

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Soutenue publiquement le vendredi 01 février 2019

Par Mme. Adeline BREUVAL

LA GREFFE D'ÎLOTS DE LANGERHANS MICROENCAPSULES COMME
TRAITEMENT DU DIABETE DE TYPE 1

Membres du jury :

Président :

Madame SIEPMANN Florence, Professeur des Universités, Faculté de Pharmacie de Lille

Directeur, conseiller de thèse :

Madame HAMOUDI Mounira, Maître de Conférences, Faculté de Pharmacie de Lille

Assesseur :

Madame VANTYGHEM Marie-Christine, Professeur des Universités et Praticien Hospitalier en endocrinologie, diabétologie et maladies métaboliques, CHRU de Lille

Madame DE LABBEY Agathe, Docteur en Pharmacie, Lille

Madame CARRET Nathalie, Docteur en Pharmacie, Lille



Faculté de Pharmacie de Lille



3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX

☎ 03.20.96.40.40 - 📠 : 03.20.96.43.64

<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

Université de Lille

Président :	Jean-Christophe CAMART
Premier Vice-président :	Damien CUNY
Vice-présidente Formation :	Lynne FRANJIE
Vice-président Recherche :	Lionel MONTAGNE
Vice-président Relations Internationales :	François-Olivier SEYS
Directeur Général des Services :	Pierre-Marie ROBERT
Directrice Générale des Services Adjointe :	Marie-Dominique SAVINA

Faculté de Pharmacie

Doyen :	Bertrand DÉCAUDIN
Vice-Doyen et Assesseur à la Recherche :	Patricia MELNYK
Assesseur aux Relations Internationales :	Philippe CHAVATTE
Assesseur à la Vie de la Faculté et aux Relations avec le Monde Professionnel :	Thomas MORGENROTH
Assesseur à la Pédagogie :	Benjamin BERTIN
Assesseur à la Scolarité :	Christophe BOCHU
Responsable des Services :	Cyrille PORTA

Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Pharmacie Galénique
M.	DEPREUX	Patrick	ICPAL
M.	DINE	Thierry	Pharmacie clinique
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie
M.	LUYCKX	Michel	Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Pharmacie Galénique
M.	STAELS	Bart	Biologie Cellulaire

Liste des Professeurs des Universités

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Physique
M.	BERTHELOT	Pascal	Onco et Neurochimie
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie – Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	ICPAL
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences végétales et fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Physique
M.	DEPREZ	Benoît	Lab. de Médicaments et Molécules
Mme	DEPREZ	Rebecca	Lab. de Médicaments et Molécules
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	FOLIGNE	Benoît	Bactériologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie
Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie Industrielle
M.	GOOSSENS	Jean François	Chimie Analytique
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie Cellulaire
M.	LUC	Gerald	Physiologie
Mme	MELNYK	Patricia	Onco et Neurochimie
M.	MILLET	Régis	ICPAL
Mme	MUHR – TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PAUMELLE-LESTRELIN	Réjane	Biologie Cellulaire
Mme	PERROY	Anne Catherine	Législation
Mme	ROMOND	Marie Bénédicte	Bactériologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHÉRAERT	Eric	Législation
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie Industrielle
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie Industrielle
M.	WILLAND	Nicolas	Lab. de Médicaments et Molécules

Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	LANNOY	Damien	Pharmacie Galénique
Mme	ODOU	Marie Françoise	Bactériologie
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacie Galénique

Liste des Maîtres de Conférences

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALIOUAT	Cécile Marie	Parasitologie
M.	ANTHERIEU	Sébastien	Toxicologie
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
Mme	BANTUBUNGI	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Pharmacie Galénique
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie
M	BELARBI	Karim	Pharmacologie
M.	BERTHET	Jérôme	Physique
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BOCHU	Christophe	Physique
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie
M.	BOSC	Damien	Lab. de Médicaments et Molécules
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON	Sandrine	Biologie cellulaire
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie
Mme	CHARTON	Julie	Lab. de Médicaments et Molécules
M	CHEVALIER	Dany	Toxicologie
M.	COHELARD	Dominique	Biomathématiques
Mme	DANEL	Cécile	Chimie Analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
Mme	DUTOUT-AGOURIDAS	Laurence	Onco et Neurochimie
M.	EL BAKALI	Jamal	Onco et Neurochimie
M.	FARCE	Amaury	ICPAL
Mme	FLIPO	Marion	Lab. de Médicaments et Molécules
Mme	FOULON	Catherine	Chimie Analytique
M.	FURMAN	Christophe	ICPAL
Mme	GENAY	Stéphanie	Pharmacie Galénique

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GOOSSENS	Laurence	ICPAL
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques
Mme	HAMOUDI	Chérifa Mounira	Pharmacotechnie industrielle
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA	Kpakpaga Nicolas	Pharmacologie
M.	KARROUT	Youness	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Onco et Neurochimie
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie Analytique
Mme	LEHMANN	Hélène	Législation
Mme	LELEU-CHAVAIN	Natascha	ICPAL
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre Arthur	Sciences végétales et fongiques
M.	MORGENROTH	Thomas	Législation
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie
M.	POURCET	Benoît	Biochimie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques
Mme	RAVEZ	Séverine	Onco et Neurochimie
Mme	RIVIERE	Céline	Pharmacognosie
Mme	ROGER	Nadine	Immunologie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Lab. de Médicaments et Molécules
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques
M.	YOUS	Saïd	Onco et Neurochimie

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques

Professeurs Certifiés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	HUGES	Dominique	Anglais
Mlle	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeur Associé - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	DAO PHAN	Hai Pascal	Lab. Médicaments et Molécules
M.	DHANANI	Alban	Droit et Economie Pharmaceutique

Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacie Clinique
M.	GILLOT	François	Droit et Economie pharmaceutique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacie Clinique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques

AHU

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	DEMARET	Julie	Immunologie
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie
Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie



**Faculté de Pharmacie
de Lille**



3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX

☎ 03.20.96.40.40 - ✉ : 03.20.96.43.64

<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.

Remerciements

A mon jury :

Madame Mounira Hamoudi,

Je vous remercie pour votre écoute, votre bienveillance, vos précieux conseils et votre disponibilité. Soyez assuré de ma sincère reconnaissance.

Madame Florence Siepmann,

Je vous remercie chaleureusement d'avoir accepté de présider mon jury de thèse.

Madame Marie Christine Vantighem,

Je suis très reconnaissante de vous avoir comme membre de ce jury de thèse. Je voudrais également exprimer mon admiration pour l'ensemble de vos travaux de recherche. Veuillez accepter mes sincères remerciements.

Madame Agathe De Labbey et Madame Nathalie Carret,

Vous avez eu la gentillesse de participer à mon jury de thèse, merci infiniment pour votre disponibilité.

A ma famille :

A mes parents et grands-parents, vous avez toujours cru en moi et m'avez soutenu. Merci d'avoir fait de moi la jeune femme que je suis devenue.

A mon frère Damien, merci pour ces moments de partage, de rigolade.

A mes amis :

A mes amis de longue date Cécile et Héloïse avec qui vieillir est synonyme de grandir.

Aux lillois, merci pour ces belles années étudiantes passées à vos côtés, merci pour tous ces moments partagés et pour la suite.

A Arnaud, merci pour ton appui inconditionnel.

Glossaire

CHU	Centre Hospitalier Universitaire
CITR	Collaborative Islet Transplant Registry
CMC	Carboxyméthylcellulose
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CSE	Cellules souches embryonnaires
CSM	Cellules stromales mésenchymateuses
DID	Diabète insulino-dépendant ou diabète de type 1
DNID	Diabète non insulino-dépendant ou diabète de type 2
FID	Fédération Internationale du diabète
FTIR	Fourier transform infrared spectroscopy ou spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
GAD	Glutamic acid decarboxylase ou Anti-glutamate décarboxylase
GIP	Glucose-dependent insulintropic polypeptide ou Peptide insulino-trope dépendant du glucose
GLP-1	Glucagon like peptide-1
GRAGIL	Groupement Rhin-Rhône-Alpes-Genève pour la transplantation d'Îlots de Langerhans
HAS	Haute autorité de santé
HbA1c	Hémoglobine glyquée
HEMA MMA	Hydroxyéthylméthacrylate – méthylméthacrylate
HLA	Human Leucocyte Antigens
IA2	Anticorps anti islet antigen 2
IAA	Anticorps anti-insuline
ICA	Anticorps anti-cellule d'îlots
IEQ	Nombre d'îlots équivalents
IL-1 β	Interleukine 1 bêta
IPTR	International Pancreas Transplant Registry
Lille G4	Groupement pour la transplantation d'Îlots de Langerhans regroupant Amiens, Caen, Reims, Rouen et Lille
MAA	Methacrylic acid ou acide méthacrylique

MELAS	Myopathie, Encéphalopathie, Acidose lactique, Pseudo-acidents vasculaires cérébraux ou Stroke like
MIDD	Maternally Inherited Diabetes and Deafness
MMA	Methyl-methacrylate ou méthacrylate de méthyle
MODY	Maturity Onset Diabetes of the Young
OMS	Organisation mondiale de la santé
PEG	Polyéthylène Glycol
PLL	Poly-L-Lysine
PLO	Poly-L-Ornithine
PSSa	Polystyrene sulfonic acid ou polystyrène d'acide sulfonique
TCR	Récepteur des lymphocytes T
TGF- β	Transforming growth factor-beta ou facteur de croissant transformant
TNF- α	Tumor necrosis factor-alpha ou facteur de nécrose tumorale
TRIMECO	Essai contrôlé randomisé comparant l'efficacité métabolique de la transplantation d'îlots pancréatiques allogéniques à l'insulinothérapie intensive pour le traitement du diabète de type 1.
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor ou facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
XPS	X ray photoelectron spectroscopy ou spectroscopie photoélectrique des rayons X

Table des matières

Introduction.....	15
I. Le diabète.....	16
1 Généralités sur le diabète	16
1.1 Définition.....	16
1.2 Epidémiologie	16
1.3 Les différents types de diabètes	17
1.3.1 Diabète de type 1	18
1.3.2 Diabète de type 2.....	21
1.3.3 Diabètes spécifiques.....	22
1.3.4 Diabète gestationnel	25
1.4 Complications liées au diabète	26
1.4.1 Les complications métaboliques aiguës.....	26
1.4.2 Les complications dégénératives chroniques.....	27
2 La sécrétion d'insuline par les îlots de Langerhans.....	28
2.1 Physiologie des îlots de Langerhans	28
2.2 L'insuline.....	29
2.2.1 Régulation de l'insulino-sécrétion	30
2.2.2 Propriétés physiologiques de l'insuline sur l'organisme	31
3 Les traitements actuels du diabète de type 1	31
3.1 Insulinothérapie classique	31
3.2 Pompes à insuline	34
3.3 Transplantation de pancréas	36
3.4 Greffe d'îlots de Langerhans.....	37
3.4.1 Techniques de la greffe d'îlots de Langerhans	37
3.4.2 Données cliniques.....	41
3.4.3 Situation de la greffe d'îlots de Langerhans en France.....	43
3.4.4 Qualité de vie du patient greffé	44
3.4.5 Limites de la greffe d'îlots de Langerhans	45
II. Microencapsulation d'îlots de Langerhans	47

1	Propriétés requises des microcapsules destinées à la transplantation d'îlots de Langerhans	48
1.1	Perméabilité sélective	48
1.2	Biocompatibilité.....	49
1.2.1	Biocompatibilité vis-à-vis des cellules encapsulées	49
1.2.2	Biocompatibilité vis-à-vis de l'hôte :	50
1.3	Résistance mécanique et chimique	54
1.4	Taille des microcapsules	55
2	Techniques de microencapsulation des îlots de Langerhans	56
2.1	Matériaux d'encapsulation	56
2.1.1	Les polymères d'origine naturelle	57
2.1.2	Les polymères synthétiques.....	66
2.2	Techniques de production des microcapsules	68
2.2.1	Systèmes macroscopiques	68
2.2.2	Systèmes microfluidiques	77
2.3	Site de transplantation	80
3	Résultats des études <i>in vivo</i>	81
	III. Perspectives.....	85
1	Agrégats	85
2	Utilisation de facteurs pro-angiogéniques	86
3	Revêtement conforme	87
4	Alternatives aux îlots de Langerhans humains.....	88
4.1	Les xénogreffes	89
4.2	La thérapie cellulaire.....	90
	Conclusion.....	93

Liste des figures

Figure 1. Nombre estimé de personnes atteintes de diabète à travers le monde en 2017 et 2045 (20-79 ans) ⁽²⁾	17
Figure 2. Représentation schématique des structures des îlots de Langerhans humains (à droite) et de rongeurs (à gauche) ⁽⁴⁸⁾	29
Figure 3. Structure primaire simplifiée de l'insuline et du peptide C ⁽⁵⁰⁾	30
Figure 4. Actions générales de l'insuline sur l'organisme ⁽⁵⁰⁾	31
Figure 5. Représentation schématique des étapes successives de la greffe des îlots de Langerhans ⁽⁸²⁾	39
Figure 6. Principe de l'immuno-isolation des îlots de Langerhans ⁽⁹⁹⁾	47
Figure 7. Activation de la réponse immunitaire suite à la chirurgie d'implantation des îlots de Langerhans ⁽¹⁰²⁾	51
Figure 8. Structure chimique de l'alginate : acide β -D-mannuronique (M) et acide α -L-guluronique (G) ⁽¹⁰²⁾	57
Figure 9. Structure de la membrane de la microcapsule d'APA ⁽¹⁰²⁾	60
Figure 10. Effet de la PLL et PLO sur la résistance mécanique des microcapsules ⁽¹³⁵⁾	61
Figure 11. Effets de différents polycations (Calcium, Baryum, Strontium) sur la résistance mécanique (via le module de Young, noté E) des microcapsules d'alginate fortement dosées en unités G ou en unités M ⁽¹³⁸⁾	62
Figure 12. Structure de l'agarose : unités alternées de β -D-galactopyranose et de 3,6-anhydro-L-galactopyranose ⁽¹⁴¹⁾	63
Figure 13. Représentation schématique d'une microcapsule d'agarose – PSSa ⁽¹⁴⁴⁾	64
Figure 14. Photo d'un disque avec 48 fils en acier inoxydable ⁽¹⁶²⁾	72
Figure 15. Représentation schématique des procédés de production des gouttelettes d'une suspension cellulaire ⁽¹⁵⁶⁾	73
Figure 16. Le modèle dit « boîte à œufs » ⁽¹⁶⁵⁾	75
Figure 17. Représentation schématique de la formation de gouttelettes dans des systèmes microfluidiques de géométries différentes ⁽¹⁷⁰⁾	78
Figure 18. Revêtement conforme versus microencapsulation conventionnelle des îlots de Langerhans.	88

Liste des tableaux

Tableau 1. Récapitulatif des différents types d'insuline commercialisés en France (Vidal).....	32
Tableau 2. Tableau récapitulatif du nombre de donneurs, infusions et receveurs de 1999 à 2015 ⁽⁸⁷⁾	42
Tableau 3. Résumé des études cliniques réalisées dans le monde.....	84

Introduction

Le diabète est une des maladies chroniques les plus courantes de notre société. Cette maladie touche plus de 400 millions de personnes dans le monde et sa prévalence est en constante augmentation.

Le diabète de type 1 est la conséquence d'une réaction auto immune qui détruit partiellement ou entièrement les cellules bêta des îlots de Langerhans, cellules productrices de l'insuline. Il en résulte une carence insulinique symptomatique.

La principale approche thérapeutique est un traitement de substitution par injection d'insuline exogène. Malgré les importants progrès accomplis dans sa prise en charge thérapeutique, l'insulinothérapie reste un traitement lourd et contraignant, ce qui justifie la recherche de solutions thérapeutiques alternatives.

La thérapie cellulaire représente une approche très prometteuse. La transplantation d'îlots de Langerhans permet la restitution d'une sécrétion d'insuline physiologique. Les résultats sont encourageants et augmentent significativement la qualité de vie des patients ayant bénéficiés de cette approche thérapeutique. Toutefois elle nécessite l'administration à vie de médicaments immunosuppresseurs associés à des effets secondaires pouvant être graves.

C'est pourquoi depuis quelques années, la recherche se tourne vers le développement d'un concept alternatif ne nécessitant pas de traitements immunosuppresseurs : l'implantation d'îlots de Langerhans dans des microcapsules semi-perméables et biocompatibles. La membrane physique assure la libre diffusion du glucose, de l'insuline, de l'oxygène et des nutriments tout en empêchant le passage des molécules du système immunitaire de l'hôte.

La microencapsulation des îlots de Langerhans est un système complexe puisque les capsules contiennent des cellules vivantes. Le choix des matériaux et les méthodes de production de ces dispositifs doivent répondre à des conditions spécifiques afin d'assurer la survie et la fonctionnalité des cellules encapsulées.

Après un rappel général sur le diabète, sa définition, ses complications et ses traitements, nous présenterons la technique de greffe des îlots de Langerhans. Dans un second temps nous étudierons les matériaux et techniques d'encapsulation des îlots de Langerhans. Enfin nous présenterons différentes options envisagées pour optimiser la survie des îlots de Langerhans microencapsulés transplantés.

I. Le diabète

1 Généralités sur le diabète

1.1 Définition

Le diabète est une maladie métabolique caractérisée par une hyperglycémie chronique secondaire à une déficience de sécrétion d'insuline et/ou une mauvaise utilisation de l'insuline par l'organisme. On distingue classiquement deux grands types de diabète :

- le diabète de type 1, anciennement appelé diabète insulino-dépendant (DID), d'origine auto-immune, qui représente environ 10% des diabétiques ⁽¹⁾ ;
- et le diabète de type 2, autrefois appelé diabète non insulino-dépendant (DNID), beaucoup plus fréquent, il représente environ 90% des diabétiques ⁽¹⁾.

Sans traitement approprié, cette pathologie entraîne des lésions de nombreux tissus et organes et conduit à l'apparition de séquelles pouvant être irréversibles telles que des complications rénales, des maladies cardio-vasculaires, des atteintes du système nerveux et peut causer la cécité.

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), un patient est diagnostiqué diabétique dès lors qu'il présente, à deux reprises, une glycémie à jeun supérieure ou égale à 1,26g/L, ou une glycémie sur plasma veineux supérieure ou égale à 2g/L deux heures après l'ingestion de 75g de glucose.

1.2 Epidémiologie

Le diabète est une des plus grandes crises de santé mondiale du XXI^e siècle. Chaque année, de plus en plus de personnes développent cette maladie. Selon les estimations de la Fédération internationale du diabète (FID), 425 millions de personnes sont atteintes de diabète. On estime qu'en 2045 ce chiffre sera porté à 629 millions ⁽²⁾.

Dans la plupart des pays, le diabète a augmenté parallèlement à des mutations culturelles et sociales rapides : vieillissement de la population, urbanisation croissante, activité physique réduite, consommation de sucre plus élevée et consommation limitée de fruits et légumes.

Bien que le diabète de type 1 soit moins fréquent, le nombre de cas augmente d'environ 3 % par an dans le monde ^(1,2). Au total plus d'un million d'enfants et d'adolescents de moins de 20 ans souffriraient de diabète de type 1 à travers le monde.

Dans la plupart des pays à revenus élevés quasiment tous les enfants et adolescents atteints de diabète ont un diabète de type 1. L'Europe a la prévalence la plus élevée d'enfants atteints de diabète de type 1 à savoir environ 268 000 cas ⁽²⁾.

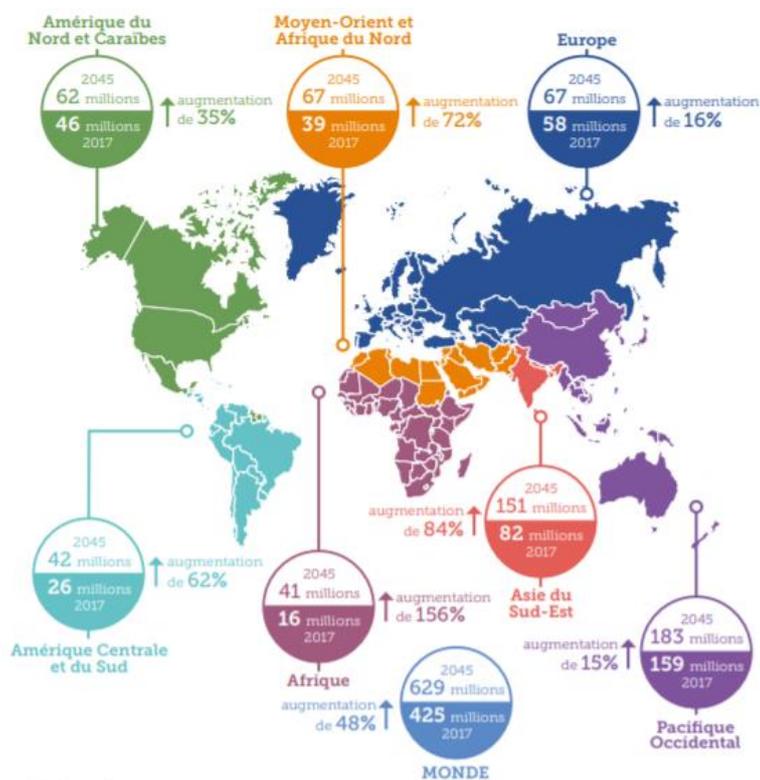


Figure 1. Nombre estimé de personnes atteintes de diabète à travers le monde en 2017 et 2045 (20-79 ans) ⁽²⁾.

1.3 Les différents types de diabètes

La nouvelle classification des diabètes proposée par l’OMS en 1999 distingue quatre types de diabète : le diabète de type 1, le diabète de type 2, les autres diabètes spécifiques et le diabète gestationnel ⁽³⁾.

Ces quatre types de diabètes ont en commun une hyperglycémie chronique, des complications métaboliques et dégénératives, mais la pathogénèse et les traitements sont différents.

1.3.1 Diabète de type 1

Le diabète de type 1 est la conséquence d'une réaction auto-immune qui détruit partiellement ou entièrement les cellules bêta des îlots de Langerhans. Il en résulte une déficience relative ou absolue en insuline.

Contrairement au diabète de type 2, le diabète de type 1 se manifeste de manière soudaine. Il est caractérisé par un syndrome cardinal associant *polyuro-polydipsie* (soif excessive qui aboutit à l'augmentation de la quantité d'urines émise par jour), *polyphagie* (faim excessive avec absence de sensation de satiété), *amaigrissement et asthénie* ⁽¹⁾. Une cétose peut être associée à ce syndrome cardinal lorsque la carence en insuline est très élevée.

Le diabète de type 1 est observé principalement chez une population jeune.

