stained positive for insulin, glucagon, and somatostatin as well as bromodeoxyuridine, identifying the proliferating cell types. Conclusion: The advantages of cell aggregate embedding in biological glue include: reduction of time consuming manual histological processing of small cellular samples; elimination of the need for large cell numbers thus allowing histological processing of cell aggregates in individual wells; histochemical evaluation of cell aggregates with respect to normal cellular morphology.

In addition, the embedding of functional pig islets in biological glue prior to in vivo transplantation is currently under investigation in our laboratory.

# Hormone and Metabolic Research

#### **Editors-in-Chief**

E. F. Pfeiffer, Ulm G. M. Reaven, Palo Alto

#### Assistant Editors

F. Bischof, Ulm C. Meyerhoff, Ulm A. R. Hoffman, Palo Alto

#### Founded in 1969 by

R. Levine, Duarte and E. F. Pfeiffer, Ulm

#### **Co-Editors**

E. E. Baulieu, Paris G. Bettendorf, Hamburg R. N. Clayton, North Staffordshire S. S. Fajans, Ann Arbor E. A. Friedman, New York W.-D. Hetzel, Ulm J. J. Hoet, Brussels M. Kobayashi, Toyama Ch. Lauritzen, Ulm R. Levine, Duarte R. J. Mahler, New York W. J. Malaisse, Brussels L. Martini, Milan Z. Naor, Tel Aviv G. Pozza, Milan S. A. Raptis, Athens W. Reutter, Berlin W. A. Scherbaum, Leipzig R. Yalow, New York R. Ziegler, Heidelberg

### E 20447 E

Vol. 27 January 1995 Page 1 – 66

HMMRA 1 (27) 1-66

#### Ductal Cyst Formation in Adult Human Islets Three Dimensionally Cultured in Collagen Gels : Means to Human Islet Neogenesis

J.A. Kerr-Conte, F. Pattou, Y. Xia, C. Proye, B. Boilly, J. Lefebvre. Centre Hospitalier et Universitaire de Lille, Lille, France.

With the limited availability of mature human islet tissue for transplantation, increasing the mass of islets in vitro has become a foremost goal. In adult rodents, reactivation of the embryonic pathway allows the neoformation of islets via the proliferation and subsequent differentiation of the adult ductal epithelium. Expansion of precursor ductal pancreatic epithelium may represent the first critical step toward neogenesis of human adult islets in culture. In this study human islets were cultured in three dimensional collagen gels in association with extracellular matrix (ECM) components previously shown to induce proliferation of epithelial glandular structures in a variety of cell types.

Methods: Islets from 9 human pancreata (21 to 55 years old), were isolated with the Semi-Automated method of Ricordi and purified on Euroficoll gradients in the COBE 2991. After 48 hours culture in RPMI 1640 (1g/L glc) containing 10% fetal calf serum(FCS), nicotinamide (10 mM) and antibiotics, purified islets were suspended in rat tail Type I collagen, Matrigel&, or Agarose (0.3%, type I Sigma) (200 islets ml) and plated. Gels were cultivated in RPMI 1640 containing FCS.

**Results:** Mean (sem): Islet isolation yielded 296(44)  $\times 10^3$  islets (138(18)  $\times 10^3$  Islet-equivalents) with a purity  $\geq 80\%$ . After 2-5 days culture in rat tail collagen gets the presence of transparent bleb like cysts was observed contiguous to islets and as isolated spheres. In Matrigel, single cysts anastamosed together forming large branching tubular complexes. No cysts were formed in Agarose gets. Cysts were of ductal nature (pancreatic canalicular marker, CA19-9 positive), composed of a single epithelial cell layer (cytokeratin positive) with a collagen free lumen. The increased proliferation (<sup>3</sup>H thymidine incorporation) observed in collagen gets between 2-10 days culture was localized to ductal epithelium via BrdU incorporation in paraffin sections. Furthermore the presence of single endocrine cells (chromagranin A positive) intercalated between the epithelial cells of ductal cysts was frequently observed after 7 to 10 days of culture.

**Conclusion**: Three dimensional culture systems may be a means to the in vitro regeneration of human pancreatic islets from adult islet preparations provoking first an expansion of the adult ductal epithelium followed by its differention into endocrine islet cells.

EDITOR

ASSOCIATE EDITORS David D. Chaplin, M.D., Ph.D. George S. Eisenbarth, M.D., Ph.I. Michael L. McDaniel, Ph.D. Mike M. Mueckler, Ph.D. M. Alan Permutt, M.D. Julio V. Santiago, M.D. Joseph R. Williamson, M.D.

#### OURNAL OF THE AMERICAN DIABETES ASSOCIATION

diabe

ashington University School of Medicine (Box 8218) • 660 South Euclid Avenue • St. Louis, MO 63110 March 14, 1995 Telephone: (314) 362-78( FAX: (314) 362-78(

Dr. Julie Kerr-Conte Laboratory of Cell Culture University Hospital Center of Lille 1 Place de Verdun Lille 59045 FRANCE

#### Re: Ms. No. D95-65

Dear Dr. Kerr-Conte:

Your manuscript entitled "DUCTAL CYST FORMATION IN COLLAGEN EMBEDDED ADULT HUMAN ISLETS: A POTENTIAL MODEL FOR ISLET NEOGENESIS IN VITRO" has been examined by reviewers and the editors. We find your data to be of interest, but substantive questions have been raised. Therefore, we are unable to accept the manuscript for publication in its current form. However, if you feel that you can satisfactorily respond to each of the issues raised, we would be pleased to receive a revised manuscript. We cannot, of course, guarantee eventual publication, but we will give a thoughtfully revised version careful consideration.

DIABETES has strict editorial page limitations. The number of manuscripts published is, therefore, an inverse function of the length of the published manuscripts. Please give serious thought to shortening your revised manuscript as much as possible. In the long run it will benefit all authors.

Please submit four copies of the revised manuscript with the figures along with four copies of your specific responses to each of the points raised. The review process will be facilitated if you either modify the manuscript, or provide a compelling reason for not doing so, in response to each point. Also, please submit either a 3.5 or 5.25 inch diskette labeled with the author's name, manuscript title and number, and the software and hardware used.

Thank you for submitting your interesting work to DIABETES.

Sincerely,

Michael I. M. Daniel

Michael L. McDaniel, Ph.D. Associate Editor

MLM: 1mc Enclosure



Philip E. Cryer, M.D.