1.3.1.1 Physiopathologie

L'histoire naturelle du diabète de type 1 est classiquement décrite en trois phases : *une phase de latence*, définie par la prédisposition génétique; *une phase préclinique*, caractérisée par une activation du système immunitaire contre les cellules bêta des îlots de Langerhans; *une phase clinique* qui survient lorsque environ 80 % des cellules bêta des îlots de Langerhans ont été détruites ⁽⁴⁾. L'apparition de cette réaction auto-immune serait liée à l'association de gènes de prédisposition, de facteurs environnementaux et de facteurs auto-immuns.

❖ Facteurs génétiques

Des études du génome ont permis de localiser des régions génétiques impliquées dans la susceptibilité au diabète de type 1.

La région génétique de plus forte susceptibilité est située sur le chromosome 6 au niveau des gènes du système Human Leukocyte antigen (HLA) de classe II, mais de nombreux autres gènes contribuent également à la susceptibilité génétique du diabète de type 1 avec notamment la région promotrice du gène de l'insuline ^(1,5).

Le système HLA ou complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) joue un rôle physiologique fondamental dans la réponse immunitaire : il a pour fonction de présenter les antigènes protéiques au récepteur des lymphocytes T (TCR). Les molécules du CMH sont classées en deux grands groupes :

- CMH de classe I : exprimées par toutes les cellules nucléées de l'organisme, elles interagissent avec les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques à l'origine de la destruction des cellules du soi altérées ;
- CMH de classe II : exprimées par les cellules présentatrices de l'antigène (cellules dendritiques ou encore macrophages), elles interagissent avec les lymphocytes T CD4+ à l'origine de l'activation de la réponse immunitaire.

En ce qui concerne le système HLA de classe II, deux haplotypes sont fréquemment associés avec le diabète de type 1: l'haplotype DR3 et l'haplotype DR4 ^(5,6).

Un enfant porteur des haplotypes DR3 et DR4 a un risque d'environ 1 sur 20 de développer un diabète. Si cet enfant a un frère ou une sœur diabétique présentant les mêmes haplotypes que ce dernier, le risque est encore plus élevé (environ 55%) ⁽⁵⁾.

Malgré la forte prédisposition génétique, seuls 10% des cas de diabète de type 1 sont familiaux ⁽⁷⁾, ceci implique que d'autres facteurs doivent se surajouter aux facteurs génétiques.

❖ Facteurs environnementaux

L'augmentation du diabète de type 1 au cours des dernières décennies suggère que l'environnement pourrait agir sur différents stades de la maladie en tant que facteur déclenchant ou modulateur de la réaction immunitaire.

Plusieurs facteurs environnementaux sont incriminés, qu'il s'agisse de facteurs nutritionnels ^(8,9) ou viraux.

La piste virale est suspectée depuis longtemps, avec une association préférentielle avec les entérovirus ⁽¹⁰⁾. Une infection par entérovirus est dix fois plus importante chez un patient atteint de diabète de type 1 par rapport à un sujet contrôlé non diabétique ⁽¹¹⁾.

❖ Facteurs auto-immuns

La destruction des cellules bêta des îlots de Langerhans fait suite à une activation de la réponse immunitaire avec une rupture de la tolérance immunitaire vis-à-vis du soi. Les îlots de Langerhans sont le siège d'une infiltration appelée « insulite » par des cellules du système immunitaire. Ces infiltrats sont composés majoritairement de lymphocytes T CD8+ cytotoxiques, mais aussi de lymphocytes CD4+, auxquels s'associent des macrophages et des lymphocytes B ^(1,12).

L'immunité cellulaire semble jouer un rôle prépondérant. En effet, la présentation de peptide issu des cellules bêta par les cellules présentatrices d'antigène aux lymphocytes T CD4+ est responsable de l'initiation de la réponse immunitaire. Les lymphocytes T CD8+ sont, quant à eux, à l'origine d'un effet destructeur sur les cellules bêta des îlots de Langerhans ⁽¹³⁾.

Le processus auto-immun s'accompagne de l'apparition d'auto-anticorps qui sont des marqueurs fiables du déroulement du processus auto-immun pathologique ^(1,14,15) :

- les anticorps anti-cellules d'îlots (ICA) ;
- les anticorps anti-insuline (IAA) ;
- les anticorps anti-glutamate décarboxylase (GAD) détectés chez 70-80% des diabètes insulino-dépendant récents ;
- les anticorps anti-islet antigen 2 (IA2). La protéine IA2 correspond à une forme inactive de la famille des tyrosines protéines phosphatases ;
- les anticorps anti-transporteur de zinc (ZnT8). Le diabète de type 1 est associé à des auto-anticorps dirigés contre la protéine du transport du zinc. ZnT8 est une protéine membranaire qui assure le transport et la pénétration du zinc dans les granules d'exocytose des cellules bêta. Le zinc assure la stabilité de l'insuline sous forme hexamérique et joue un rôle primordial dans le stockage de l'insuline ^(16,17).

La détection des auto-anticorps circulant dans le sang peut être utilisée pour diagnostiquer la phase de pré-diabète chez les enfants ou la fratrie d'un diabétique de type 1 afin de permettre une prise en charge plus précoce ou chez des sujets jeunes présentant une glycémie élevée ⁽¹⁴⁾.

Le diabète de type 1 est également fréquemment associé à d'autres maladies auto-immunes spécifiques d'organe tel que la thyroïdite d'Hashimoto, la maladie de Basedow ou encore la maladie coéliqua ^(18,19). Ces maladies auto-immunes s'accompagnent de la présence d'auto-anticorps spécifiques d'organes.

1.3.1.2 Traitement

Le traitement est détaillé dans la section I.3 de la thèse.

1.3.2 Diabète de type 2

Le diabète de type 2 est un trouble de l'assimilation, de l'utilisation ou du stockage des sucres apportés par l'alimentation, qui conduisent à une hyperglycémie. Il est caractérisé par deux anomalies : un état d'insulino-résistance et un déficit plus ou moins marqué de l'insulino-sécrétion ⁽²⁰⁾.

Le diabète de type 2 est une maladie évolutive, le déficit en insuline responsable de l'hyperglycémie est précédé par 10 ou 20 ans d'hyperinsulinisme suite à une insulino-résistance ⁽²¹⁾. L'insulino-résistance peut être caractérisée comme un état de diminution de la réponse cellulaire et tissulaire à l'insuline ou une diminution de la sensibilité à l'insuline.

Il est observé le plus souvent chez des sujets de plus de 40 ans, cependant le mode de vie actuel et l'accroissement du pourcentage des obèses dans les populations jeunes a abouti à l'observation de cas de diabète de type 2 chez les enfants et les jeunes adultes ⁽²²⁾.

1.3.2.1 Physiopathologie

Le diabète de type 2 résulte de la conjonction de plusieurs gènes de susceptibilité dont l'expression dépend de facteurs environnementaux, tels que le surpoids ou l'obésité, la consommation excessive de graisses saturées et de sucres rapides, le manque d'activité physique, ou encore les antécédents familiaux ⁽²³⁾.

1.3.2.2 Traitement

L'élément de référence dans la prise en charge du diabète de type 2 est l'hémoglobine glyquée (HbA1c). L'hémoglobine est un composant des globules rouges dont le rôle est de transporter l'oxygène. Dans les vaisseaux sanguins, le sucre peut se lier à l'hémoglobine et en modifier sa structure pour donner ce que l'on appelle l'HbA1c. La mesure de l'HbA1c permet de connaître l'équilibre glycémique sur environ les trois derniers mois. Chez les patients non diabétiques, l'HbA1c est inférieure à 6,5% ⁽²¹⁾.

La prise en charge thérapeutique repose sur trois principaux piliers ⁽²¹⁾:

- la mise en place de mesures hygiéno-diététiques efficaces et d'une activité physique régulière ;
- les traitements médicamenteux :

La stratégie médicamenteuse diffère en fonction de l'HbA1c et du profil des patients. Elle repose dans un premier temps sur le recours aux antidiabétiques oraux. La metformine est le médicament de première intention en monothérapie ⁽²¹⁾. L'insuline est le traitement de choix lorsque les traitements oraux et non insuliniques ne permettent pas d'atteindre l'objectif glycémique.

- l'éducation thérapeutique des patients.

L'objectif de la prise en charge est de normaliser la glycémie chez ces patients afin de réduire la morbi-mortalité.

1.3.3 Diabètes spécifiques

Les diabètes spécifiques surviennent comme des complications d'autres affections, tels que :

❖ Mutations génétiques des cellules bêta des îlots de Langerhans

○ Mutations chromosomiques

Les diabètes de type MODY se manifestent dès l'enfance ou l'adolescence d'où le nom : Maturity Onset Diabetes of the Young ou diabète de type adulte chez le jeune ⁽²⁴⁾.

Ce diabète non auto-immun est responsable d'anomalie de la sécrétion d'insuline. C'est un diabète familial avec une transmission autosomique dominante. Il concerne la moitié des personnes de chaque génération d'une même famille dans les deux sexes.

Plusieurs gènes impliqués dans l'apparition de la maladie ont été identifiés. Les deux sous-types les plus fréquents sont : (1) la mutation du gène de la glucokinase (MODY-2) qui se caractérise par une hyperglycémie modérée, stable et ne nécessite habituellement pas de traitement et (2) la mutation du gène codant pour le facteur nucléaire hépatique alpha-1 (MODY-3) pour laquelle la présentation clinique est très variable ^(24,25).

Le dépistage génétique permet de diagnostiquer le diabète MODY ainsi que d'en caractériser le sous-type pour permettre sa prise en charge thérapeutique. En effet l'évolution, les conséquences cliniques et le traitement de ces diabètes diffèrent selon l'origine génétique.

- **Mutations de l'ADN mitochondrial**

Différentes anomalies du génome mitochondrial, mutations et délétions, sont responsables de syndromes comportant un diabète sucré. Le déficit de l'insulino-sécrétion est secondaire à la dysfonction de la chaîne respiratoire mitochondriale. Le MIDD (Maternally Inherited Diabetes and Deafness) est la forme la plus fréquemment rencontrée de diabète mitochondrial chez l'adulte ⁽²⁶⁾. Il est caractérisé par sa transmission maternelle, des troubles de l'audition et une dystrophie maculaire réticulée. De nombreuses autres atteintes peuvent compléter ce tableau telles que des signes neurologiques (syndrome MELAS : Myopathie, Encéphalopathie, Acidose lactique, Pseudo-accidents vasculaires cérébraux ou Stroke-like), cardiaques (cardiomyopathie) ou oculaires (atteinte rétinienne). Ce syndrome est lié à une mutation ponctuelle en position 3 243 de l'ADN mitochondrial, avec le remplacement d'une *adénine* par une *guanine* au niveau de l'ARN de transfert de la leucine ⁽²⁷⁾. La prise en charge est symptomatique, des antidiabétiques oraux et/ou une insulinothérapie sont utilisés pour traiter ce type de diabète ⁽²⁸⁾.

- ❖ **Maladie pancréatique**

Les étiologies du diabète dit pancréatique sont multiples. En effet, le diabète peut être secondaire à une pancréatectomie ^(29,30), un cancer du pancréas ⁽³¹⁾, une hémochromatose ⁽³²⁾ ou encore à une mucoviscidose ⁽³³⁾. Ces maladies pancréatiques sont responsables d'atteintes portant sur la fonction exocrine (production d'enzymes pancréatiques) et endocrine du pancréas (production des hormones pancréatiques comme l'insuline et le glucagon). Il en résulte un déficit hormonal à l'origine de troubles glycémiques.

Le traitement du diabète pancréatique repose le plus souvent sur une insulinothérapie. L'insulinothérapie sera basée sur la réalisation de multi-injections à faibles doses associées à une auto-surveillance glycémique pour réduire le risque d'hypoglycémie. Une correction du déficit exocrine par une enzymothérapie et une supplémentation vitaminique sont également associées.

❖ **Maladie endocrinienne**

Un grand nombre de maladies endocriniennes peuvent s'accompagner d'anomalies de la tolérance glucidique. Parmi ces endocrinopathies, nous pouvons citer ^(23,34,35):

- l'acromégalie responsable d'une insulino-résistance induite par une production excessive d'hormones de croissance ;
- le syndrome de Cushing, diabétogène du fait de l'insulino-résistance générée par l'effet stimulant des glucocorticoïdes sur la néoglucogenèse et la glycogénolyse hépatique.

La prise en charge thérapeutique propre de la maladie endocrinienne s'accompagne le plus souvent d'une amélioration du diabète, mais lorsque celui-ci persiste, il nécessite le recours aux traitements antidiabétiques oraux voire à l'insuline ⁽³⁶⁾. Le choix du traitement antidiabétique doit tenir compte des mécanismes physiopathologiques qui sous-tendent les anomalies du métabolisme glucidique dans la maladie endocrinienne en cause.

❖ **Iatrogènes**

Les étiologies iatrogènes sont classiquement répertoriées dans la liste des causes potentielles de survenue d'un diabète. De nombreux traitements, au premier rang desquels les corticothérapies, immunosuppresseurs et anti-rétroviraux, ont été identifiés au fil du temps comme pourvoyeurs d'anomalies de la tolérance au glucose ⁽²³⁾.

La prise en charge des diabètes iatrogènes est relativement comparable à celle préconisée pour un diabète de type 2, à savoir que les mesures diététiques et l'activité physique, ont une part importante dans le traitement.

Le plus commun et le mieux connu des diabètes iatrogènes est celui lié à l'administration de glucocorticoïdes. En effet, les effets des glucocorticoïdes sur le métabolisme du glucose concourent à une hyperglycémie ⁽³⁷⁾. En pratique la prescription d'une corticothérapie peut être à l'origine de deux situations :

- la découverte d'un diabète méconnu décompensé par la corticothérapie, avec persistance d'une intolérance au glucose après l'arrêt de la corticothérapie ;
- ou la découverte d'un trouble du métabolisme glucidique chez un patient non connu pour être diabétique. Nous parlerons alors de diabète cortico-induit, si

l'HbA1c est inférieure à 6%, avec le plus souvent un retour à la normale des glycémies quelques jours après l'arrêt du traitement.

La prise en charge thérapeutique du diabète cortico-induit dépend du risque de déséquilibre glycémique apprécié par la voie d'administration, la dose et la durée envisagée de la corticothérapie ⁽³⁸⁾. Le recours à l'insulinothérapie est toutefois privilégié.

1.3.4 Diabète gestationnel

Il s'agit d'un trouble de la tolérance glucidique conduisant à une hyperglycémie de sévérité variable débutant ou diagnostiqué pour la première fois pendant la grossesse. Deux entités différentes sont à distinguer ⁽³⁹⁾:

- le diabète patent, le plus souvent de type 2 : préexistant à la grossesse et découvert lors de celle-ci, avec persistance d'une intolérance au glucose après l'accouchement ;
- le diabète gestationnel caractérisé par une anomalie de la tolérance glucidique apparue au cours de la grossesse entre la 24 et la 28^{ème} semaine d'aménorrhée et qui lui disparaît généralement après l'accouchement.

Lors de la grossesse des modifications du métabolisme glucidique sont observées afin de pouvoir répondre aux besoins énergétiques du fœtus. La grossesse est caractérisée par un état diabétogène. Il existe physiologiquement un état d'insulino-résistance progressif et réversible qui est compensé par un hyperinsulinisme réactionnel. Dans le diabète gestationnel, il persiste une exagération de cette insulino-résistance et/ou des anomalies de l'insulino-sécrétion avec comme finalité une anomalie de la tolérance glucidique. La production des hormones au cours de la grossesse est vraisemblablement un des mécanismes expliquant ces anomalies physiologiques ⁽⁴⁰⁾.

Les femmes ayant un diabète gestationnel ont un risque accru de complications pendant la grossesse et à l'accouchement (pré-éclampsie, macrosomie fœtale) ^(40,41). Leur risque ainsi que celui de leur enfant, d'avoir un diabète de type 2 à un stade ultérieur de leur vie, augmente également ⁽⁴¹⁾.

Les femmes atteintes d'hyperglycémie pendant la grossesse peuvent maîtriser leur taux de glycémie par une alimentation saine, des exercices physiques modérés et un contrôle de la glycémie. Si malgré ces mesures, la glycémie demeure trop élevée,

dans certains cas, une médication orale ou de l'insuline peuvent également être prescrites ⁽⁴¹⁾.

1.4 Complications liées au diabète

L'évolution du diabète est marquée par la survenue de complications à rechercher de façon régulière. Nous distinguons deux types de complications :

- complications métaboliques aiguës ;
- complications dégénératives chroniques.

Ces complications ont pour origine commune l'hyperglycémie chronique.

1.4.1 Les complications métaboliques aiguës

Ces complications métaboliques sont dues à un déséquilibre entre les besoins et les apports en insuline de l'organisme. Les deux complications les plus fréquemment rencontrées sont l'acidocétose diabétique et l'hypoglycémie.

❖ L'acidocétose diabétique

L'acidocétose diabétique est la conséquence d'une carence profonde en insuline. Elle peut inaugurer un diabète ou être la conséquence d'un déséquilibre sévère chez un patient diabétique connu pour sous-dosage.

Le manque d'insuline entraîne une augmentation de la néoglucogenèse et de la glycogénolyse mais aussi une diminution de l'utilisation périphérique du glucose par les tissus insulino-sensibles. Ces actions contribuent à augmenter la glycémie et sont responsables du syndrome cardinal (glycosurie, déshydratation, asthénie, troubles digestifs) qui précède l'acidocétose ^(23,42).

La carence insulinique favorise également l'augmentation de la lipolyse périphérique qui libère de grandes quantités d'acides gras, qui seront oxydés au niveau du foie, en Acétyl-coenzyme A puis déviés vers la voie des corps cétoniques de part la saturation du cycle de Krebs ^(23,42).

Trois stades peuvent alors se succéder : (1) *la cétose* (présence accrue de corps cétoniques dans le sang et les urines), (2) *l'acidocétose* entraînant une baisse du pH sanguin et (3) *le coma acidocétosique* responsable d'hospitalisation et de morbidité.

L'approche thérapeutique repose sur la restauration de la volémie, l'insulinothérapie, la correction de l'acidocétose et des troubles hydro-électrolytiques ⁽⁴³⁾.

❖ **L'hypoglycémie**

L'hypoglycémie est une complication fréquemment observée chez les sujets diabétiques. Elle doit être systématiquement évoquée en raison de la mise en jeu du pronostic vital ou fonctionnel. Les causes d'hypoglycémies peuvent être multiples.

Chez le diabétique de type 1, il s'agit le plus souvent d'une inadéquation entre les doses d'insuline, les apports glucidiques et l'activité physique.

Le seuil de perception d'une hypoglycémie est variable d'un individu à l'autre. Les manifestations évocatrices d'une hypoglycémie sont de plusieurs types avec le plus souvent des symptômes neurovégétatifs (tachycardie, asthénie, sueurs froides, faim impérieuse) liés à la stimulation du système nerveux autonome et des symptômes neuroglycopéniques (troubles neurologiques) liés à la souffrance du système nerveux central ^(23,44).

Le traitement de l'hypoglycémie repose sur l'administration orale de sucres (boissons sucrées, morceaux de sucre) si le patient est conscient. Lorsque le patient est inconscient, l'administration de glucose est réalisée par voie intraveineuse.

1.4.2 Les complications dégénératives chroniques

Ces complications sont communes à tous les types de diabète et sont une cause majeure de handicap, de diminution de la qualité de vie et de décès prématuré. Les deux facteurs de risque de leur survenue sont la durée d'évolution de la maladie et la qualité de l'équilibre glycémique. Ces complications peuvent être évitées ou retardées en normalisant autant que possible la glycémie, la pression artérielle ou encore le taux de cholestérol. Les complications microangiopathiques sont classiquement distinguées des complications macroangiopathiques:

❖ **La microangiopathie diabétique**

L'hyperglycémie chronique altère la microcirculation sanguine. L'épaississement de la membrane basale des capillaires en constitue la lésion fondamentale. L'atteinte des capillaires s'exprime essentiellement au niveau de la rétine (rétinopathie), des glomérules rénaux (insuffisance rénale) et des nerfs périphériques ^(45,46).

Les neuropathies diabétiques sont probablement les complications les plus courantes du diabète. Jusqu'à 50 % des diabétiques souffrent à des degrés divers de ces neuropathies ⁽⁴⁶⁾. Le type le plus courant est la neuropathie périphérique qui se traduit

par une perte de la sensibilité et qui affecte principalement les nerfs sensoriels des pieds. De ce fait, des blessures peuvent passer inaperçues et entraîner une ulcération, des infections graves et, dans certains cas, des amputations.

❖ **La macroangiopathie diabétique**

La macroangiopathie est à l'origine des complications les plus graves du diabète. Elle correspond à l'atteinte des grosses artères. Le développement de l'athérosclérose va avoir pour principales conséquences : l'infarctus du myocarde, l'accident vasculaire cérébral, les artérites des membres inférieurs ⁽⁴⁶⁾.

Cependant contrairement à la microangiopathie, spécifique au diabète, les lésions de macroangiopathie ne sont pas spécifiques de la maladie diabétique. L'hyperglycémie ne semble pas intervenir directement mais plutôt en potentialisant les facteurs de risque d'athérosclérose tels que l'hypertension artérielle, le tabagisme ou encore l'hypercholestérolémie.

2 La sécrétion d'insuline par les îlots de Langerhans

2.1 Physiologie des îlots de Langerhans

Le pancréas est une glande située dans la partie postérieure de la cavité abdominale, elle est à la fois exocrine et endocrine.

La partie exocrine est composée de cellules ductales et acineuses. Les cellules ductales assurent la sécrétion hydroélectrolytique, riche en bicarbonate, afin de réguler le pH du suc pancréatique. Les cellules acineuses ont pour fonction de synthétiser les enzymes digestives.

La partie endocrine qui représente 2% du pancréas a un rôle majeur dans le métabolisme glucidique et lipidique. Elle est constituée d'amas cellulaires de taille variable appelés îlots de Langerhans. Près d'un million d'îlots de Langerhans sont disséminés dans le pancréas mêlés aux constituants exocrines via des ponts de collagène. Chaque îlot est composé de quatre types cellulaires principaux qui assurent la production de différentes hormones ⁽⁴⁷⁾:

- les cellules alpha, sécrètent le glucagon, hormone « hyperglycémiante » qui favorise la glycogénolyse et stimule la néoglucogenèse ;
- les cellules bêta, sécrètent l'insuline, hormone « hypoglycémiante » qui active la glycogénogenèse ;

- les cellules delta, et les cellules F ou pp, sécrètent respectivement la somatostatine et le polypeptide pancréatique.

Les structures des îlots de Langerhans humains et de rongeurs sont différentes (Figure 2) :

- chez les rongeurs, les cellules bêta sont principalement localisées au centre et les autres cellules sont en périphérie, alors qu'elles sont organisées plus aléatoirement chez les humains (48) ;
- le pourcentage de chaque type cellulaire est légèrement différent, mais dans les deux cas, les cellules bêta sont les plus nombreuses (48).

Les îlots de Langerhans sont très richement vascularisés, cela leur permet de capter rapidement les nutriments et de relarguer en retour leurs sécrétions hormonales.

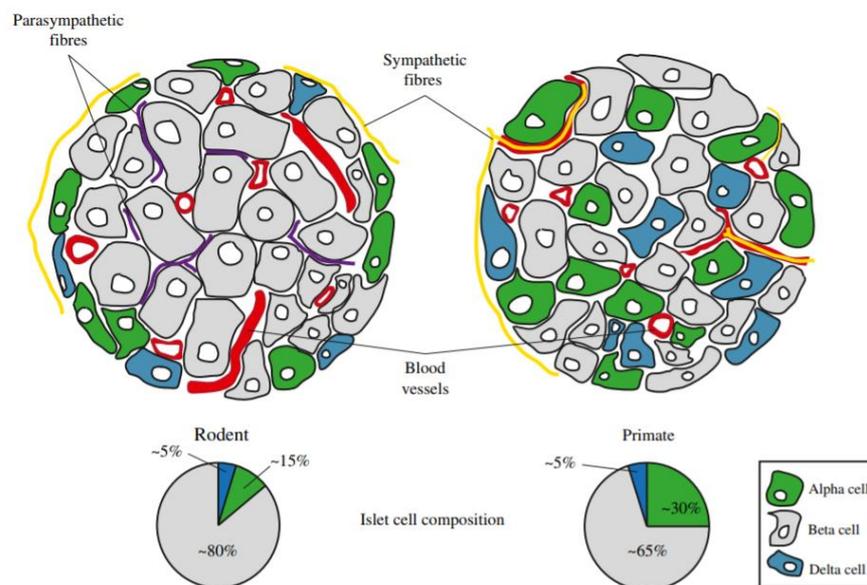


Figure 2. Représentation schématique des structures des îlots de Langerhans humains (à droite) et de rongeurs (à gauche) (48).

2.2 L'insuline

L'insuline est une hormone polypeptidique composée d'une chaîne A et d'une chaîne B reliées entre elles par 3 ponts disulfures (23).

L'insuline dérive de la pré-pro-insuline, codée par le gène situé sur le bras court du chromosome 11. La pré-pro-insuline est synthétisée dans le réticulum endoplasmique rugueux et transformée dans l'appareil de Golgi en pro-insuline, elle-même clivée en insuline et peptide C. La sécrétion d'insuline et de peptide C en quantité équimolaire

et de quelques pro-insulines ayant échappé au clivage enzymatique se fait par exocytose dans la circulation sanguine ⁽⁴⁹⁾.

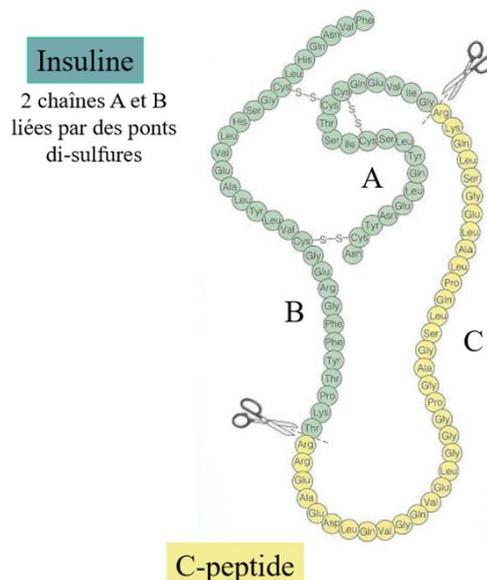


Figure 3. Structure primaire simplifiée de l'insuline et du peptide C ⁽⁵⁰⁾.

2.2.1 Régulation de l'insulino-sécrétion

La régulation physiologique de l'insulino-sécrétion dépend des nutriments et des ions. La sécrétion d'insuline est principalement stimulée par le glucose. Le glucose pénètre dans les cellules bêta via un transporteur de glucose membranaire, GLUT-2. Une fois dans la cellule, le glucose est à l'origine d'une cascade d'évènements intracellulaires qui conduit à la sécrétion d'insuline dans le sang, dont l'un des rôles est de diminuer la glycémie ⁽⁴⁹⁾.

La sécrétion d'insuline est biphasique, elle se fait en deux temps ⁽⁵¹⁾ :

- une libération rapide d'insuline déjà formée et stockée dans les vésicules de sécrétion, dès que la glycémie augmente sensiblement ;
- une libération plus lente si l'hyperglycémie persiste, à l'aide d'insuline néo-synthétisée.

Il existe toutefois d'autres facteurs capables de moduler la sécrétion d'insuline. Les acides aminés (L-leucine), les acides gras, les ions et certaines hormones telles que le GLP-1 (glucagon like peptide-1) et le GIP (glucose-dependent insulintropic polypeptide ou peptide insulino-trope dépendant du glucose) peuvent potentialiser la

sécrétion d'insuline ⁽⁵²⁻⁵⁴⁾. A l'inverse, des hormones inhibitrices telles que la somatostatine ou l'adrénaline diminuent cette sécrétion.

2.2.2 Propriétés physiologiques de l'insuline sur l'organisme

L'insuline a des effets multiples sur l'organisme, elle intervient à la fois sur le métabolisme des glucides, des lipides et des protéides, essentiellement au niveau du foie, du tissu adipeux et du muscle ⁽⁵⁰⁾. Elle exerce un effet anti-catabolique conjoint à une activité anabolique. Les actions générales de l'insuline sont résumées dans la Figure 4.

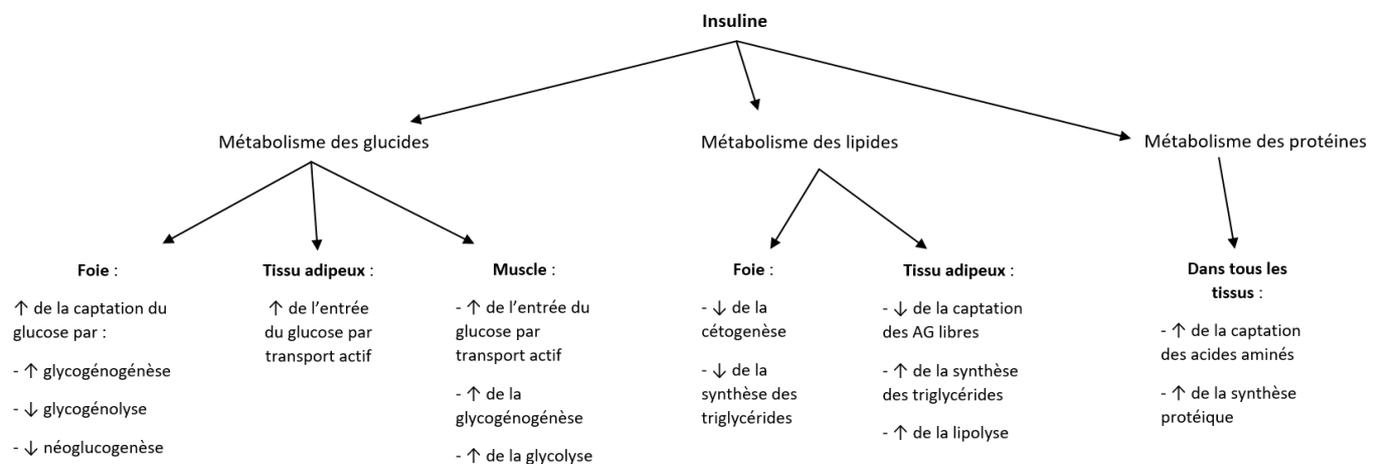


Figure 4. Actions générales de l'insuline sur l'organisme ⁽⁵⁰⁾.

3 Les traitements actuels du diabète de type 1

3.1 Insulinothérapie classique

La destruction des cellules bêta des îlots de Langerhans chez les patients diabétiques de type 1 entraîne à terme une carence en insuline absolue et nécessite l'administration d'insuline exogène pour normaliser leur glycémie. Plusieurs solutions existent actuellement avec pour objectif de mimer autant que possible les fluctuations physiologiques de la sécrétion d'insuline.

L'injection d'insuline par voie sous-cutanée, intramusculaire ou intraveineuse est la stratégie classiquement utilisée en insulinothérapie.

Les insulines injectables disponibles en France sont des insulines recombinantes produites par génie génétique à partir d'insuline humaine.

Quatre différents types d'insulines qui diffèrent par leur durée d'action sont principalement distinguées: les insulines « lentes », « intermédiaires », « rapides » et « ultrarapides ». Les insulines « lentes » permettent de contrôler le niveau basal d'insuline alors que les insulines « rapides » sont utilisées pour un meilleur contrôle glycémique post prandial ⁽⁵⁵⁾.

Les insulines modifiées (analogues d'insulines humaines) ont considérablement amélioré la qualité des traitements au cours de ces dernières années. Les modifications apportées (substitutions de certains acides aminés des molécules d'insuline) permettent de modifier les caractéristiques physico-chimiques et la cinétique d'absorption de l'insuline sans rectifier l'activité hypoglycémiante de la protéine ^(55,56).

L'ajout d'excipients tels que la protamine ou le zinc permet également de moduler le relargage plus ou moins rapide de l'insuline dans le sang ⁽⁵⁶⁾.

Tableau 1. Récapitulatif des différents types d'insuline commercialisés en France (Vidal).

Dénomination	Type d'insuline	Délai d'action	Durée d'action	Exemples
Ultra-rapides	Analogues	15min	3 à 5h	Humalog®
Rapides	Humaines	30min	6 à 8h	Actrapid®
Intermédiaires	Humaines	90min	12 à 18h	Umuline NPH®
Mixte : Rapides + Intermédiaires	Humaines	30min	12 à 20h	Insuman Comb 50, 25 ou 15®
	Analogues	15min	10 à 15h	Humalog MIX®
Lentes	Analogues	90min	24h	Lantus®

Bien que l'insulinothérapie soit à ce jour le principal traitement du diabète de type 1, ce traitement est très contraignant. Il nécessite un contrôle régulier de la glycémie, plusieurs injections quotidiennes d'insuline et l'adaptation des doses d'insuline en fonction de l'alimentation et de l'exercice physique ⁽⁵⁷⁾.

Ce traitement demande beaucoup de rigueur et d'attention : l'une des principales complications de l'insulinothérapie est le risque accru d'hypoglycémie ⁽⁵⁸⁾. Pour lutter

contre ce risque, il est vital d'éduquer le patient à la connaissance, perception des symptômes de l'hypoglycémie et aux traitements à mettre en œuvre.

Une autre complication fréquente de cette thérapeutique est l'apparition d'une lipodystrophie au niveau des sites d'injections. Les lipodystrophies correspondent à des anomalies du tissu adipeux qui peuvent se manifester de deux façons ⁽⁵⁹⁾:

- les lipo-hypertrophies qui correspondent à une prolifération des cellules adipeuses, elles se traduisent généralement par des tuméfactions au niveau des sites d'injections ;
- les lipo-atrophies, perte de graisse qui se manifeste par des creux dans la peau autour des sites d'injections.

Ces dernières sont responsables d'une gêne esthétique et fonctionnelle. Les injections dans les lipo-dystrophies peuvent avoir des conséquences immédiates sur le traitement par une diffusion trop rapide ou trop lente de l'insuline ^(59,60).

Enfin dans certains cas, la voie d'administration elle-même peut être considérée comme un inconvénient. Elle peut constituer une barrière psychologique en particulier chez les individus ayant une phobie des piqûres. Elle nécessite d'éduquer le patient sur la technique d'injection ⁽⁵⁷⁾.

Pour ces raisons, de nouvelles voies d'administration sont en cours de développement, telles que l'insuline par voie orale, transdermique ou pulmonaire ^(61,62). Cependant ces dernières sont confrontées à des problèmes pharmacologiques et pharmacocinétiques. Comme des variabilités dans la dégradation de la capsule enrobant l'insuline au niveau du tube digestif, des variations inter et intra- individuelles, ou encore une faible absorption en cas d'administration orale ou pulmonaire ⁽⁶³⁾.

Si nous nous intéressons de plus près à la voie pulmonaire, Exubera® du laboratoire américain Pfizer est la première insuline inhalée à avoir eu son autorisation de mise sur le marché par la FDA en 2006. Toutefois un an après son lancement, Pfizer a cessé la fabrication d'Exubera suite au manque d'acceptance des patients et des médecins et aux effets indésirables recensés (réduction de la fonction pulmonaire et un risque de cancer et/ou fibrose pulmonaire) ⁽⁶⁴⁾. D'autres sociétés pharmaceutiques ont mis un terme à leurs programmes d'insuline inhalées avant même la fin de leur développement clinique, parmi elles nous pouvons citer Lilly avec AIR Insulin® ou encore Novo Nordisk avec AERx® ⁽⁶⁴⁾.

3.2 Pompes à insuline

Les pompes à insuline sont une alternative au traitement par multi-injections d'insuline. Le dispositif est composé d'un réservoir d'insuline directement relié à un cathéter. Les sites d'implantation possibles du cathéter sont les mêmes que ceux des injections, cependant l'abdomen est préféré, c'est à ce niveau que l'insuline diffuse le plus rapidement. Il convient d'alterner les sites pour éviter les risques de lipo-dystrophie.

La pompe à insuline délivre en continu de petites doses d'insuline rapide (débit basal), adaptées aux besoins de l'utilisateur, avec des doses supplémentaires d'insuline (bolus) si nécessaire, en fonction de ses activités et de ses repas.

Par rapport aux traitements en multi-injections, la pompe permet :

- de diminuer significativement le nombre d'injections (changement de cathéter en moyenne tous les trois jours) ;
- davantage de souplesse et de liberté sur le plan du mode de vie ;
- un meilleur contrôle de la glycémie et une diminution des épisodes hypoglycémiques ⁽⁶⁵⁾.

Cependant un des risques majeurs liés à l'utilisation des pompes à insuline est l'interruption de la délivrance responsable d'une montée très rapide de la glycémie. Elle peut être due à un dysfonctionnement du système électrique ou à un mauvais positionnement du cathéter ⁽⁶⁶⁾. Le traitement nécessite donc une grande participation du patient via une auto-surveillance régulière de la glycémie par des analyses de glycémie capillaire.

De nombreux systèmes de mesure du glucose en continu ont vu le jour ces dernières années, dans le but de limiter les multiples contrôles à effectuer par le patient lui-même. L'utilisation de ces systèmes permet un meilleur contrôle de la glycémie et une diminution de l'Hb1Ac ^(67,68).

Contrairement au glucomètre qui se base sur le glucose sanguin, ces systèmes de mesure du glucose en continu se basent sur le glucose contenu dans le liquide interstitiel. Il s'agit de systèmes totalement automatisés conçus pour prendre une mesure à intervalles réguliers. Les informations sont automatiquement enregistrées, transmises et affichées sur les appareils de lecture ⁽⁶⁹⁾.

Différents dispositifs arrivent progressivement en Europe, nous pouvons citer parmi eux :

- les systèmes de mesure continu du glucose Medtronic[®], Dexcom[®] ou encore Eversense[®] de Roche. Ces systèmes se composent tous les trois d'un capteur, d'un transmetteur et d'un lecteur ⁽⁷⁰⁾. Le capteur mesure la glycémie en continu, ce dernier est connecté à un transmetteur qui est capable d'envoyer automatiquement les données de glycémie à un lecteur ou une application mobile via une connexion Bluetooth ⁽⁷⁰⁾. Le lecteur permet de recevoir à distance le taux de glucose, d'afficher les tendances glycémiques. En revanche, la pompe à insuline ne permet pas une autorégulation, le patient reste programmeur des doses d'insuline à délivrer. Il est également possible de recevoir des alertes (par exemple par sms) lorsque la glycémie est trop haute ou trop basse ⁽⁶⁹⁾.
- En 2014, Medtronic a mis au point la pompe à insuline Minimed 640G couplée à la technologie innovante smartguard. Il s'agit du premier dispositif à permettre l'injection semi-automatique d'insuline. La technologie smartguard peut prédire 30 minutes à l'avance quand la glycémie d'un patient est estimée atteindre sa limite basse et suspendre automatiquement l'injection d'insuline afin de limiter les hypoglycémies. Quand le taux de glucose remonte, smartguard reprend alors automatiquement l'injection basale d'insuline. Ce dispositif constitue une belle avancée vers le pancréas artificiel.
- Le FreeStyle Libre proposé par le laboratoire Abbott, est un système qui se compose d'un capteur rond (de la taille d'une pièce de deux euros environ) qui se pose derrière le haut du bras. Pour obtenir la mesure de la glycémie, il suffit alors de passer le lecteur FreeStyle Libre ou un smartphone doté de l'application LibreLink au-dessus de ce capteur. La transmission des informations peut se faire à travers les vêtements. Lors du scanne du capteur il est possible d'obtenir à la fois le taux de glucose actuel, la tendance du profil glycémique (à la hausse ou à la baisse) mais également l'historique des 8 dernières heures ^(70,71).

Cependant peu de patients bénéficient à ce jour de ces nouveaux appareils, qui pour la plupart ne sont pas encore remboursés par l'assurance maladie ⁽⁷²⁾.

3.3 Transplantation de pancréas

Chez les patients pour lesquels malgré un traitement insulinique optimal des difficultés de stabilisation du métabolisme glucidique sont observées, une greffe de pancréas peut être envisagée. La transplantation pancréatique a également souvent lieu simultanément avec une greffe de rein chez les patients en insuffisance rénale sévère liée au diabète ou à d'autres origines ⁽⁷³⁾.

Deux approches ont été développées : *la greffe de pancréas entier* et *la greffe segmentaire* (corps et queue du pancréas) principalement dans le cadre de donneur vivant ⁽⁷³⁾.

Grace aux progrès constants des techniques chirurgicales et à la mise en place de nouvelles stratégies immunosuppressives, les résultats fonctionnels de la transplantation de pancréas se sont progressivement améliorés au cours de ces dernières années. Ainsi depuis 1966, année de la première greffe pancréatique réalisée chez l'homme, plus de 48 000 greffes de pancréas ont été enregistrées dans le registre international de la greffe de pancréas (International Pancreas Transplant Registry, IPTR) ⁽⁷⁴⁾.

Malgré l'évolution de cette technique plusieurs limites persistent dont le problème de disponibilité des greffons, la lourdeur de l'intervention chirurgicale ou encore la nécessité d'un traitement immunosuppresseur à vie.

Le traitement immunosuppresseur a pour but de prévenir les épisodes de rejets responsables d'une destruction plus ou moins rapide de l'organe transplanté. Le rejet correspond à l'induction d'une réponse immunitaire du receveur contre l'organe transplanté. Ce phénomène de rejet met en jeu une réaction positive des cellules du receveur (notamment les lymphocytes T et B) activées par les allo-antigènes du donneur qui appartiennent principalement au groupe HLA.

Bien que des améliorations aient été apportées aux protocoles d'immunosuppression ⁽⁷⁵⁾, les immunosuppresseurs présentent des effets indésirables potentiellement graves (affaiblissement général du système immunitaire, infections à répétition, néphrotoxicité, tumeur,...). Le traitement immunosuppresseur doit être suivi tout au long de la vie et ajusté au mieux pour conserver l'organe, mais aussi pour ne pas mettre en danger le patient immunodéprimé.

Un autre obstacle majeur de la greffe de pancréas est la sécrétion exocrine. Le pancréas est une glande mixte, dont uniquement la partie endocrine est

fonctionnellement nécessaire pour la glycorégulation. La partie exocrine hautement immunogène et riche en enzymes protéolytiques est responsable de morbidité et de mortalité chez le receveur ⁽⁷³⁾.

Devant les multiples complications liées à la transplantation pancréatique, de nombreux chercheurs se sont intéressés à de nouvelles voies d'étude dont la greffe uniquement de la partie endocrine du pancréas : les îlots de Langerhans.

3.4 Greffe d'îlots de Langerhans

La greffe d'îlots de Langerhans est actuellement une alternative thérapeutique chez les diabétiques de type 1, greffés du rein, contre-indiqués à la transplantation de pancréas du fait de leur atteinte macrovasculaire sévère. Elle peut être également proposée aux diabétiques de type 1 dont la fonction rénale est conservée mais dont le contrôle de la glycémie est difficile et l'équilibre instable malgré un traitement insulinique optimisé. Il s'agit en particulier de patients présentant des hypoglycémies sévères, fréquentes, soumettant le patient à un risque vital.

Depuis 1974, année de la première transplantation autogène d'îlots de Langerhans réalisée chez l'homme, les techniques et innovations dans le domaine de la greffe d'îlots pancréatiques n'ont cessé d'évoluer. Pour la première fois en 2000, des chercheurs canadiens d'Edmonton ont mis en avant l'obtention d'un contrôle glycémique stable en l'absence d'injection d'insuline exogène chez des patients diabétiques de type 1 ayant subi une greffe d'îlots de Langerhans ⁽⁷⁶⁾. Le protocole d'Edmonton établit de nouvelles normes. Il vise à agir à plusieurs niveaux du processus de la greffe d'îlots de Langerhans, notamment l'amélioration de la procédure d'isolement, l'augmentation de la qualité et du nombre d'îlots à transplanter ainsi que la modification du protocole d'immunosuppression ⁽⁷⁷⁾. Depuis, de nombreux groupes de chercheurs ont réalisé des greffes d'îlots de Langerhans afin de reproduire ces résultats.

3.4.1 Techniques de la greffe d'îlots de Langerhans

La greffe d'îlots de Langerhans comprend plusieurs étapes :

3.4.1.1 Sélection des donneurs

Les critères de sélection du donneur doivent permettre de maximiser le succès de la greffe et minimiser les risques de morbidité pour les receveurs. Les critères

d'acceptation incluent principalement l'âge, l'index de masse corporelle, la durée d'hospitalisation et certains autres facteurs de risques (alcoolisme, arrêt cardiaque, antécédents de diabète ou d'hyperglycémie) ⁽⁷⁸⁾.

De plus, la greffe nécessite que le donneur et le receveur soient ABO compatibles. Un cross-match lymphocytaire est également réalisé. Le cross match est une étude de compatibilité réalisée systématiquement pour prévenir le phénomène de rejet de greffe. Il permet de mettre en évidence la présence ou l'absence d'anticorps anti HLA dirigés contre les antigènes du greffon dans le sérum du receveur. Le cross-match lymphocytaire doit être négatif (absence d'anticorps anti HLA dans le sérum du receveur).

3.4.1.2 Prélèvement pancréatique

Les pancréas sont obtenus dans le cadre de prélèvement multi-organes chez des sujets en état de mort cérébrale. La qualité du prélèvement conditionne les étapes ultérieures d'isolement et de purification des îlots de Langerhans. Plusieurs aspects sont à prendre en compte notamment l'expertise de l'équipe chirurgicale, les techniques mises en œuvre pour la préservation du pancréas et la durée d'ischémie froide ⁽⁷⁹⁾.

3.4.1.3 Extraction et isolement des îlots de Langerhans

L'isolement des îlots de Langerhans consiste à séparer le tissu exocrine du tissu endocrine et à en récupérer les îlots de Langerhans tout en préservant leurs fonctions et leur intégrité. La mise au point d'une technique semi-automatique d'isolement développée par Ricordi en 1989 a permis une avancée majeure dans ce domaine ⁽⁸⁰⁾. Bien que les protocoles d'isolement aient été améliorés par la suite grâce à l'expérience acquise par les différents centres de transplantation, le principe reste le même. Il repose sur *une digestion enzymatique du pancréas* ^(81,82) : une solution enzymatique (libérase) est perfusée à travers le canal pancréatique de Wirsung dans l'ensemble du tissu pancréatique afin de rompre les ponts collagènes qui unissent le tissu exocrine au tissu endocrine. Le pancréas est ensuite découpé en plusieurs morceaux avant d'être introduit dans une chambre de digestion appelée chambre de Ricordi contenant des billes en silicone et remplie d'une solution enzymatique à base de collagénase chauffée à 37°C sous agitation mécanique. La digestion du pancréas

est alors suivie très régulièrement. Des échantillons sont prélevés et l'arrêt de cette digestion est effectué lorsque les îlots sont libérés, avant que ceux-ci ne soient abîmés par une digestion trop longue. L'arrêt du processus de digestion se fait par dilution de la collagénase et par diminution de la température à 4°C.

Une des difficultés actuelles de l'isolement est le défaut de reproductibilité de la technique. De par la complexité de la procédure d'isolement, du coût du matériel et de l'importance de l'expérience acquise, de nombreux cents se réunissent et forment des collaborations. Le Groupement Rhin-Rhône-Alpes-Genève pour la transplantation d'Îlots de Langerhans (GRAGIL) qui regroupe plusieurs Centres Hospitaliers Universitaires (CHU) français autour des laboratoires d'isolement de Genève et de Grenoble a été pionnier dans ce domaine. Il est un des premiers réseaux multicentriques à avoir démontré la faisabilité et l'efficacité de la greffe d'îlots de Langerhans avec ce mode de fonctionnement ⁽⁸³⁾. Depuis d'autres laboratoires d'isolement ont vu le jour en France notamment à Lille, Paris et Montpellier. Ce travail en réseau permet ainsi d'optimiser les procédures de prélèvement, de transport mais aussi de greffe des îlots de Langerhans.

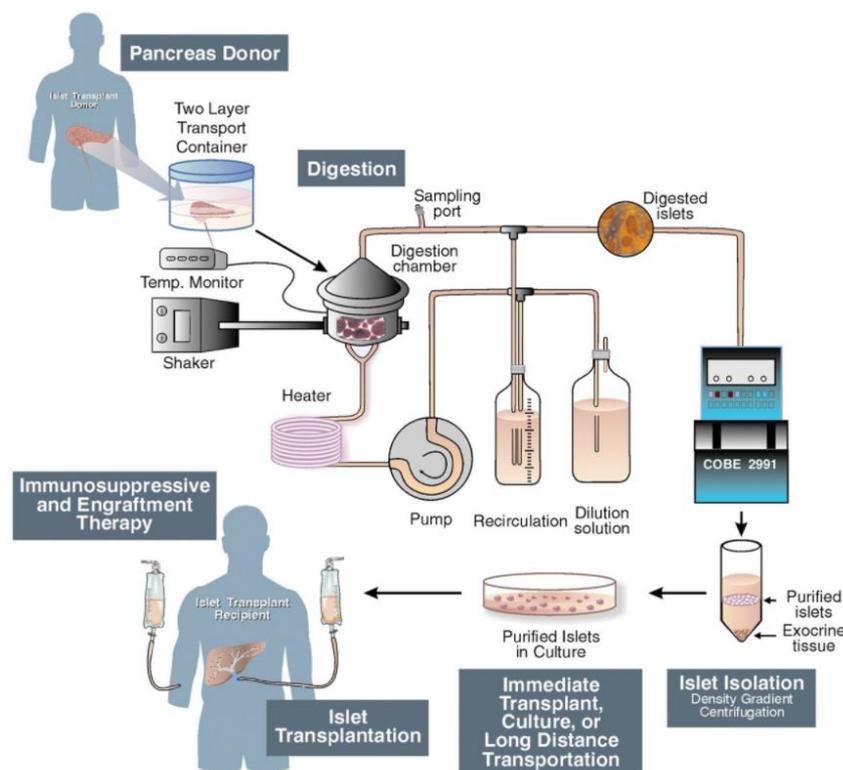


Figure 5. Représentation schématique des étapes successives de la greffe des îlots de Langerhans ⁽⁸²⁾.

3.4.1.4 Purification

Après la digestion pancréatique, les îlots de Langerhans sont ensuite purifiés afin d'éliminer les acini exocrines qui n'auraient pas été séparés. Les parties exocrine et endocrine sont séparées via leurs densités. Les îlots de Langerhans ont une densité plus faible que le tissu exocrine. La purification est réalisée classiquement par centrifugation en gradient de densité dans un séparateur de cellule COBE 2991, le plus souvent à l'aide d'une solution Ficoll. La transplantation d'une préparation d'îlots de Langerhans hautement purifiés confère plusieurs avantages ⁽⁷⁸⁾:

- une réduction du volume de tissu transplanté : l'ensemble de la préparation d'îlots de Langerhans représente un volume total de 10 mL maximum ;
- une amélioration de la tolérance immunologique de la greffe ;
- un renforcement de la sécurité du receveur.

Au terme de l'isolement, différents tests quantitatifs et qualitatifs sont réalisés sur les îlots de Langerhans tels que ^(82,84) :

- la pureté ;
- la détermination du nombre d'îlots de Langerhans équivalents (IEQ : un IEQ correspond à un îlot de Langerhans d'un diamètre de 150 µm ou plus), il faut environ 10 000 IEQ/kg de receveur ;
- la viabilité basée sur l'intégrité de la membrane cellulaire ;
- la fonctionnalité des îlots après stimulation *in vitro* par du glucose ;
- la stérilité à travers différents tests microbiologiques.

Les critères retenus pour autoriser la libération d'une préparation d'îlots de Langerhans varie en fonction des protocoles.

A la suite de ces tests, les îlots de Langerhans peuvent être directement injectés ou cultivés dans l'attente de la greffe.

3.4.1.5 Transplantation des îlots de Langerhans

Une fois les îlots de Langerhans isolés et purifiés, l'étape finale consiste à les transplanter au niveau d'un site adéquat chez le receveur. Aujourd'hui, le site de transplantation privilégié est le foie, ou plus précisément le système porte ^(73,85). De nombreux avantages sont associés au choix du foie notamment un accès facile et sûr qui permet la transplantation des îlots de Langerhans au moyen d'une procédure peu

invasive. L'infusion des îlots de Langerhans se fait par cathétérisation de la veine porte. Deux approches sont possibles pour accéder à la veine porte:

- une approche chirurgicale, par voie transmésentérique, vers la veine porte, après une incision de l'abdomen ⁽⁸⁵⁾ ;
- une approche radiologique, au moyen d'un cathétérisme transhépatique dans une branche de la veine porte sous contrôle échographique et sous anesthésie locale ⁽⁸⁵⁾.

La suspension d'îlots de Langerhans est diluée dans du sérum physiologique avant d'être conditionnée dans une poche à transfusion. La suspension est ensuite lentement infusée dans le foie sous surveillance de la pression intraportale. Les îlots de Langerhans s'implantent alors par embolisation dans les veines terminales tributaires du système porte.

L'infusion est généralement bien tolérée, avec une morbidité moindre. Néanmoins le site de transplantation reste matière à débat et est sujet de nombreuses recherches. En effet, très souvent l'infusion des îlots de Langerhans dans le réseau porte est suivie d'une réponse inflammatoire précoce pouvant être responsable d'une perte importante d'îlots de Langerhans. D'autres complications peuvent être associées à cette procédure tels qu' ⁽⁸⁶⁾:

- un risque de thrombose portale qui peut être traité par anticoagulant ;
- un risque hémorragique ;
- une augmentation transitoire de la pression portale.

Ainsi, d'autres sites d'implantation sont en essais bien qu'aucun des sites proposés jusqu'à aujourd'hui ne soit idéal ⁽⁸⁵⁾.

3.4.2 Données cliniques

Les résultats de la greffe d'îlots de Langerhans varient considérablement en fonction des équipes et en fonction du but de la greffe. En effet certaines équipes recommandent la thérapie cellulaire non pas pour rechercher l'insulino-indépendance mais simplement afin d'obtenir une normalisation du contrôle glycémique et une disparition des hypoglycémies ⁽⁸⁷⁾. C'est le cas notamment des patients diabétiques greffés du rein où la greffe d'îlots de Langerhans est principalement proposée pour améliorer le contrôle glycémique en vue de la protection métabolique du greffon rénal.

Les données les plus récentes sont rapportées par le Collaborative Islet Transplant Registry (CITR). Ce registre international regroupe les informations de patients greffés d'îlots de Langerhans en Amérique du Nord, en Europe, en Australie et en Asie. De 1999 à 2015, 1086 patients greffés ont été répertoriés dans ce registre. 877 greffes d'îlots de Langerhans seuls et 209 greffes d'îlots de Langerhans après ou simultanément à une greffe rénale. 2150 infusions ont été préparées à partir de 2619 donneurs ⁽⁸⁸⁾.

Tableau 2. Tableau récapitulatif du nombre de donneurs, infusions et receveurs de 1999 à 2015 ⁽⁸⁸⁾.

	Greffe îlots de Langerhans seuls			Greffe îlots de Langerhans après ou simultanément à une greffe rénale			TOTALS
	Total	Amérique du Nord	Europe/Australie/Asie	Total	Amérique du Nord	Europe/Australie/Asie	
Receveurs	877	504	373	209	82	127	1,086
Infusions	1,762	1,002	760	388	144	244	2,150
Donneurs	2,190	1,061	1,129	429	153	276	2,619

Dans le 10^{ème} rapport du CITR de janvier 2017, le registre international met en évidence une insulino-indépendance à 1 an dans environ 50% des cas, aussi bien chez les patients diabétiques ayant subi une greffe d'îlots de Langerhans seuls qu'après ou simultanément à une greffe rénale.

Certains facteurs sont associés à un meilleur taux d'insulino-indépendance : avoir un âge supérieur à 35 ans ou avoir reçu un plus grand nombre d'îlots de Langerhans transplantés ⁽⁸⁸⁾. En présence de ces facteurs, l'insulino-indépendance à 1 an peut être atteinte chez environ 75% des patients. Malgré la perte progressive d'insulino-indépendance dans le temps, la production de C-peptide est maintenue et reste supérieure ou égale à 0,3 ng/mL dans environ 65% des cas à 5 ans post greffe ⁽⁸⁸⁾.

Une HbA1c inférieure à 7% et l'absence d'événements hypoglycémique sévère sont également observées dans environ 70% des cas à 5 ans post greffe ⁽⁸⁸⁾.

Récemment une équipe lilloise a obtenu d'excellents résultats sur le long terme, 97% des patients ont pu atteindre l'insulino-indépendance.

L'étude observationnelle prospective menée par le professeur Marie-Christine Vantyghem a combiné l'analyse de 33 patients ayant bénéficié depuis 2003 d'une

allogreffe d'îlots de Langerhans seule ou après une greffe rénale, associée au protocole d'immunosuppression d'Edmonton. La survie du greffon pour l'ensemble des patients greffés était à 5 et 10 ans de 85 et 76% et le taux d'insulino-indépendance de 48 à 26%, respectivement ⁽⁸⁹⁾.

Les résultats de cette étude démontrent également l'influence primordiale de la fonction primaire du greffon sur les résultats au long cours évalué par le bêta score (fonction des cellules bêta après transplantation : de 0 à 8). La survie du greffon chez les patients avec une fonction primaire du greffon optimale (bêta score ≥ 7) versus les patients pour lesquels la fonction primaire du greffon était sub-optimale (bêta score < 7) était respectivement à 5 ans de 100% versus 64% et à 10 ans de 93% versus 53%. Le taux d'insulino-indépendance était respectivement à 5 ans de 66% versus 18% et à 10 ans de 42% versus 0% ⁽⁸⁹⁾.

3.4.3 Situation de la greffe d'îlots de Langerhans en France

En France et dans la plupart des pays, la greffe d'îlots de Langerhans est réalisée dans le cadre de protocoles cliniques. Afin de pouvoir étendre la greffe d'îlots de Langerhans à un plus grand nombre de patients et le plus précocement possible, les pouvoirs publics Français ont sollicité une étude nationale médico-économique: TRIMECO ou « Essai contrôlé randomisé comparant l'efficacité métabolique de la transplantation d'îlots de Langerhans allogéniques à l'insulinothérapie intensive pour le traitement du diabète de type 1 »^(90,91).

Il s'agit d'un essai thérapeutique de phase III en groupes parallèles, prospectif, multicentrique, contrôlé, randomisé, ouvert, réalisé par deux équipes Françaises, le réseau GRAGIL et le réseau G4 (Amiens, Caen, Lille, Rouen), dont l'investigateur principal est le Professeur Pierre-Yves Benhamou, chef du service d'endocrinologie diabétologie nutrition à Grenoble.

L'objectif principal a été d'évaluer l'efficacité métabolique de la greffe d'îlots de Langerhans à 6 mois comparativement au traitement insulinique intensif ainsi que son impact médico-économique.

De 2010 à 2013, 50 patients ont été sélectionnés à travers toute la France et répartis en deux groupes. Les patients du premier groupe ont subi une greffe d'îlots de Langerhans immédiatement après leur inclusion dans l'étude. Les patients du second groupe ont poursuivi les injections d'insuline pendant six mois avant d'être greffés.

Les six mois d'intervalle qui ont séparé les deux groupes de patient ont ainsi servi de contrôle.

Le critère de jugement principal était le béta score intégrant 4 indicateurs :

- l'HbA1c, reflet de l'équilibre glycémique sur trois mois ;
- le peptide C, marqueur de la sécrétion d'insuline ;
- la dose d'insuline ou la prise d'antidiabétiques oraux ;
- la glycémie à jeun.

Les patients ont été suivis jusqu'en 2017, les données préliminaires de cette étude sont encourageantes. En effet, la greffe d'îlots de Langerhans apparaît être une technique efficace offrant un bénéfice métabolique considérable quant à l'amélioration de l'HbA1c et à la réduction des hypoglycémies sévères comparativement au traitement insulinaire intensif ^(90,91).

La seconde étape de ce processus est l'étude médico-économique STABILOT ou « Impact médico-économique de la stabilisation des formes sévères de diabète de type 1 par transplantation d'îlots pancréatiques » ⁽⁹²⁾.

Il s'agit d'une étude de phase III, en groupes parallèles, prospective, multicentrique, contrôlée, randomisée impliquant des patients de tous les centres français pratiquant des greffes d'îlots de Langerhans (Grenoble, Besançon, Clermont-Ferrand, Lille, Lyon, Nantes, Nancy, Montpellier, Paris et Strasbourg). L'objectif principal de cet essai qui a démarré en Juin 2016 est de fournir à la HAS des données médico-économiques comparatives. Cet essai prévoit d'inclure 30 patients diabétiques de type 1 instables et durera 4 ans ⁽⁹²⁾.

A l'horizon 2020, cette démarche devrait ainsi permettre de sortir la greffe d'îlots de Langerhans du domaine de la recherche clinique et de la considérer comme un traitement à part entière du diabète de type 1.

3.4.4 Qualité de vie du patient greffé

Une greffe fonctionnelle d'îlots de Langerhans permet un meilleur contrôle glycémique. Quelques études suggèrent un effet protecteur de la greffe d'îlots de Langerhans envers les complications dégénératives du diabète ^(93,94). Au cours de ces dernières années, des résultats encourageants ont été obtenus. Ces résultats démontrent l'importance de restaurer les cellules béta et leur fonction chez les patients diabétiques. La greffe d'îlots de Langerhans permet potentiellement ⁽⁹³⁾:

- de stabiliser, voire de réduire les complications macro et micro angiopathiques;
- de stabiliser la rétinopathie et la neuropathie diabétiques ;
- d'augmenter significativement la longévité du greffon rénal ;
- de diminuer le nombre de décès d'origine cardiovasculaire.

La greffe d'îlots de Langerhans de par la restauration d'une stabilité glycémique avec disparition des hypoglycémies améliore significativement la qualité de vie des patients diabétiques même chez les patients pour lesquels il est nécessaire de reprendre un traitement insulinique à faible dose. Cette amélioration porte principalement sur une meilleure satisfaction de l'état de santé global et une diminution du retentissement du diabète dans la vie de tous les jours ⁽⁹⁵⁾.

3.4.5 Limites de la greffe d'îlots de Langerhans

La greffe d'îlots de Langerhans permet de restaurer une sécrétion d'insuline endogène et de stabiliser la glycémie chez les patients atteints de diabète de type 1 durant une période pouvant aller de quelques mois à plusieurs années. Cependant, cette technique connaît quelques limites qui pourraient freiner son application à plus grande échelle. Parmi celles-ci, nous pouvons citer :

3.4.5.1 La source de recueil d'îlots de Langerhans

La greffe d'îlots de Langerhans se heurte actuellement au nombre limité de pancréas humains disponibles. Cette difficulté est accentuée par le fait que le nombre d'îlots de Langerhans isolés à partir d'un donneur n'est pas toujours suffisant pour corriger totalement le diabète d'un receveur. Par conséquent, certains receveurs doivent recevoir des îlots de Langerhans issus de plusieurs donneurs ^(77,85).

Même si l'amélioration des techniques d'isolement et de purification des pancréas humains permet aujourd'hui l'obtention de meilleurs rendements, le nombre de pancréas humains disponibles constitue une limitation importante dans l'extension des indications de la greffe d'îlots de Langerhans.

Plusieurs sources alternatives de tissus insulino-sécréteurs font actuellement l'objet d'étude : l'utilisation d'îlots d'origine animale (la xénotransplantation) ⁽⁷⁷⁾, de cellules insulino-sécrétrices dérivées de cellules souches ⁽⁹⁶⁾, ou encore l'utilisation de cellules souches mésenchymateuses autologues permettant de reconstituer les cellules bêta ⁽⁹⁷⁾.

3.4.5.2 L'immunosuppression

Une des principales problématiques liées à cette technique est la nécessité d'une thérapie immunosuppressive à vie chez le receveur afin de prévenir un éventuel rejet des cellules greffées. L'immunosuppression doit en effet répondre à un impératif : comporter la morbidité la plus faible possible. Malgré la mise en place du protocole d'Edmonton dans les années 2000 qui consiste en une induction par des anticorps anti-récepteur de l'IL-2, une association de tacrolimus et sirolimus et l'absence de stéroïdes, les complications à long terme subsistent ^(85,98).

Ainsi, l'immunoprotection des îlots de Langerhans par un procédé d'encapsulation apparaît alors comme un moyen de prévenir le rejet sans préjudice pour la santé des patients tout en assurant la fonctionnalité du greffon à long terme. Cette approche vise à protéger les îlots de Langerhans du système immunitaire de l'hôte par l'intermédiaire d'une membrane semi-perméable : le pancréas bioartificiel ⁽⁹⁹⁾.

II. Microencapsulation d'îlots de Langerhans

La microencapsulation des cellules bêta dans des capsules d'alginate a été introduite dans les années 1980 par les savants Lim et Sun. Il s'agit d'une approche qui vise à assurer l'immunoprotection des cellules transplantées contre la réponse immunitaire de l'hôte.

Les cellules, ici, les îlots de Langerhans sont immobilisés à l'intérieur d'une membrane semi-perméable et biocompatible. Cette membrane physique bloque le passage aux composés de hauts poids moléculaires (cellules immunitaires, anticorps) tout en assurant la libre diffusion du glucose, de l'insuline, de l'oxygène et des nutriments nécessaires à la survie des îlots de Langerhans.

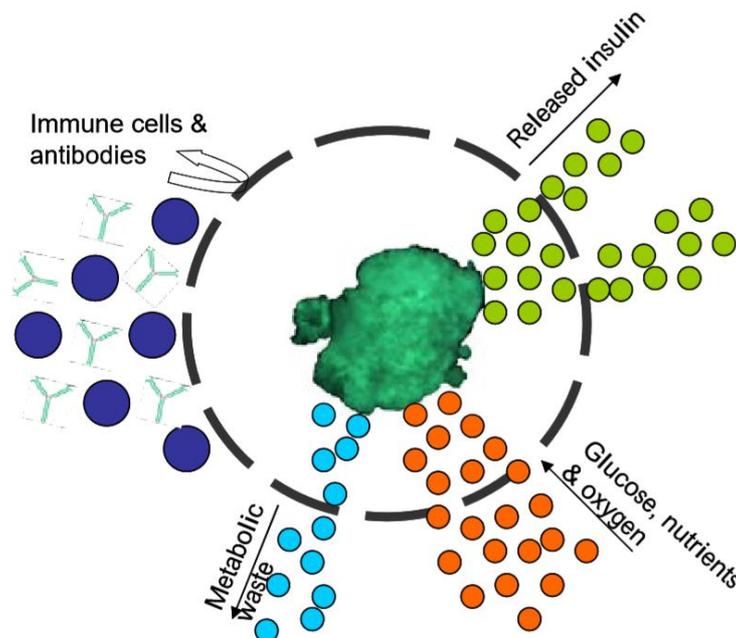


Figure 6. Principe de l'immuno-isolation des îlots de Langerhans ⁽⁹⁹⁾.

La microencapsulation des îlots de Langerhans est un système complexe puisque les capsules contiennent des cellules vivantes devant exercer une fonction sur le long terme. Le choix des matériaux, les méthodes de production de ces dispositifs ainsi que de nombreuses caractéristiques physico-chimiques des capsules doivent répondre à des conditions spécifiques.

1 Propriétés requises des microcapsules destinées à la transplantation d'îlots de Langerhans

1.1 Perméabilité sélective

La perméabilité sélective de la membrane enveloppant les îlots de Langerhans est une propriété essentielle des microcapsules. Elle est étroitement liée à la taille des pores de la membrane.

- Afin d'assurer une protection des îlots de Langerhans contre le système immunitaire de l'hôte, les pores doivent avoir une taille inférieure à celle des cellules immunitaires, des anticorps et des cytokines ⁽⁹⁹⁾.
- D'autre part, pour pouvoir garantir la viabilité et la fonctionnalité des îlots de Langerhans, les pores doivent avoir une taille supérieure à celle des nutriments, de l'oxygène, du produit thérapeutique et des métabolites ⁽⁹⁹⁾.

La porosité des microcapsules peut être déterminée en mesurant la vitesse de perméation de molécules de poids moléculaires connus (protéines, dextrans) vers l'intérieur des microcapsules ou inversement vers le surnageant ^(100,101). Cependant ces mesures ne sont qu'indicatives de la situation *in vivo*. En effet, la capacité d'une molécule à diffuser au travers d'une membrane dépend non seulement de son poids moléculaire, mais aussi de sa charge, de sa conformation tridimensionnelle, ou encore de sa concentration de chaque côté de la membrane. *In vivo*, la perméabilité des microcapsules est également probablement modifiée par les phénomènes de gonflement osmotique et par le développement de fibroses péricapsulaires (définition détaillée dans la section II.1.2.2 de la thèse). Tous ces facteurs font qu'il est difficile de pouvoir déterminer avec précision un seuil de perméabilité garantissant une immunoprotection des îlots de Langerhans.

Malgré la membrane immunoprotectrice, la protection contre les cellules du système immunitaire n'est pas absolue. Les îlots de Langerhans restent vulnérables aux petites molécules telles que les cytokines ou l'oxyde nitrique NO dont le poids moléculaire est relativement proche de celui de l'insuline et des nutriments essentiels (5 - 15 kDa). Ainsi, au cours de ces dernières années, plusieurs stratégies ont été étudiées afin d'optimiser l'immunoprotection des îlots de Langerhans :

- Une étude *in vitro* a démontré qu'il était possible de minimiser le passage des cytokines en modifiant la perméabilité membranaire par augmentation du temps

d'incubation avec la poly-L-lysine (PLL) sans interférer sur la diffusion de l'insuline ^(102,103).

- En 2001, une autre étude a mis en évidence un avantage potentiel de la xénotransplantation d'îlots de Langerhans encapsulés contre les effets délétères des cytokines. L'équipe de Piro a démontré une susceptibilité moindre des îlots de Langerhans bovins face aux cytokines humaines, avec une viabilité et une fonctionnalité accrues par rapport à celles des îlots de Langerhans humains. L'hypothèse selon laquelle une plus faible interaction des cytokines humaines avec les récepteurs cellulaires xénogéniques serait à l'origine de cette résistance accrue ⁽¹⁰⁴⁾.
- Une étude plus récente a montré que l'incorporation d'hémoglobine (d'origine humaine) au niveau de la membrane d'encapsulation permettait de diminuer la nécrose et l'apoptose des cellules causées par l'oxyde nitrique produit par l'activation des macrophages. En effet, l'hémoglobine est facilement oxydée par des agents physiologiques endogènes tels que l'oxyde nitrique NO. L'oxydation de l'hémoglobine conduit à la formation de la méthémoglobine et permet de détoxifier les îlots de Langerhans de l'oxyde nitrique NO ⁽¹⁰⁵⁾.

1.2 Biocompatibilité

1.2.1 Biocompatibilité vis-à-vis des cellules encapsulées

Dès lors que les cellules sont encapsulées au sein de la microcapsule, des interactions s'établissent entre ces dernières et les constituants de la matrice. Ces interactions ne doivent pas nuire au fonctionnement et à la viabilité des cellules encapsulées.

Des études expérimentales ont permis de mettre en évidence que le choix de la nature du cœur de la capsule (cœur liquide ou solide) influe sur le fonctionnement, la viabilité et la prolifération des cellules encapsulées ^(106,107) :

- un cœur liquide permet une meilleure diffusion de l'oxygène et des nutriments, cela contribue à améliorer la croissance, la viabilité et la prolifération cellulaire ;
- un cœur solide offre une stabilité mécanique plus importante.

Dans le cas particulier des îlots de Langerhans, au cours de ces dernières années, différentes études ont été menées afin de mesurer l'impact de l'encapsulation sur la viabilité des îlots de Langerhans.

Pendant longtemps, certaines études ont suggéré un effet néfaste de la microencapsulation sur l'efficacité des îlots de Langerhans. Plusieurs explications ont été proposées pour justifier ce fait ⁽¹⁰⁸⁾:

- les techniques de microencapsulation elles-mêmes qui peuvent altérer les îlots de Langerhans ;
- le fait que contrairement aux îlots libres, l'isolation des îlots de Langerhans au sein de la capsule empêche leur revascularisation et conduit à la mort cellulaire.

A l'inverse, dans une étude plus récente, il a été démontré *in vitro* et *in vivo* que contrairement aux îlots de Langerhans libres, l'immobilisation et la microencapsulation de ces derniers permettaient d'améliorer leur survie et leur fonctionnement ⁽¹⁰⁹⁾. Outre le rôle immunoprotecteur de la membrane, la meilleure viabilité des îlots de Langerhans encapsulés peut être expliquée par la configuration des microcapsules reproduisant en quelque sorte la matrice extracellulaire naturelle et créant ainsi un microenvironnement positif au développement des îlots de Langerhans.

1.2.2 Biocompatibilité vis-à-vis de l'hôte :

La biocompatibilité des microcapsules chez l'hôte constitue un élément essentiel pour maintenir la viabilité et la fonctionnalité du transplant. L'optimisation de la biocompatibilité des microcapsules immunoprotectrices comporte plusieurs exigences :

- *Minimiser, voire éliminer le développement d'une couche fibreuse autour de la microcapsule*

Le développement d'une couche fibreuse est un phénomène physiologique stimulé par la reconnaissance d'un corps étranger par l'organisme. La fibrose péricapsulaire résulte de l'adhésion et de l'agrégation de cellules (macrophages, fibroblastes) à la surface de la membrane de la microcapsule, considérée comme un corps étranger.

La fibrose est problématique puisqu'à terme elle obstrue les pores de la membrane et empêche la diffusion des nutriments, des métabolites et de l'oxygène à travers cette membrane. Par conséquent elle interfère avec le fonctionnement et la viabilité des cellules encapsulées ⁽¹¹⁰⁾.

- *Minimiser l'inflammation aigüe associée à la chirurgie d'implantation*

Même si la procédure d'implantation des îlots de Langerhans dans la cavité du péritoine est une chirurgie mineure, elle est associée à des dommages tissulaires et

au relargage de protéines bioactives tels que le fibrinogène, la thrombine ou encore l’histamine. Ces protéines exercent un effet chimiotactique sur les cellules inflammatoires et contribuent à la mobilisation de mastocytes et de macrophages au niveau du site d’implantation des microcapsules ⁽¹⁰²⁾. Ces cellules immunitaires produisent des facteurs bioactifs tels que : l’interleukine 1 bêta (IL-1 β), le facteur de nécrose tumorale (TNF- α) ou encore des facteurs de croissance (TGF- β). Ces cytokines de petites tailles ont la capacité de passer au travers des pores de la membrane et de stimuler la production de cytokines (IL-1 β , IL-1 α , IL-6, ...) par les îlots de Langerhans ⁽¹⁰²⁾.

Les cytokines émanant des îlots de Langerhans agissent de concert avec les cytokines produites par les cellules immunitaires activées suite à l’acte chirurgical. Ces actions contribuent au recrutement et à l’activation de cellules inflammatoires à proximité du lieu de la transplantation et sont responsables de la perte d’une partie des îlots de Langerhans dans la période post-transplantation immédiate.

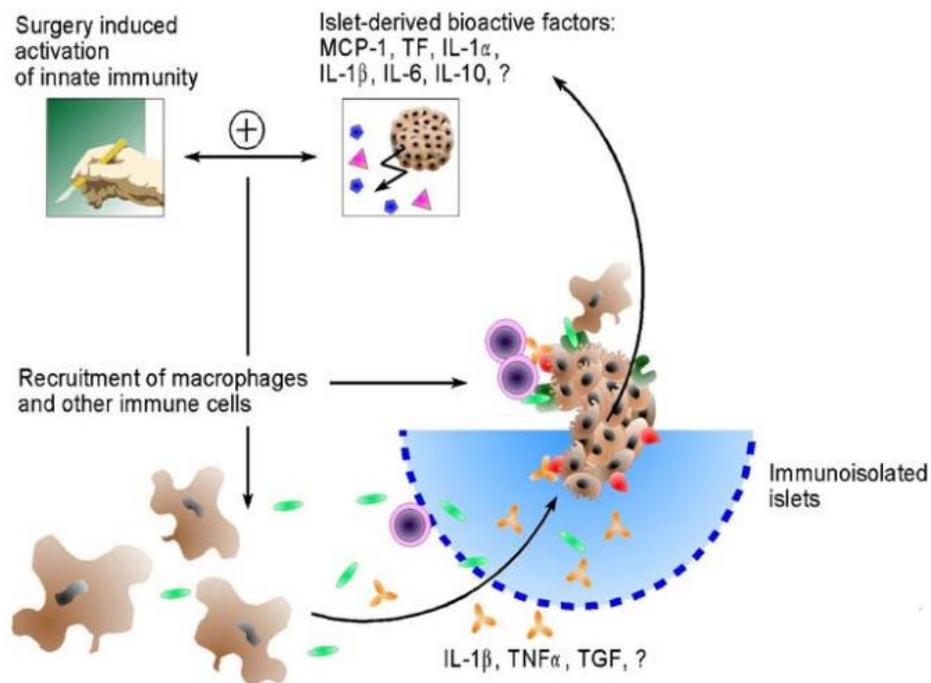


Figure 7. Activation de la réponse immunitaire suite à la chirurgie d’implantation des îlots de Langerhans ⁽¹⁰²⁾.

L'inconvénient de cette réaction inflammatoire est qu'elle est directement induite par l'acte chirurgical. Par conséquent, il est probablement impossible de l'éliminer complètement, cependant des mesures peuvent être prises pour la minimiser, telles que l'incorporation dans les microcapsules d'agents anti-inflammatoires comme le kétoprofène ⁽¹¹¹⁾ ou l'ibuprofène ⁽¹¹²⁾.

L'optimisation de la biocompatibilité des microcapsules est influencée par plusieurs facteurs dont la qualité, la composition chimique et les caractéristiques de surface des matériaux utilisés.

1.2.2.1 Qualité du biomatériau

Les matériaux utilisés pour la fabrication des microcapsules doivent être dépourvus de tout contaminant ou impureté qui pourraient être rejetés de la matrice après son implantation chez l'hôte.

Ces composés issus du processus de fabrication (fragments de polymère, solvants, agents de réticulation) ou bien du matériau lui-même (bactéries, endotoxines) sont susceptibles de déclencher une réaction inflammatoire, voire même de modifier les propriétés physiques des microcapsules ⁽¹¹³⁾.

Dans le cas de l'alginate, lorsqu'il n'est pas purifié, ce dernier contient de nombreuses impuretés, telles que des *polyphénols* qui sont toxiques pour les cellules, ou encore des *endotoxines* capables de stimuler le système immunitaire de l'hôte ^(99,102). Ces composés peuvent être éliminés par des étapes de purification standardisées. De nombreuses méthodes de purification ont été publiées au cours de ces dernières années ^(114–116). Il a été démontré que la purification de l'alginate améliore la biocompatibilité des microcapsules à base de ce polymère naturel ^(102,110).

Ainsi afin d'assurer une bonne biocompatibilité et bioperformance générale de l'implant, il est devenu primordial de purifier les polymères avant de les utiliser pour la fabrication de microcapsules implantables.

1.2.2.2 Composition chimique du biomatériau

La composition chimique de la surface du biomatériau est un paramètre important à prendre en compte pour la biocompatibilité des microcapsules. En effet, c'est la surface des microcapsules qui est directement en contact avec les cellules de l'hôte.

Des techniques telles que la spectroscopie photoélectrique des rayons X (XPS : X ray photoelectron spectroscopy), la spectroscopie infrarouge ou encore la spectroscopie de masse à émission ionique secondaire sont aujourd'hui utilisées pour caractériser la composition chimique de la surface des microcapsules. Ces techniques permettent d'évaluer de façon préliminaire les bioperformances *in vivo* des microcapsules ⁽¹¹⁷⁻¹¹⁹⁾.

1.2.2.3 Charge de surface

La charge de surface qui inclut la charge nette et la distribution locale des charges électriques à la surface de la microcapsule joue un rôle essentiel dans les phénomènes de fibrose. En effet, les biomatériaux dotés d'une charge nette positive ont tendance à favoriser l'adsorption de protéines et l'adhésion de cellules chargées négativement. A l'inverse, une charge nette négative répartie de manière homogène confère une meilleure biocompatibilité au matériau ⁽¹²⁰⁾.

La charge nette a été étudiée par De Vos et son équipe à l'aide de la technique du potentiel zêta ⁽¹²⁰⁾. Le potentiel zêta représente la charge électrique de surface d'une microcapsule. La valeur de cette charge de surface permet de prédire les interactions interfaciales entre la microcapsule et le tissu environnant de l'hôte.

De Vos et son équipe ont étudié la charge nette sur des microcapsules d'alginate et de PLL ayant une proportion variable d'acide guluronique : faiblement, moyennement ou fortement dosé en unité G (cf. structure chimique de l'alginate dans le § II.2.1 Matériaux d'encapsulation). Leur étude met en avant ⁽¹²⁰⁾:

- une réponse biologique de l'hôte contre les microcapsules, plus marquée pour les alginates faiblement et fortement dosés en unité G (haut potentiel zêta) ;
- un effet du pH sur le potentiel zêta, effet plus prononcé pour les alginates faiblement et fortement dosés en unité G.

La baisse du pH induite par la réaction inflammatoire post chirurgicale est responsable ⁽¹²⁰⁾ :

- d'un changement de conformation des protéines dans et à la surface de la microcapsule ;
- d'une modification de la charge électrique des molécules ionisées des biomatériaux constituant la microcapsule.

Ces remaniements rendent plus vulnérables les microcapsules à l'adhésion des cellules et des protéines ⁽¹⁰²⁾.

1.2.2.4 Hydrophilie de la surface

Le caractère hydrophile ou hydrophobe d'une surface est également un paramètre important pour la biocompatibilité des microcapsules implantées. En effet, les surfaces hydrophobes tendent à augmenter les tensions interfaciales entre les microcapsules et les tissus biologiques, ce qui favorise l'adsorption de protéines et l'adhésion de cellules. A l'inverse, les surfaces hydrophiles en minimisant ces tensions interfaciales défavorisent l'adsorption protéique et l'adhésion cellulaire. Elles confèrent ainsi une meilleure biocompatibilité au matériau ⁽¹²¹⁾. C'est une des raisons pour laquelle, les hydrogels sont les biomatériaux hydrophiles les plus utilisés pour la fabrication des microcapsules d'îlots de Langerhans.

1.2.2.5 Morphologie du biomatériau

La morphologie de la surface des microcapsules est une autre caractéristique physique qui influence la biocompatibilité de ces dernières.

De Vos et son équipe ont démontré l'importance d'obtenir des microcapsules ayant des surfaces lisses exemptes d'aspérités et d'irrégularités. En effet, les irrégularités de surface de la microcapsule ont tendance à favoriser l'adhésion des cellules et l'accumulation des protéines au sein des cavités ce qui contribue au développement de fibroses péricapsulaires ⁽¹²²⁾.

La maîtrise de la procédure d'encapsulation est un paramètre clef dans la limitation des irrégularités de surface et dans l'obtention de microcapsules à surface lisse et homogène.

Aujourd'hui différentes techniques telles que la microscopie à force atomique ou encore la microscopie confocale à balayage laser sont utilisées pour visualiser la topographie de la surface des biomatériaux ⁽¹²³⁾.

1.3 Résistance mécanique et chimique

La résistance mécanique et chimique des microcapsules est un paramètre clef. En effet, la rupture d'une membrane d'encapsulation compromettrait sa capacité à assurer une immunoprotection. Les îlots de Langerhans seraient alors exposés et déclencheraient l'activation du système immunitaire de l'hôte, ce qui conduirait à l'inefficacité de l'ensemble du transplant. Les microcapsules doivent donc pouvoir

résister aux sollicitations mécaniques *in vivo*. Ces sollicitations sont de deux ordres : résistance au cisaillement et résistance au gonflement osmotique.

Le gonflement osmotique est un phénomène qui fait suite à la présence dans la microcapsule d'une macromolécule d'alginate chargée ne pouvant pas diffuser au travers de la membrane. Afin d'équilibrer les charges, des ions extérieurs à la microcapsule vont y entrer. Ce phénomène s'accompagne d'une entrée d'eau dans la microcapsule à l'origine du gonflement de cette dernière et pouvant induire une augmentation de la porosité voire dans certains cas conduire à un éclatement de la structure ⁽¹²⁴⁾.

La résistance des microcapsules est fonction de plusieurs facteurs qui dépendent notamment de la nature du polymère utilisé et du mode de préparation de la membrane. Afin d'optimiser la résistance mécanique et chimique des microcapsules, il est possible de jouer sur ce dernier paramètre via l'addition de multiples couches membranaires, l'augmentation de la concentration en polymère, ou encore la diminution de la taille de la capsule ⁽¹²⁵⁾.

Les chercheurs ont développé diverses méthodes pour évaluer la résistance mécanique des microcapsules *in vitro*. Ces méthodes soumettent les microcapsules à un stress mécanique (choc osmotique ⁽¹²⁶⁾, charge uniaxiale ⁽¹²⁷⁾, agitation ⁽¹²⁸⁾). La proportion de microcapsules brisées après que celles-ci aient été soumises à un stress mécanique peut être quantifiée soit par une simple observation visuelle, soit à l'aide de marqueurs colorés encapsulés dans les microcapsules et externalisés en cas de dommages suite au stress appliqué.

1.4 Taille des microcapsules

La taille des microcapsules est une caractéristique importante pour leur bioperformance. Elle est principalement déterminée par la méthode de production des microcapsules. Afin d'optimiser le succès de la greffe, il est souhaitable d'avoir une distribution de taille uniforme.

De manière générale, le diamètre des microcapsules oscille entre 500 et 1000 μm . Cette spécificité de taille leur confère plusieurs avantages ^(121,129) :

- un rapport surface sur volume élevé, ce qui favorise la diffusion et le transport de l'oxygène et des nutriments à travers la membrane ;
- une meilleure résistance mécanique ;

- un faible volume de transplant, permettant l'accès à plusieurs sites d'implantation extravasculaire.

En contrepartie, la taille réduite des capsules peut contribuer à ⁽¹²⁹⁾:

- la présence de capsule vide ;
- l'encapsulation incomplète des îlots de Langerhans ;
- l'instabilité des capsules *in vivo*.

En plus des microcapsules conventionnelles, des études sont actuellement menées sur des microcapsules de très petite taille (< 100 µm) produites par la technique du revêtement conforme. Cette technique minimise l'espace vide entre les cellules et l'extérieur de la capsule. La barrière immunoprotectrice (10 à 25 µm d'épaisseur) est directement greffée sur les cellules et épouse le contour de celles-ci. Cette technique est plus amplement détaillée dans la section III.3 de la thèse.

2 Techniques de microencapsulation des îlots de Langerhans

2.1 Matériaux d'encapsulation

La microencapsulation de cellules vivantes implique que les matériaux soient biocompatibles et non cytotoxiques. Les matériaux d'encapsulation doivent assurer la survie des îlots de Langerhans mais également maintenir leur métabolisme actif ⁽⁹⁹⁾.

Au cours de ces dernières années, la liste des matériaux étudiés pour la microencapsulation des îlots de Langerhans s'est considérablement allongée dans le but de trouver de nouvelles formules pour optimiser la bioperformance des microcapsules obtenues ⁽¹³⁰⁾.

Parmi les matériaux étudiés en thérapie cellulaire pour la fabrication des microcapsules, les hydrogels sont les plus fréquemment utilisés ⁽¹²¹⁾. Les hydrogels sont des réseaux tridimensionnels composés de chaînes polymères hydrophiles et réticulées. Ces derniers présentent plusieurs avantages comme matériau de base pour la formulation des microcapsules ^(100,119) :

- ils forment facilement des billes dans des conditions « douces » sans effet néfaste sur la survie des îlots de Langerhans ;
- ils sont transparents, ce qui est utile pour visualiser les cellules encapsulées ;
- leur caractère hydrophile leur assure une tension interfaciale minimale entre la surface de la microcapsule et les fluides biologiques, ce qui minimise le phénomène d'adsorption protéique et d'adhésion cellulaire ;

- ils sont perméables aux substances de bas poids moléculaire, tels que les nutriments ou l'oxygène ;
- leurs propriétés physico-chimiques (flexibilité et souplesse des gels) minimisent l'irritation des tissus locaux lors de l'implantation des microcapsules.

Actuellement, plusieurs types de polymères naturels ou synthétiques sont utilisés pour la microencapsulation des îlots de Langerhans, tels que les alginate, l'agarose, les copolymères d'hydroxyéthylméthacrylate – méthylméthacrylate (HEMA - MMA) ou encore le polyéthylène glycol (PEG) ^(99,102).

2.1.1 Les polymères d'origine naturelle

2.1.1.1 Microcapsule à base d'alginate

L'alginate est l'hydrogel le plus utilisé et étudié comme constituant de ce type de microcapsules. Il s'agit d'un polysaccharide anionique naturel extrait des algues brunes. Il se compose d'un enchainement de deux monomères : l'acide mannuronique (M) et son épimère en C5 l'acide guluronique (G) liés par des liaisons glycosidiques (1 → 4). La séquence et le ratio de ces monomères varient selon l'espèce d'algue utilisée ⁽¹³¹⁾.

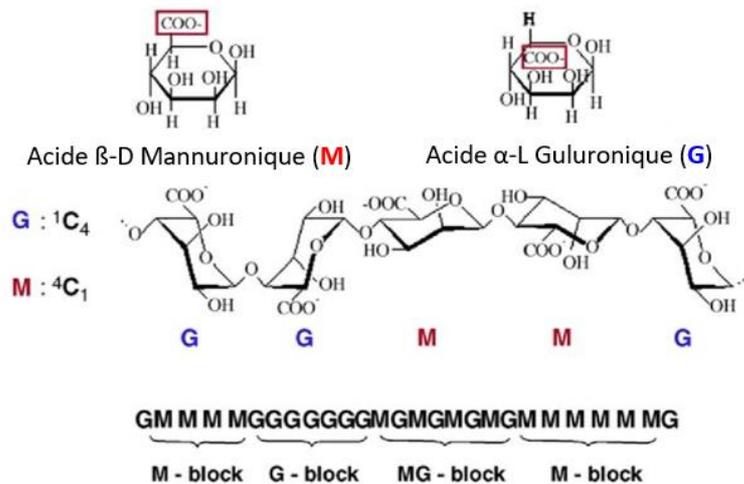


Figure 8. Structure chimique de l'alginate : acide β-D-mannuronique (M) et acide α-L-guluronique (G) ⁽¹⁰²⁾.

L'alginate présente des caractéristiques qui le rendent approprié pour l'encapsulation de cellules vivantes ⁽¹⁰²⁾:

- il se complexe facilement avec des polycations, tels que le calcium ou le baryum par des liaisons ioniques pour former un gel ;
- le procédé de gélification est rapide et non toxique pour les îlots de Langerhans (il peut être réalisé dans des conditions physiologiques).

La composition chimique de l'alginate (c'est-à-dire, la proportion d'acide guluronique/mannuronique, leur agencement, ou encore la longueur des chaînes de polymères) a une influence significative sur les propriétés de gonflement, de la porosité, de la biocompatibilité et de la résistance mécanique et chimique des microcapsules. Les alginates riches en unité G ont tendance à posséder une structure plus rigide et de porosité plus élevée. Au contraire, les alginates riches en unité M sont connus pour être plus élastiques et plus souples ⁽¹³¹⁾.

Les microcapsules à base d'alginate les plus étendues sont les suivantes :

2.1.1.1.1 Microcapsules Alginate – Poly-L-Lysine – Alginate (APA)

La procédure d'immunoprotection des îlots de Langerhans par des microcapsules d'alginate et de PLL a été introduite par Lim et Sun en 1980 ⁽¹³²⁾. Le principe original consiste à mettre en suspension les îlots de Langerhans préalablement isolés dans une solution d'alginate de sodium. Des gouttelettes de cette suspension sont ensuite versées dans un bain de chlorure de calcium, ce qui permet la gélification de ces dernières et la formation de billes au sein desquelles se trouvent immobilisés les îlots de Langerhans. Les billes de gels d'alginate de calcium sont ensuite incorporées dans une solution de PLL. L'interaction de la PLL (polycation) avec les groupements chargés négativement de l'alginate conduit à la formation d'une membrane autour de la bille. La formation de cette membrane apporte une meilleure résistance mécanique et chimique et permet de réduire la porosité de la membrane des microcapsules obtenues ⁽¹⁰²⁾.

La complexation de la PLL avec les groupements anioniques de l'alginate varie en fonction de la composition chimique de l'alginate et notamment de la proportion variable en acide guluronique (G).

Les alginates composés d'un taux intermédiaire en unités G seront préférés car ils possèdent un plus grand nombre de sites de liaison pour former des complexes avec la PLL ⁽¹⁰²⁾.

A l'inverse, les alginates composés d'un taux élevé d'unités G possèdent moins de sites de liaisons disponibles. Les liaisons formées avec la PLL sont très souvent incomplètes. Par conséquent, la surface de la microcapsule est exposée à une plus grande quantité de charge positive, on observe une réaction inflammatoire plus marquée ⁽¹⁰²⁾.

Soluble et non complexée, de par sa charge positive, la PLL est fortement immunogène. C'est pourquoi afin de neutraliser ou d'équilibrer les charges libres à la surface des microcapsules, ces dernières sont immergées dans une solution polyanionique, il s'agit le plus souvent d'alginate dilué de même composition que le cœur d'alginate qui compose la microcapsule. Toutefois, il a été démontré, que l'utilisation d'un alginate de plus bas poids moléculaire que celui utilisé pour constituer le cœur de la microcapsule offre une plus grande efficacité de liaison à la PLL ⁽¹⁰²⁾.

Malgré l'ajout de cette seconde couche d'alginate, une réaction inflammatoire apparaît fréquemment. Cette observation a poussé les chercheurs à s'intéresser non seulement à l'analyse physico-chimique de la microcapsule, mais également à sa structure.

Pendant très longtemps, l'analyse physico-chimique de la microcapsule par XPS a laissé supposer que la microcapsule d'APA se composait d'un cœur d'alginate de calcium enveloppé par une membrane composée de deux couches :

- une première couche composée d'alginate et de PLL ;
- et une seconde couche composée d'alginate de calcium recouvrant la première couche.

Les nouvelles avancées technologiques ont permis d'étudier la structure de la microcapsule d'APA en combinant : la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR : Fournier transform infrared spectroscopy), la XPS et un microscope confocal. Ces études ont permis de mettre en évidence que contrairement à ce qui était supposé, la composition de la microcapsule d'APA est constituée d'un cœur d'alginate de calcium recouvert par une unique membrane d'alginate complexée avec la PLL ^(102,133).

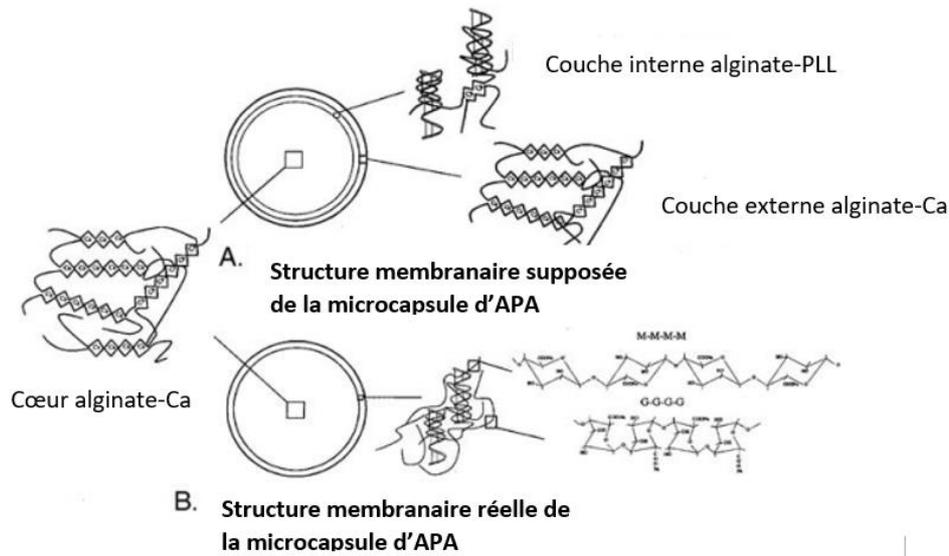


Figure 9. Structure de la membrane de la microcapsule d'APA ⁽¹⁰²⁾.

Les données présentées suggèrent donc que les interactions entre les polycations et l'alginate jouent donc un rôle primordial dans l'optimisation de la biocompatibilité des microcapsules.

2.1.1.1.2 Autres exemples de microcapsules d'alginate complexées avec des polycations autre que la PLL

Au cours de ces dernières années, l'interaction de l'alginate avec d'autres polycations a été étudiée comme alternative à l'APA. La Poly-D-lysine (PDL) ⁽¹³⁴⁾, la Poly-L-ornithine (PLO) ⁽¹³⁵⁾ ou encore la Poly (méthylène-co-guanidine) ⁽¹³⁶⁾ peuvent être citées .

La PLO semble être un polyélectrolyte prometteur. Tam et son équipe, au cours d'une étude comparative entre des microcapsules formulées avec de la PLL ou de la PLO, ont démontré une meilleure biocompatibilité *in vivo* pour la PLO ⁽¹³⁷⁾.

La PLO offre également un avantage comparativement à la PLL utilisée à l'origine, sur le plan de la résistance mécanique à divers stress. Il est suggéré que le groupement fonctionnel plus court de la PLO soit en mesure d'interagir de façon plus efficace avec l'alginate créant ainsi des microcapsules ayant une membrane plus épaisse et plus résistante aux stress ^(135,137).

Darrabie et son équipe ont évalué la résistance mécanique des microcapsules de PLL et PLO. Deux tests distincts ont été réalisés :

- exposition des capsules à un environnement hypotonique (incubation des capsules dans 10 ml d'H₂O) pour tester la résistance au gonflement osmotique;
- agitation des capsules pendant plusieurs heures (36 heures).

Le pourcentage de capsules brisées, observé respectivement par microscope inversé et stéréomicroscope, est significativement plus élevé lorsque ces dernières sont composées de PLL (Figure 10) ⁽¹³⁵⁾.

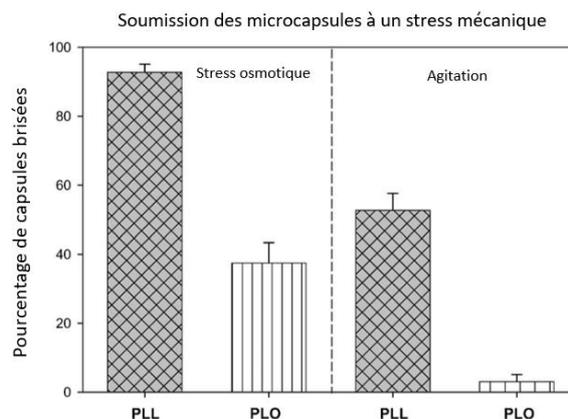


Figure 10. Effet de la PLL et PLO sur la résistance mécanique des microcapsules ⁽¹³⁵⁾.

2.1.1.1.3 Microcapsule baryum – alginate

Quelques chercheurs optent pour ne pas ajouter une membrane distincte à la surface des billes d'hydrogel. Dans ce cas une matrice gélifiée spécifiquement composée de baryum et d'alginate est le plus souvent utilisée.

Lors de l'étape de gélification de l'alginate, le calcium habituellement utilisé pour réticuler les alginates est alors remplacé par du baryum. Le baryum conduit à l'obtention de gels plus résistants. En effet, ce dernier possède une meilleure affinité pour l'alginate que le calcium. Il a la capacité de se lier non seulement aux résidus guluroniques mais aussi aux résidus mannuroniques de l'alginate ⁽¹³⁸⁾.

L'utilisation du baryum confère plusieurs avantages ^(99,102,110,138) :

- une simplification du procédé de fabrication (l'étape de rigidification de la membrane par l'ajout d'un polycation est éliminée) ;

- une meilleure réticulation de l'alginate et une plus grande résistance et stabilité mécanique. Cette propriété nécessite que les alginates utilisés soient riches en acide guluronique, plus de 60% (Figure 11) ;
- une diminution de la taille moyenne des microcapsules, ce qui favorise les échanges avec le milieu environnant.

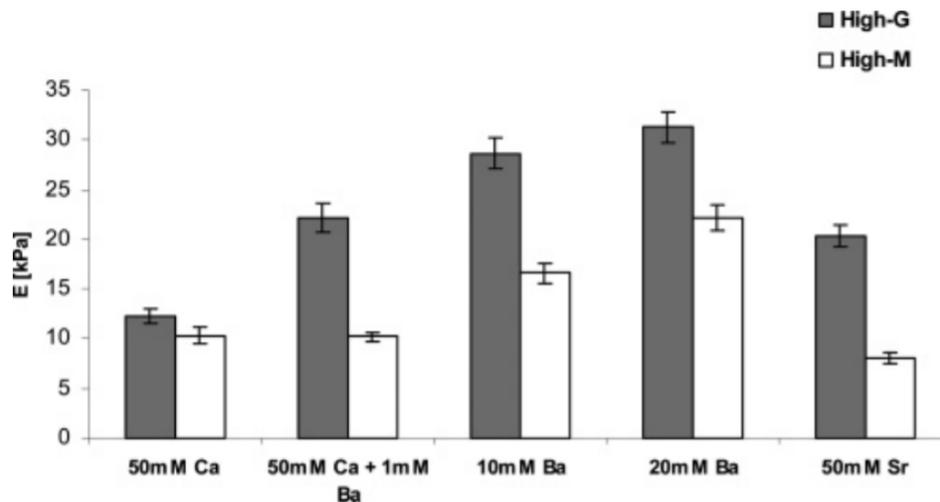


Figure 11. Effets de différents polycations (Calcium, Baryum, Strontium) sur la résistance mécanique (via le module de Young, noté E) des microcapsules d'alginate fortement dosées en unités G ou en unités M ⁽¹³⁸⁾.

Toutefois, le baryum reste un composé toxique pour l'organisme (hypertension, toxicité rénale) et pour les cellules encapsulées (inhibition des canaux potassiques membranaires conduisant à la mort cellulaire). Pour prévenir ces effets ^(102,110) :

- le baryum est utilisé en faible quantité ;
- le temps de contact avec le baryum est réduit lors de l'étape de gélification ;
- l'excès de baryum est enlevé par des lavages successifs des microcapsules.

Des études chez la souris ⁽¹³⁹⁾ puis chez l'homme ⁽¹⁴⁰⁾ ont démontré la biocompatibilité du couple baryum - alginate et la capacité des microcapsules à assurer une immunoprotection efficace sans traitement immunosuppresseur.

2.1.1.2 Microcapsule à base d'agarose

L'agarose est un polymère neutre et naturel extrait de l'agar. Il se compose d'unités alternées de β -D-galactopyranose et de 3,6-anhydro-L-galactopyranose.

Généralement, la concentration initiale d'agarose utilisée pour la formation des microcapsules est de 5% ^(121,141).

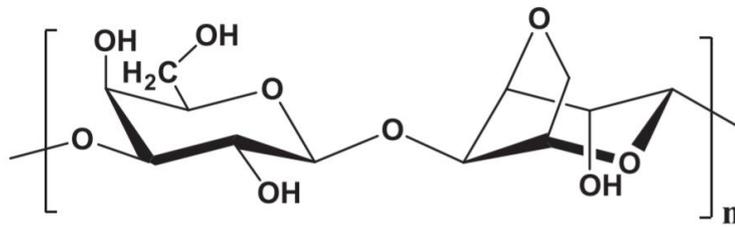


Figure 12. Structure de l'agarose : unités alternées de β -D-galactopyranose et de 3,6-anhydro-L-galactopyranose ⁽¹⁴¹⁾.

La formation d'un gel immunoprotecteur est obtenue grâce à une modification des conditions physico-chimiques : un changement de température (cf. § II.2.2 Techniques de production des microcapsules).

Des études *in vivo* réalisées chez l'animal ont démontré l'efficacité des microcapsules d'agarose pur comme barrière immunoprotectrice, bien que la survie des cellules encapsulées ait été limitée dans le temps ⁽¹⁴¹⁻¹⁴³⁾.

La survie du greffon peut être améliorée de deux manières ^(141,144) :

- en augmentant la concentration initiale d'agarose (de 7,5 à 10%) ;
- en ajoutant une barrière protectrice supplémentaire obtenue à partir d'un couple de polyélectrolytes de charges opposées (cf. § II.2.1.1.2.1 ci-dessous).
-

2.1.1.2.1 Microcapsule d'agarose et de polystyrène d'acide sulfonique

Les premiers essais de microcapsule à base d'agarose et de polystyrène d'acide sulfonique (PSSa : polystyrene sulfonic acid) ont été réalisés par Tun et son équipe en 1996 ⁽¹⁴⁵⁾. Le principe est le suivant ⁽¹⁴¹⁾:

- le polymère anionique PSSa est incorporé à la solution d'agarose (5% d'agarose et 5% PSSa) pour former l'hydrogel servant de matrice aux îlots de Langerhans encapsulés ;
- la matrice ainsi formée est incubée avec du polybrène. L'interaction du polybrène, polymère cationique, avec les groupements chargés négativement du PSSa conduit à la formation d'un complexe insoluble à la surface de la capsule ;

- la dernière étape consiste à incorporer la capsule obtenue dans une solution de carboxyméthylcellulose (CMC). La CMC confère des propriétés anioniques à la surface de la capsule permettant d'améliorer sa biocompatibilité avec les tissus locaux.

L'ajout du PSSa à l'agarose permet d'améliorer la résistance mécanique de la microcapsule et protège les îlots de Langerhans de l'activité cytolytique du complément ^(121,144).

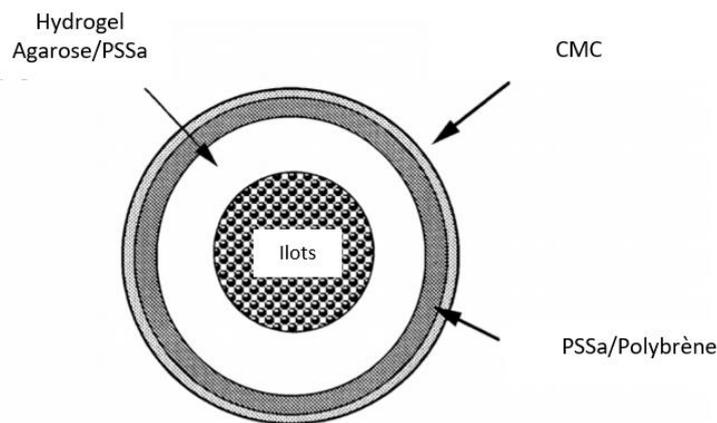


Figure 13. Représentation schématique d'une microcapsule d'agarose – PSSa ⁽¹⁴⁴⁾.

2.1.1.3 Autres exemples de microcapsules à base de polymères naturels

Il existe d'autres combinaisons de matériaux envisagés dans la fabrication de microcapsules destinées à assurer l'immunoprotection de cellules transplantées : le *chitosan*, le *collagène* ou encore la *cellulose* peuvent être cités.

Certains de ces matériaux peuvent être utilisés comme substituts des matériaux de base (alginate, agarose), tandis que d'autres consistent à optimiser des modèles déjà existants par ajout de couches supplémentaires.

2.1.1.3.1 Le chitosan

Actuellement le chitosan est principalement utilisé pour l'encapsulation de cellules PC12 pour le traitement de la maladie de Parkinson.

Le chitosan est un polymère cationique dérivée de la chitine, composant principal de la carapace des insectes et des crustacés. Ce dernier se transforme en hydrogel via la formation de complexes polyélectrolytes avec les groupements anioniques de l'alginate (cf. § II.2.1.3.5 Coacervation).

Actuellement, les essais d'immunoprotection des îlots de Langerhans avec le chitosan restent limités. En effet, ce dernier ne se dissout pas facilement dans les milieux aqueux à pH physiologique. Plusieurs groupes étudient le *chitosan N acétylé* comme substitut du *chitosan* car ce dernier présente une meilleure solubilité dans l'eau et les solvants organiques ^(141,146,147).

2.1.1.3.2 La cellulose

Plusieurs dérivés de la cellulose sont actuellement étudiés ^(141,148):

- la carboxyméthylcellulose (CMC) ;
- les capsules à base de sulfate de cellulose sodique (NaCS : sodium cellulose sulfate) et de chlorure de polydiallyl diméthylammonium (PDADMAC : polydiallyl diméthylammonium chloride).

Dans le second exemple, la formation des microcapsules fait intervenir la complexation de polyélectrolytes de charges opposées. Les îlots de Langerhans préalablement isolés sont mis en suspension dans la solution de NaCS, polymère anionique, les gouttelettes formées sont ensuite récupérées dans une solution de PDADMAC, polymère anionique ⁽¹⁴¹⁾.

Cependant de nombreuses améliorations doivent encore être faites avant que ces matériaux puissent être envisagés comme dispositifs immunoprotecteurs des îlots de Langerhans.

2.1.1.3.3 Le collagène

A ce jour, plusieurs types de collagène ont été identifiés et décrits. Le collagène de type 1 est le polymère le plus étudié pour l'encapsulation de cellules.

Toutefois, l'application du collagène en tant que constituant principal des microcapsules reste limitée en raison de ses faibles propriétés mécaniques et de sa stabilité à court terme. Le collagène est soumis à une dégradation enzymatique très rapide. Afin d'augmenter sa durabilité, des essais dans la littérature sont décrits avec des microcapsules de collagène recouvertes d'une membrane à base de tétrapolymère HEMA (hydroxyéthylméthylacrylate), MAA (acide chitosméthacrylique) et MMA (méthacrylate de méthyle), polymères anioniques ^(141,149). Des recherches plus approfondies sont nécessaires pour évaluer la biocompatibilité du collagène à long terme.

Ces nouveaux matériaux ne semblent donc pas, pour l'instant, des concurrents sérieux à l'alginate, car aucun n'a montré un apport majeur de nouvelles propriétés par rapport aux capsules d'alginate.

2.1.2 Les polymères synthétiques

Comparés aux polymères naturels, les polymères synthétiques ont l'avantage majeur de posséder des propriétés chimiques et mécaniques contrôlables et reproductibles. Ils peuvent être également synthétisés en grandes quantités plus facilement que la plupart des polymères naturels. Toutefois, la plupart d'entre eux requièrent des composés chimiques toxiques dans leur synthèse ou leur transformation qui exige de nombreuses étapes de purification ⁽¹⁴¹⁾.

Plusieurs polymères synthétiques sont actuellement étudiés comme matériaux pour l'encapsulation des îlots de Langerhans, les plus largement utilisés sont les suivants :

2.1.2.1 Le Polyéthylène-glycol et ses dérivés

Le PEG est un polyéther composé d'une répétition d'unités d'éthylène glycol. C'est un biomatériau inerte utilisé principalement pour le revêtement conforme, directement à la surface des îlots de Langerhans ou pour former la couche extérieure de microcapsules d'alginate. La technique du revêtement conforme est présentée dans la section III.3 de la thèse.

Le PEG et ses dérivés présentent plusieurs avantages:

- de par leur conformation et leur encombrement stérique, ils sont connus pour défavoriser l'adsorption des protéines et l'adhésion cellulaire à la surface des biomatériaux. Chaque monomère d'éthylène glycol a la capacité de lier 2 à 3 molécules d'eau. Le nombre important de molécules d'eau liées sur les chaînes de PEG contribue à créer un volume d'exclusion pouvant prévenir la fixation de molécules avoisinantes ^(141,150) ;
- le PEG et ses dérivés ont la capacité de former des hydrogels dans des conditions douces, par photopolymérisation par rayonnement visible et à température ambiante ⁽¹⁵¹⁾.

Des études *in vivo* avec des microcapsules de PEG produites par la technique du revêtement conforme ont été menées sur des babouins, l'insulino-indépendance a pu être obtenue jusqu'à 2 ans sans immunosuppresseur ⁽¹⁵²⁾. Suite à cette étude, une étude clinique a été réalisée, les résultats ne portent que sur deux patients, une diminution des hyper et hypoglycémies ainsi qu'une diminution des apports exogènes en insuline a pu être observée. Cependant l'insulino-indépendance n'a pas encore été acquise de manière définitive ⁽¹⁵²⁾. Cela laisse penser que des résultats prometteurs pourraient être obtenus dans les années à venir.

2.1.2.2 Les polyacrylates

Les polyacrylates sont des polymères thermoplastiques. L'HEMA-MMA est le copolymère synthétique le plus couramment utilisé pour l'encapsulation de cellules. L'HEMA-MMA se transforme en gel par précipitation. En général, il est dissout dans un solvant organique, au contact d'une solution aqueuse, ce dernier précipite et enrobe alors les îlots de Langerhans.

Les polyacrylates forment des gels très stables dans les fluides physiologiques. Malgré cet avantage potentiel, ils présentent quelques inconvénients ⁽¹⁴¹⁾:

- ils sont insolubles dans l'eau, ce qui oblige de recourir à l'utilisation de solvants organiques cytotoxiques pour former un gel;
- la plupart des microcapsules à base d'acrylate ont une faible perméabilité pour les nutriments hydrosolubles.

L'HEMA-MMA peut être utilisé seul ou en association avec des polymères naturels tels que le collagène ^(149,153) ou l'agarose ⁽¹⁵⁴⁾.

Bien que des essais *in vitro* aient conduit à des résultats encourageants, il existe un écart important entre la bioperformance des microcapsules de polyacrylates *in vitro* et *in vivo*. *In vivo*, les composants du système du complément sont retrouvés à la surface des microcapsules. Ces derniers sont responsables d'une réponse immunitaire marquée pouvant conduire à l'échec de la greffe ^(141,155).

Au cours de ces dernières années, de nombreux matériaux d'encapsulation ont été développés. De manière générale, le choix du matériau d'encapsulation est fait de compromis entre la résistance mécanique, la pureté, la biocompatibilité, les

caractéristiques de dégradation, la porosité, la perméabilité, ou encore l'immunoprotection conférée aux cellules.

Face à la diversité des polymères disponibles pour la microencapsulation des îlots de Langerhans, de nombreuses techniques de production sont actuellement étudiées.

2.2 Techniques de production des microcapsules

L'étape préalable à la fabrication des microcapsules consiste à prélever les îlots de Langerhans d'origine humaine ou animale à partir d'un ou de plusieurs pancréas de donneurs. La technique de préparation des îlots de Langerhans est la même que celle employée pour la greffe d'îlots de Langerhans non encapsulés : extraction, isolement et purification.

Le choix de la technique de production des microcapsules dépend principalement du type de polymère choisi et des conditions dans lesquelles ce dernier conduit à la formation d'une barrière protectrice stable autour des îlots de Langerhans. Au cours de ces dernières années, de nombreuses méthodes de microencapsulation ont été étudiées et développées de façon à optimiser les caractéristiques des microcapsules. Deux grandes familles sont à distinguer : les techniques macroscopiques et les techniques microfluidiques microscopiques.

2.2.1 Systèmes macroscopiques

La microencapsulation des îlots de Langerhans en vue d'une transplantation comporte des exigences spécifiques. Celles-ci concernent surtout la nécessité de ne pas compromettre la viabilité ou le fonctionnement des cellules pendant la production des microcapsules. Cette exigence nécessite de privilégier des conditions douces, à savoir l'utilisation éventuelle de solvants non toxiques, le maintien d'un pH et d'une température à des niveaux physiologiques acceptables durant tout le processus de production.

De façon générale, le procédé qui permet la microencapsulation des îlots de Langerhans est réalisé en 3 étapes ⁽⁹⁹⁾ :

- la mise en suspension des îlots de Langerhans préalablement isolés dans une solution de polymère ;

- la production de gouttelettes à partir de la suspension cellulaire. À l'issue du processus d'encapsulation, ces gouttelettes constitueront le cœur des capsules ;
- la stabilisation des gouttelettes formées par un processus chimique (polymérisation) ou physico-chimique (gélification, coacervation). Le choix du procédé est fonction du matériau d'encapsulation utilisé.

2.2.1.1 Mise en suspension des îlots de Langerhans dans une solution de polymère

Une fois les îlots de Langerhans isolés et purifiés, l'étape suivante consiste à les mélanger avec la solution de polymère. Cette étape requiert une répartition homogène des îlots de Langerhans dans la solution de polymère pour permettre la formation d'une suspension cellulaire.

Il n'existe pas de technique particulière, toutefois, la mise en suspension doit s'effectuer en imposant un stress mécanique minimal lors de la phase de mélange pour éviter d'endommager les îlots de Langerhans.

La solution de polymère doit répondre à plusieurs critères :

- être biocompatible avec les îlots de Langerhans ;
- être capable de gélifier dans des conditions douces pour ne pas compromettre la viabilité des cellules.

De plus, la viscosité de la solution (qui est fonction du poids moléculaire du polymère et de sa concentration dans la solution) exerce un effet important sur la forme, la taille mais également sur la morphologie des gouttelettes qui seront produites au cours des étapes ultérieures ⁽¹²⁵⁾.

2.2.1.2 Formation de gouttelettes

Le principe de base consiste à extruder la suspension cellulaire préalablement préparée à travers une aiguille ou une buse. Les gouttelettes sont obtenues en interrompant de façon régulière le débit de la suspension.

La présence de cellules vivantes impose que le processus soit adapté de façon à réduire autant que possible le stress mécanique et les forces de cisaillement pouvant être communiqués aux îlots de Langerhans.

L'extrusion offre la possibilité de former des gouttelettes de taille contrôlée, uniforme et de forme sphérique, à la fois en choisissant le diamètre externe de l'aiguille et en vérifiant le débit alimentant le circuit de production ⁽¹⁵⁶⁾.

La production de microcapsules homogènes nécessite d'ajouter une force supplémentaire à la gravité. Cette force additionnelle peut être un flux d'air, une force électrostatique, une force vibratoire ou un jet laminaire ^(99,156).

En fonction de la technique utilisée : la taille, la sphéricité et la productivité varient ⁽¹⁵⁶⁾.

2.2.1.2.1 Production des gouttelettes par jet d'air coaxial

La production de gouttelettes par la technique de jet d'air coaxial requiert l'utilisation d'un double tube concentrique. La solution de polymère comprenant les îlots de Langerhans en suspension est poussée dans le tube interne du double tube concentrique, tandis que de l'air est injecté dans la partie externe, entraînant le détachement de la goutte avant qu'elle n'ait atteint sa taille définitive. Les gouttelettes sont ensuite récupérées dans un bain collecteur ^(157,158).

Cette technique permet d'obtenir des billes de taille uniforme et homogène.

Le jet d'air et le débit de la solution polymère exercent un effet sur la taille des capsules :

- plus le jet d'air est rapide, plus la taille des gouttelettes est petite ;
- plus le débit de la solution de polymère est élevé, plus la taille des gouttelettes est importante.

En général, les billes formées par cette technique sont assez grosses (diamètre > 500 μm) ⁽¹⁵⁷⁾.

L'obtention de capsules sphériques nécessite que la solution de polymère ait une viscosité faible. L'augmentation de la viscosité conduit à la formation de capsules déformées ⁽¹⁵⁶⁾.

2.2.1.2.2 Production des gouttelettes par tension électrostatique

Dans ce système, la solution de polymères passe au travers de la cavité interne d'une aiguille. Une électrode positionnée au niveau de l'aiguille applique une charge à la gouttelette qui va se former. Une électrode de polarité opposée est placée en dessous de l'aiguille au niveau de la cuve de collection. A chaque impulsion électrostatique,

une gouttelette se détache prématurément avant qu'elle n'ait pu atteindre sa taille définitive.

La taille des billes formées peut être influencée par deux principaux facteurs ⁽¹⁵⁹⁾:

- la fréquence des impulsions : une fréquence rapide des impulsions réduit la taille des gouttelettes formées.
- le débit de la solution de polymère : un débit élevé permet aux gouttelettes formées d'atteindre une taille plus importante avant d'être détachée de l'aiguille.

La technique par tensions électrostatiques permet l'obtention de billes monodisperses de plus petites tailles comparée à celles obtenues via la technique du flux d'air coaxial. Il est possible de diminuer le diamètre des microcapsules de 200 μm ⁽¹⁶⁰⁾.

Le débit de production des capsules est similaire à celui obtenu avec la technique de jet d'air : il est faible (en moyenne 1 g de solution de polymère par heure) et ce même avec des solutions de faible viscosité ⁽¹⁵⁶⁾, ce qui limite son utilisation à grande échelle.

2.2.1.2.3 Production des gouttelettes par vibrations

Cette méthode consiste à faire passer à travers un orifice circulaire un flux continu de liquide. Ce dernier est périodiquement perturbé par des vibrations causées par exemple par des ultrasons. Ce sont ces vibrations qui permettent de détacher la gouttelette avant qu'elle n'atteigne sa taille définitive ⁽¹⁶¹⁾.

La perturbation du flux de liquide est contrôlée de manière très précise et reproductible, permettant ainsi de générer des microcapsules caractérisées par une distribution de taille très étroite.

La taille des gouttelettes formées dépend de la fréquence et de l'amplitude de la vibration, de la géométrie de la buse et de la pression appliquée ⁽¹⁶¹⁾.

Cette technologie permet la formation d'une quantité importante de billes dans un temps restreint. Le débit de production est plus élevé que celui des techniques à flux d'air coaxial ou à différence de potentiel (20 à 40 fois plus rapide) ⁽¹⁵⁶⁾.

Cependant une des limitations à l'utilisation de ce système est l'application de faible viscosité. L'obtention de billes sphériques n'est possible que dans des gammes de faible viscosité ⁽¹⁵⁶⁾.

2.2.1.2.4 Production des gouttelettes par jet laminaire

Dans ce système, la suspension cellulaire s'écoule d'une aiguille en un jet coupé par un fil ou en disque en rotation tournant à grande vitesse ⁽¹⁶²⁾.

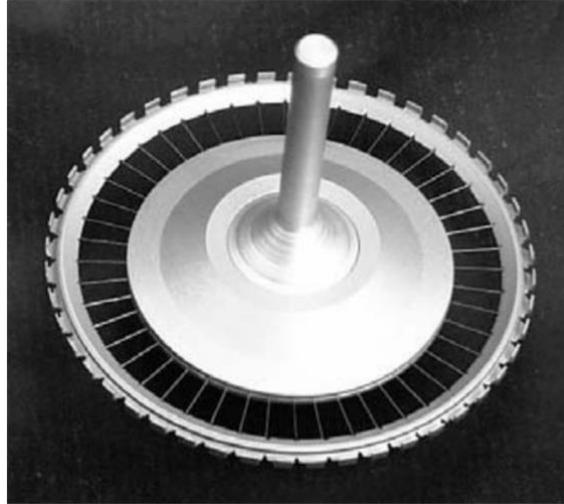


Figure 14. Photo d'un disque avec 48 fils en acier inoxydable ⁽¹⁶²⁾.

La viscosité de la suspension a un rôle important sur la géométrie des billes formées ⁽¹⁵⁶⁾ :

- faible viscosité : billes peu sphériques
- viscosité intermédiaire : billes sphériques
- forte viscosité : billes de forme ovale.

Cette technologie est adéquate pour de grands débits. Le débit de production est environ 200 à 500 fois plus élevé qu'avec les technologies de flux air coaxial ou de différence de potentiel, la différence est encore plus marquée à forte viscosité ⁽¹⁵⁶⁾.

2.2.1.2.5 Production des gouttelettes par co-extrusion à l'aide d'un liquide non miscible

Cette méthode dans son principe est similaire au système par jet d'air coaxial, à la différence que l'air utilisé pour détacher la gouttelette est ici remplacé par une solution d'un liquide non miscible (ex. paraffine liquide). La solution de polymère est poussée du tuyau interne du double tube concentrique, tandis que la solution non miscible s'écoule de la partie externe, enveloppant la gouttelette en formation ⁽¹⁶³⁾.

Sakai et son équipe ont utilisé ce système pour la production de microcapsules d'agarose. En diminuant le débit de la solution d'agarose et en augmentant celui de la solution de paraffine, ces derniers ont réussi à obtenir des microcapsules de très faible diamètre ($< 100 \mu\text{m}$) ⁽¹⁶³⁾.

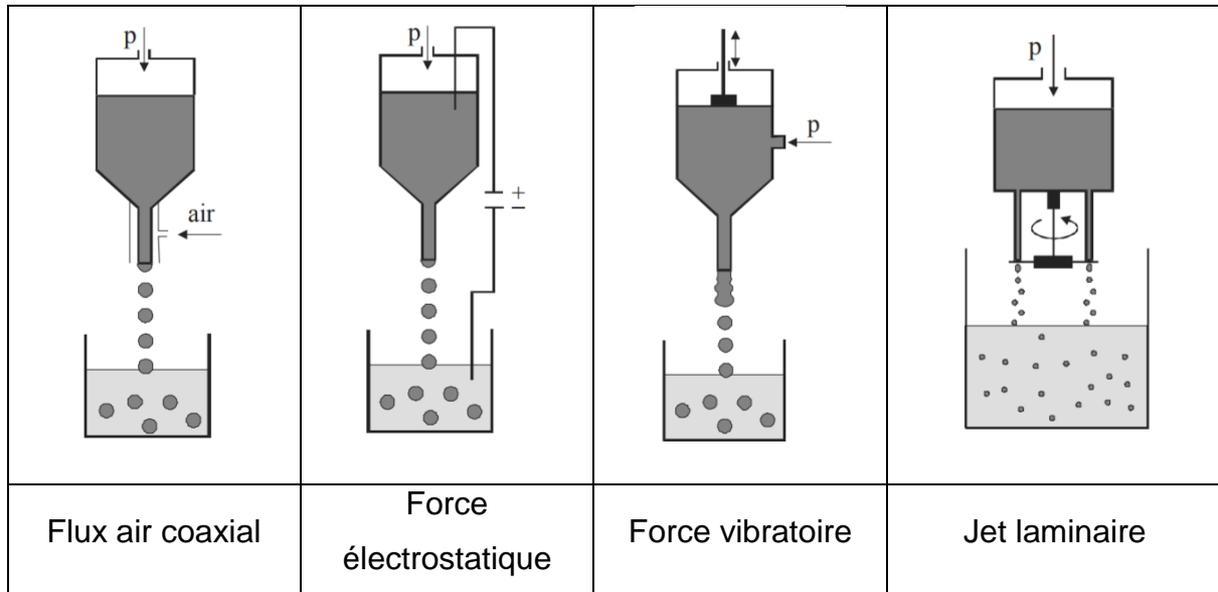


Figure 15. Représentation schématique des procédés de production des gouttelettes d'une suspension cellulaire ⁽¹⁵⁶⁾.

2.2.1.3 Stabilisation des gouttelettes formées

Une fois les gouttes liquides formées, il est nécessaire de créer une membrane à leur surface afin de maintenir l'intégrité physique de la capsule préformée et ainsi immobiliser et protéger les îlots de Langerhans à l'intérieur de cette dernière. De nombreuses techniques existent, ces dernières varient en fonction du type de polymère utilisé, les plus couramment utilisées sont décrites ci-dessous.

2.2.1.3.1 Gélification (ionique ou thermique)

Une grande variété de méthodes d'encapsulation utilise la propriété qu'ont certains polymères de pouvoir former un gel. La gélification peut se faire de deux façons principalement : par l'ajout d'un ion (cas des solutions d'alginate) ou par modification de la température (cas de l'agarose).

La gélification ionique est basée sur la capacité d'un polyélectrolyte d'être réticulé en présence de contre ions pour former un gel. Les solutions d'alginate (caractère anionique) gélifient en présence d'ions divalents (ex. ions de calcium ou baryum). Les polymères non réticulés sont tout d'abord dissous dans de l'eau. L'obtention de billes d'alginate par gélification ionique peut être réalisée par simple chute d'une gouttelette d'alginate de sodium dans une solution aqueuse contenant les contres ions (ex. CaCl_2 ou BaCl_2). La réticulation de l'alginate et donc la formation du gel se forme dès la mise en contact avec la solution, ce qui favorise la formation de billes de forme sphériques (99,164).

Le choix du type d'alginate (variations de la composition et/ou de la séquence des monomères d'acide mannuronique et d'acide guluronique) et de l'ion utilisé peut influencer les propriétés du gel formé, comme sa résistance mécanique ou encore sa perméabilité (110).

Le processus de gélification (les interactions entre les chaînes d'alginate et les cations divalents) est couramment décrit selon le modèle dit « egg box » ou « boîte à œufs ». Les expérimentations menées par Sikorski ont permis de confirmer ce modèle par cristallographie aux rayons X (165).

Selon ce modèle, deux unités G de deux chaînes d'alginate différentes se lient au même cation divalent afin de former une jonction. La formation d'une zone de jonction entre les chaînes alginate, via le contre-ion calcium par exemple, aboutit de proche en proche à la formation d'un hydrogel. Dans le cas du calcium, la formation d'une jonction stable requiert un minimum de 8 à 20 unités G consécutives (165).

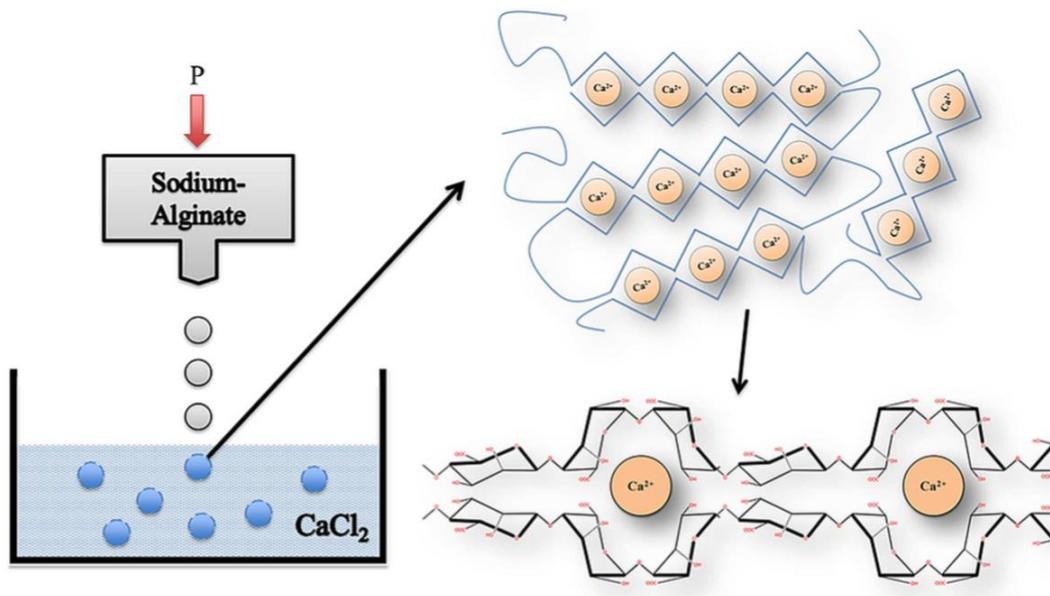


Figure 16. Le modèle dit « boîte à œufs » ⁽¹⁶⁵⁾.

Dans le cas de l'agarose, la gélification des gouttelettes est formée par un changement de température (refroidissement). La solution d'agarose préparée à une température corporelle (37°C) est dispersée en gouttelettes dans un liquide non miscible dont la température est progressivement abaissée. La gélification des gouttelettes est alors obtenue lorsque la température de la solution est inférieure à 30°C ⁽¹⁴¹⁾.

2.2.1.3.2 Polymérisation

2.2.1.3.3 Polymérisation interfaciale

La gélification des polymères est parfois insuffisante pour assurer une immunoprotection efficace des îlots de Langerhans. Une réaction de polymérisation interfaciale peut alors être utilisée en complément. Cette méthode consiste à faire interagir entre eux des polyélectrolytes chargés négativement (cas de l'alginate) et des polyélectrolytes chargés positivement via des interactions électrostatiques. Les polycations pouvant interagir avec l'hydrogel peuvent être de différents types, les plus couramment utilisés sont la PLL ⁽¹⁰²⁾ ou encore la PLO ⁽¹³⁵⁾.

Le principe de base consiste à mettre les billes d'hydrogel préalablement formées à l'aide de polymères chargés négativement (ex. alginate) dans une solution comprenant un second polymère de charge opposée (ex. PLL), capable de réagir de façon covalente avec le premier. Il se forme ainsi une membrane de porosité réduite à la surface des billes ⁽¹⁰²⁾.

Toutefois, l'ajout de charges cationiques à la surface des microcapsules présentent des caractéristiques défavorables en termes de biocompatibilité. Les charges positives tendent à faciliter l'adsorption protéique et l'adhésion cellulaire. C'est pourquoi très souvent afin de neutraliser ou d'équilibrer les charges libres à la surface des microcapsules, ces dernières sont immergées dans une solution polyanionique biocompatible (ex. alginate dilué) qui se lie électrostatiquement à la membrane ⁽¹⁰²⁾.

2.2.1.3.4 Photopolymérisation

La photopolymérisation est une méthode de polymérisation qui s'applique à des composés sensibles à des rayonnements, en faisant intervenir un agent photosensibilisant. Cette technique est principalement utilisée dans la fabrication des microcapsules à base de PEG.

La photopolymérisation est initiée par un ou des photoinitiateurs (ex. Eosine) qui sous l'action de la lumière vont se transformer en radicaux libres capables d'initier la réaction de polymérisation. Ces photoinitiateurs sont adsorbés soit à la surface des microcapsules d'alginate préformées ⁽¹⁶⁶⁾, soit directement à la surface des îlots de Langerhans ⁽¹²¹⁾. Les îlots de Langerhans ou les microcapsules sont ensuite mis(es) en suspension dans une solution contenant du PEG. La polymérisation est induite par irradiation des îlots de Langerhans pour former une couche de gel de PEG directement à la surface des îlots de Langerhans ou de la microcapsule ⁽¹²¹⁾.

2.2.1.3.5 Coacervation

La coacervation consiste à provoquer la précipitation d'un polymère ou de plusieurs polymères par séparation de phase suite à un changement de température, de pH ou de composition (exemple ajout d'un non-solvant). On distingue la coacervation simple, désolvation d'un seul polymère, de la coacervation complexe, désolvation simultanée de deux polymères.

En thérapie cellulaire, la coacervation complexe est utilisée pour produire des microcapsules à base d'alginate et de chitosan ⁽¹⁶⁷⁾.

La coacervation complexe consiste à faire précipiter simultanément deux polyélectrolytes de charges opposées en abaissant leur solubilité le plus souvent en modifiant le pH du milieu réactionnel. Cette méthode conduit à la création d'un complexe de solubilité réduite et donc qui précipite.

Les billes d'alginate (chargées négativement) renfermant les îlots de Langerhans sont dispersées dans une solution de chitosan (chargée positivement). En acidifiant le milieu (pH 6), les deux polymères s'agrègent ensemble par interaction électrostatique et forme une membrane qui encapsule les îlots de Langerhans ⁽¹⁶⁷⁾.

En conclusion de cette partie, bien que les systèmes macroscopiques soient les systèmes de productions les plus utilisés actuellement, ces derniers présentent toutefois quelques limitations pour l'encapsulation des îlots de Langerhans :

- la taille des capsules formées est fixe alors que la dimension des îlots de Langerhans peut varier ;
- la viscosité doit être limitée pour ne pas influencer négativement la sphéricité et/ou la taille des capsules formées;
- la gélification des capsules se fait le plus souvent par gélification externe, les capsules sont gélifiées en tombant dans un bain gélifiant :
 - o avec l'impact, les capsules obtenues ne sont pas toujours sphériques; des bulles d'air peuvent se créer au cours de l'impact et rester encapsulées; les îlots de Langerhans peuvent être déplacés vers la périphérie avec un risque de protrusion augmenté ⁽¹⁶⁸⁾;
 - o hétérogénéité du temps de gélification entre la première et la dernière goutte.

Ainsi, le manque de reproductibilité et d'automatisation des procédés d'encapsulation macroscopiques peuvent potentiellement être une cause de variation des résultats entre les laboratoires. C'est pourquoi, depuis quelques années, se développent des méthodes alternatives : les méthodes microfluidiques.

2.2.2 Systèmes microfluidiques

La microfluidique est un domaine des sciences et technologies portant sur l'écoulement des fluides et leur mise en œuvre dans des réseaux de canaux à l'échelle micrométrique ⁽¹⁶⁹⁾. Il s'agit d'une thématique jeune qui a réellement émergé en tant que discipline dans les années 2000. Ce domaine de recherche est aujourd'hui en plein essor et couvre une multitude d'applications telles que la médecine, l'environnement ou encore la chimie.

L'application des systèmes microfluidiques en thérapie cellulaire et plus particulièrement à l'encapsulation de cellules est l'un des principaux axes de développement.

La production des microcapsules par système microfluidique requiert deux étapes critiques : la formation contrôlée des gouttelettes et la stabilisation de ces dernières :

2.2.2.1 Formation de gouttelettes

La microfluidique en flux continu est la principale technique utilisée pour la production des capsules pour l'encapsulation des îlots de Langerhans ⁽¹⁶⁹⁾.

Le principe consiste à injecter une première phase contenant les îlots de Langerhans en suspension (phase dite dispersée) dans une seconde phase non miscible (phase dispersante, le plus souvent de l'huile) pour former une émulsion ⁽¹⁷⁰⁾. Diverses géométries ont été développées pour permettre la production des gouttelettes, dont deux sont reprises ci-dessous :

- **microsystème dit jonction T:**

Cette géométrie a été initiée par Thorsen et son équipe en 2001 ⁽¹⁷¹⁾. La phase dispersée arrive dans un canal perpendiculaire à la phase dispersante (Figure 17). La pression dans la phase dispersée induit une élongation de cette dernière dans le canal de la phase dispersante. La compétition entre la tension de surface et la contrainte de cisaillement conduit à la formation de gouttelettes. En fonction du débit des deux fluides, la taille des gouttes varie ^(170,171).

- **microsystème coaxial:**

Ce système repose sur l'alignement d'un capillaire dans un canal fluide coaxial. La phase dispersée évolue dans le capillaire et la phase dispersante dans le canal suivant la même direction (Figure 17). Le cisaillement s'effectue au niveau de la fin du capillaire créant ainsi la formation des gouttelettes ⁽¹⁷⁰⁾.

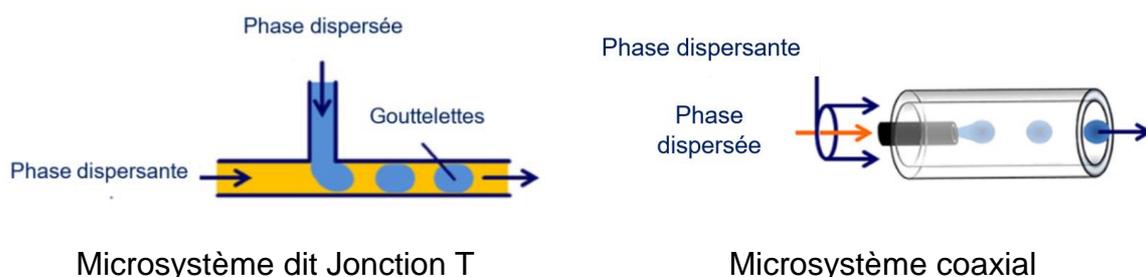


Figure 17. Représentation schématique de la formation de gouttelettes dans des systèmes microfluidiques de géométries différentes ⁽¹⁷⁰⁾.

2.2.2.2 Stabilisation des gouttelettes formées

Comme vu précédemment avec les systèmes macroscopiques, il existe plusieurs méthodes pour gélifier les gouttelettes obtenues en fonction du type de polymère utilisé. Les procédés de gélification utilisés en microfluidiques sont :

- la gélification dans un bain externe : même principe que pour les systèmes macroscopiques ;
- la gélification dans une instrumentalisation externe. Il est possible d'ajouter au microsystème une instrumentalisation externe, exemple lorsque le polymère est réticulé par photopolymérisation ⁽¹⁷²⁾ ;
- la gélification intégrée dans le microsystème. Il s'agit le plus souvent de gélification ionique. Plusieurs méthodes sont possibles, par coalescence ⁽¹⁷³⁾ ou encore par gélification externe dans l'huile. Dans le second cas, la méthode consiste à gélifier les gouttes lorsqu'elles sont encore dans le flux d'huile. Pour cela un agent gélifiant, exemple du calcium sous forme CaCl_2 est introduit dans la phase continue. Le calcium se solubilise au contact de la goutte d'alginate et entraîne la gélification de cette dernière ^(174,175).

La microfluidique offre de multitudes possibilités pour la manipulation de goutte en flux. Ces systèmes offrent une grande liberté de taille (de 50 à 400 μm). Les gouttelettes obtenues sont monodisperses et la cadence de production est élevée ⁽¹⁷⁰⁾.

Ces techniques appliquées à l'encapsulation des îlots de Langerhans pourraient apporter des solutions intéressantes telles que :

- l'encapsulation d'une seule cellule par capsule ⁽¹⁷⁶⁾ ;
- la réalisation d'un tri avant le procédé d'encapsulation des îlots de Langerhans pour adapter la taille de la microcapsule à la taille des îlots de Langerhans ;
- la réalisation d'un tri après le procédé d'encapsulation par acoustophorèse pour séparer les capsules vides des capsules pleines et ainsi limiter le volume d'implantation ⁽¹⁷⁷⁾ ;
- la possibilité de combiner plusieurs modules pour permettre une automatisation et standardisation complète du procédé d'encapsulation et préparer des capsules de façon reproductible ⁽¹⁷⁸⁾.

La microfluidique est une technologie prometteuse qui permet de multiples possibilités d'applications. Cependant, son coût et sa complexité d'utilisation restent un frein à son utilisation massive. La plupart des prototypes relatifs à l'encapsulation des îlots de Langerhans restent à l'état de recherche avec une viabilité des îlots de Langerhans *in vivo* qui reste à démontrer.

2.3 Site de transplantation

Le site de transplantation doit répondre à un certain nombre de critères ⁽¹³⁰⁾ :

- être suffisamment volumineux pour accueillir le transplant ;
- être hautement vascularisé pour permettre un apport en oxygène suffisant aux îlots de Langerhans ;
- permettre une transplantation simple et sûre des îlots de Langerhans tout en autorisant leur extraction en cas de besoin;
- exposer les îlots de Langerhans à une réaction inflammatoire minimale et garantir leur survie à long terme.

La cavité péritonéale reste le site d'implantation des îlots de Langerhans microencapsulés le plus approprié ⁽¹³⁰⁾. En raison du grand volume de la greffe, le péritoine est un des seuls sites assez volumineux pour accueillir les microcapsules. Toutefois, ça ne fait pas de lui un site idéal car étant peu vascularisé, les îlots de Langerhans ne sont pas en contact direct avec les vaisseaux. De plus, il présente une immunogénicité élevée ^(130,179).

Plusieurs autres sites ont été proposés. Les plus étudiés sont l'omentum ^(180,181), la capsule rénale ⁽¹⁸²⁾ et le tissu sous cutané ⁽¹⁸³⁾. Pour le moment ces sites n'ont pas permis d'obtenir une efficacité supérieure par rapport au site de référence, le péritoine.

La transplantation des îlots de Langerhans microencapsulés requiert un acte chirurgical peu invasif. Après une légère incision de la paroi abdominale, les îlots de Langerhans microencapsulés préalablement mis en suspension dans du sérum physiologique (volume total final = environ 100 ml) sont infusés via un cathéter dans la cavité péritonéale. Cette opération se fait sous contrôle échographique et sous anesthésie locale ^(184,185).

3 Résultats des études *in vivo*

La première application *in vivo* d'îlots de Langerhans microencapsulés a été réalisée par Lim et Sun dans les années 1980 ⁽¹³²⁾. Ils ont réalisé une allogreffe d'îlots de Langerhans immunoprotégés dans des microcapsules à base d'alginate et de PLL chez des rats présentant un diabète induit par streptozotocine (produit chimique utilisé pour détruire les îlots de Langerhans via le transporteur de glucose GLUT2). Les résultats obtenus ont permis de corriger le diabète pendant 2 à 3 semaines ⁽¹³²⁾.

A la suite de cette étude, les chercheurs ont multiplié les études *in vivo* chez l'animal. On recense dans la littérature des centaines de publications d'allogreffes et de xénogreffes d'îlots de Langerhans microencapsulés chez les rongeurs, les chiens ou encore les singes. Les résultats varient considérablement en fonction des équipes. Les résultats discordants tiennent aux différences qui peuvent exister entre le modèle animal choisi, le nombre d'îlots de Langerhans encapsulés, la composition des microcapsules ou encore les techniques de microencapsulation utilisées.

Malgré la multitude d'essais *in vivo* pratiqués sur les modèles animaux, les études cliniques restent limitées à l'heure d'aujourd'hui.

Les premiers essais cliniques ont été conduits par Soon Shiong et son équipe en 1994 ^(186,187). Ils ont porté sur un patient de sexe masculin, âgé de 38 ans, souffrant de diabète de type 1 depuis plus de 30 ans et présentant des complications sévères ayant nécessité le recours à une greffe de rein. Les essais ont consisté en l'implantation intrapéritonéale d'îlots de Langerhans humains dans des microcapsules à base d'alginate et de PLL. Deux injections ont été pratiquées: 10 000 IEQ/kg puis 5 000 IEQ/kg ont été injectés respectivement à T0 et T7 mois. Au cours de l'expérience, l'insulino-indépendance a pu être acquise deux mois après la seconde injection pour une période de trente jours sans administration d'insuline. Une insulinothérapie à faible dose a ensuite été réinstaurée progressivement le mois suivant et durant le reste de l'étude. Malgré une insulino-indépendance partielle, l'étude a permis de mettre en avant une amélioration significative de la qualité de vie du patient et l'absence d'effets indésirables majeurs.

Depuis, plusieurs études cliniques ont été réalisées (Tableau 3) :

Calafiore et son équipe ont mené une étude clinique sur quatre patients présentant un diabète de type 1 ancien et traité par insulinothérapie intensive. Les îlots de Langerhans humains (5000 à 15 000 IEQ/kg) encapsulés dans des microcapsules

d'alginate et de PLO ont été implantés dans la cavité péritonéale des patients sans traitement immunosuppresseur. Quelques semaines après la transplantation, les patients ont présenté une élévation des taux sériques de peptide C. L'étude a aussi reporté ^(184,188,189) :

- une diminution de l'HbA1c ;
- une baisse de la consommation journalière d'insuline exogène et une insulino-indépendance observée de manière transitoire chez un patient ;
- une disparition des épisodes hypoglycémiques graves ;
- aucune induction d'auto-anticorps anti HLA de classe I ou II.

Dans une autre étude clinique de phase I dirigée par Tuch et son équipe ⁽¹⁴⁰⁾, quatre patients atteints de diabète de type 1 ont reçu une transplantation intrapéritonéale d'îlots de Langerhans (178 000 IEQ par infusion) dans des microcapsules d'alginate et de baryum selon le schéma suivant :

- patient 1 : quatre infusions (soit un total de 712 000 IEQ) sur sept mois ;
- patient 2 : deux infusions (soit un total de 356 000 IEQ) à dix mois d'intervalle ;
- patients 3 et 4 : une infusion chacun.

Les patients n'ont pas eu recours à un traitement immunosuppresseur. Ils ont, toutefois, reçu un traitement anti-inflammatoire et anti-oxydant dans la période immédiate de post transplantation.

Le premier jour après la transplantation, le peptide C était détecté dans les urines chez tous les patients. Les niveaux de peptide C ont diminué progressivement jusqu'à devenir indétectables au bout d'une à quatre semaines chez les patients 2, 3 et 4.

Chez le patient 1 ayant reçu quatre infusions espacées dans le temps, le peptide C était encore détectable 2,5 ans après la greffe. Cependant, la petite quantité d'insuline produite n'a permis de diminuer, ni la glycémie, ni les besoins en insuline exogène.

Pour l'ensemble des patients, une diminution du taux de glucose sanguin et des apports en insuline exogène a été observée le premier jour post transplantation, mais plus les jours suivants.

Contrairement à l'étude de Calafiore, des auto-anticorps anti GAD ont été détectés chez trois patients.

Même si un réel bénéfice clinique n'a pas pu être démontré dans cette étude, cette dernière a permis de mettre en avant que la transplantation de microcapsules à base d'alginate et de baryum était sûre et sans effets secondaires majeurs.

Plus récemment, Jacobs-Tulleneers-Thevissen et son équipe ont publié une étude portant sur des microcapsules d'alginate et de $\text{Ca}^{2+}/\text{Ba}^{2+}$ ⁽¹⁹⁰⁾. Les îlots de Langerhans humains (300 000 IEQ) encapsulés dans ces microcapsules ont été injectés dans la cavité péritonéale d'une femme diabétique de 61 ans. La patiente était sous traitement immunosuppresseur suite à une greffe antérieure d'îlots de Langerhans non encapsulés reçue 5 ans plus tôt. Malgré une augmentation des taux plasmatiques de peptide C au cours des douze premières semaines, les besoins en insuline exogène sont restés inchangés. Au cours du suivi post greffe, aucun auto-anticorps cytotoxiques n'a été induit.

La récupération des microcapsules par laparoscopie réalisée dans la plupart des études cliniques, met en avant quelques microcapsules dispersées dans la cavité péritonéale. Mais la majorité des microcapsules sont retrouvées agglomérées entre elles au niveau de la paroi péritonéale, de la rate, de l'omentum ou encore du rein. Ces amas sont le plus souvent recouverts de tissu fibrotique. La biopsie des microcapsules montre qu'elles sont intactes. Toutefois, les îlots de Langerhans qu'elles comprennent sont non viables ⁽¹³⁰⁾.

En conclusion de cette partie, la transplantation d'îlots de Langerhans humains encapsulés permet la détection de petite quantité de peptide C dans la période immédiate de post transplantation. Cependant, pour le moment, l'indépendance de l'insuline ou la réduction significative des doses d'insuline est rare. A long terme, la greffe échoue. Les raisons de l'échec de la greffe ne sont pas clairement définies. Elles sont attribuées comme étant dues à plusieurs facteurs :

- un manque de biocompatibilité des microcapsules responsable d'inflammation chronique et conduisant à la formation de fibrose péri capsulaire ;
- une inflammation aiguë induite par l'acte chirurgical suite à la procédure d'implantation des îlots de Langerhans ;
- une immunoprotection incomplète des îlots de Langerhans;

- une distance trop importante entre les îlots de Langerhans et le réseau sanguin responsable de l'hypoxie des îlots de Langerhans.

La poursuite des essais cliniques est indispensable pour améliorer les dispositifs d'encapsulation afin qu'ils puissent assurer leur fonction d'immunoprotection sur le long terme.

Tableau 3. Résumé des études cliniques réalisées dans le monde.

Etudes	Type de micro-capsule	Quantité d'îlots de Langerhans transplantés	Site de transplantation	Nombre de patient	Résultats et remarques	Références
Equipe Soon Shiong – 1994	Alginate – PLL	2 injections : 1 ^{ère} à T0 :10 000 IEQ/kg 2 ^{nde} à T+7mois: 5 000 IEQ/kg	Intrapéritonéal	1 patient	Insulino-indépendance acquise pendant 30 jours. Ré instauration d'une insulinothérapie à faible dose durant le reste de l'étude et maintien d'une glycémie stable. Qualité de vie du patient améliorée. Absence d'effets indésirables.	(186,187)
Equipe Calafiore - 2006 Equipe Basta - 2011	Alginate – PLO	5 à 15 000 IEQ/kg	Intrapéritonéal	4 patients	Insulino-indépendance observée de manière transitoire chez l'un des patients. Diminution de l'HbA1c. Diminution des apports exogènes d'insuline. Episodes d'hypoglycémie grave disparus.	(184,188,189)
Equipe Tuch - 2009	Alginate – Baryum	178 000 IEQ / infusion	Intrapéritonéal	4 patients	Diminution du taux de glucose sanguin et des apports en insuline exogène observée le premier jour post transplantation, mais plus les jours suivants. Peptide C détectable 2,5 ans après la greffe chez un patient.	(140)
Equipe Tulleneers-Thevissen - 2013	Alginate - Ca ²⁺ /Ba ²⁺	300 000 IEQ	Intrapéritonéal	1 patient	Pas de modification des apports en insuline exogène.	(190)

III. Perspectives

La microencapsulation des îlots de Langerhans possède un énorme potentiel permettant petit à petit de se diriger vers le développement d'un traitement contre le diabète de type 1. Toutefois, la technique se heurte encore à certaines limites. Parmi elles, nous pouvons citer la faible disponibilité des ressources en îlots de Langerhans humains. Face à ce constat, les chercheurs se sont tournés vers des sources alternatives de cellules, telles que les îlots porcins ou encore les cellules souches.

Une autre limitation à la transplantation d'îlots de Langerhans encapsulés est l'hypoxie. Plusieurs stratégies ont vu le jour au cours de ces dernières années afin de promouvoir l'oxygénation et la viabilité des îlots de Langerhans dont certaines sont reprises dans le paragraphe ci-dessous.

Deux principaux facteurs sont à l'origine de l'hypoxie :

- ***le processus d'isolement des îlots de Langerhans :***

Au cours du processus d'isolement des îlots de Langerhans, la digestion enzymatique du pancréas détruit l'environnement trophique, la matrice extracellulaire, mais aussi les vaisseaux sanguins. Ces changements structuraux soumettent les îlots de Langerhans à un manque d'oxygène et de nutriments dans la période immédiate de post transplantation ^(191,192).

- ***la microcapsule elle-même :***

L'oxygénation des îlots de Langerhans microencapsulés ne peut se faire que par diffusion à travers les pores de la membrane. Des études ont démontré que l'hypoxie avait des effets néfastes sur la fonction (capacité des îlots de Langerhans à produire de l'insuline) et la viabilité des îlots de Langerhans ^(108,121).

Afin de minimiser les dommages causés aux îlots de Langerhans par une hypoxie prolongée et permettre une fonction optimum du tissu transplanté, la revascularisation doit être rapide.

Plusieurs stratégies ont été mises en place pour promouvoir la croissance et le développement d'une microvascularisation autour du système transplanté :

1 Agrégats

L'oxygénation des îlots de Langerhans encapsulés dépend uniquement de la diffusion d'oxygène à travers les pores de la microcapsule. Plus la microcapsule est grande,

plus la distance que l'oxygène a à parcourir du vaisseau sanguin jusqu'au centre des îlots de Langerhans est grande. Par conséquent, moins les îlots de Langerhans recevront de l'oxygène et plus ils seront exposés à l'hypoxie.

Quelques études ont mis en évidence que plus les îlots de Langerhans sont petits, plus ils sont résistants à l'hypoxie. Diminuer la taille des îlots de Langerhans permet à l'oxygène de mieux diffuser et d'atteindre toutes les cellules ^(193,194).

La méthode la plus simple pour former des agrégats consiste à ⁽¹⁹⁵⁾:

- dissocier les îlots de Langerhans en cellules simples à l'aide de trypsine et d'EDTA ;
- incuber ces cellules dans un pétri de polystyrène et les laisser s'agréger pendant 6 jours.

Des études ont été menées sur des agrégats de cellules dispersées d'îlots de Langerhans. Lorsque les îlots de Langerhans sont dispersés en cellules simples, celles-ci ont la propriété de se ré-associer en une structure semblable à celle des îlots de Langerhans tout en étant de plus petite taille ⁽¹⁹⁵⁾. Les agrégats ont une organisation cellulaire similaire à celles des îlots de Langerhans. Ces derniers sont capables de sécréter de l'insuline en réponse au glucose comme les îlots de Langerhans, de façon biphasique et proportionnellement à la concentration de glucose ⁽¹⁹⁵⁾.

Il a été démontré que les agrégats encapsulés (40 – 50 µm) contenaient très peu de centres de nécrose comparativement aux îlots de Langerhans encapsulés (100 – 200 µm) *in vitro* et *in vivo* ^(179,196). La survie des îlots de Langerhans est donc améliorée en formant des agrégats.

2 Utilisation de facteurs pro-angiogéniques

A la différence d'une transplantation d'organe entier où les greffons sont implantés en tant que tissus vascularisés, les îlots de Langerhans transplantés sont des structures isolées de tout système vasculaire. La survie et la fonctionnalité des îlots de Langerhans nouvellement transplantés dépendent donc uniquement de la réorganisation de nouveaux vaisseaux pour fournir au greffon l'oxygène et les nutriments indispensables à sa survie ⁽⁹⁹⁾.

Des études préliminaires ont montré que l'utilisation d'agent pro-angiogéniques exerce un rôle primordial dans la revascularisation des îlots de Langerhans transplantés via la néo-vascularisation (formation de nouveaux vaisseaux à partir d'un réseau capillaire

préexistant)⁽¹⁹⁷⁾. Parmi les divers facteurs angiogéniques, la famille la plus étudiée est celle du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire ou VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Le VEGF a un fort pouvoir angiogénique *in vivo*. Il augmente la perméabilité vasculaire ce qui permet l'extravasation des protéines du plasma et la formation d'une matrice extracellulaire favorable à la migration des cellules endothéliales et stromales^(197,198).

Sigrist et son équipe ont montré que la co-encapsulation de VEGF avec des îlots de Langerhans de rat dans les microcapsules augmentait de façon significative la viabilité des îlots de Langerhans transplantés et permettait une normoglycémie prolongée chez les souris diabétiques⁽¹⁹⁹⁾.

En plus de son rôle important comme stimulateur de l'angiogenèse, le VEGF exerce également un effet inhibiteur sur l'apoptose cellulaire^(199–201).

Ainsi, l'apport local de VEGF au site de transplantation des îlots de Langerhans peut être envisagé comme une stratégie pour optimiser la revascularisation des îlots de Langerhans. Toutefois une des principales limites à cette approche est la courte durée de vie du VEGF qui ne permet pas une action sur le long terme.

3 Revêtement conforme

Les procédés de fabrication classiques génèrent des capsules de taille identique (diamètre constant) quel que soit la taille des îlots de Langerhans. Or, nous savons que les îlots de Langerhans sont généralement de taille variable. La technique du revêtement conforme prend en compte cette considération et adapte la taille des capsules à la taille des îlots de Langerhans à encapsuler. Ainsi, ce procédé minimise le volume vide entre les cellules encapsulées et l'extérieur de la microcapsule. La barrière immunoprotectrice est directement en contact avec la masse cellulaire en épousant les contours de celle-ci (Figure 18). Cette méthode permet de générer des microcapsules de très petites tailles, comparables à celles des cellules non encapsulées.

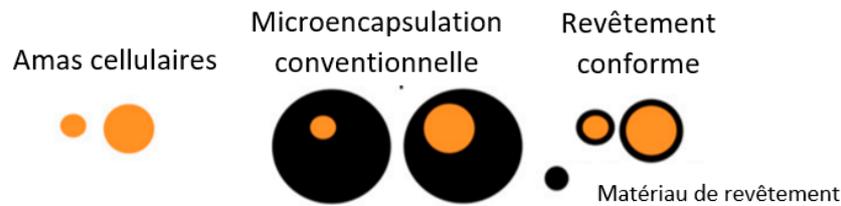


Figure 18. Revêtement conforme versus microencapsulation conventionnelle des îlots de Langerhans.

Cette approche comporte plusieurs avantages ⁽¹²¹⁾:

- optimiser la capacité d'encapsulation (un grand nombre de cellules dans un plus petit volume) ;
- améliorer les propriétés de diffusion des nutriments, de l'oxygène, des métabolites ;
- assurer la libération rapide de l'insuline.

Cependant, ce système présente un inconvénient. Cette méthode ne permet pas la néogénèse des cellules, alors que celle-ci peut se faire à l'intérieure des microcapsules classiques.

La technique du revêtement conforme est rendue possible grâce aux développements des systèmes microfluidiques ⁽¹⁷⁰⁾.

Les principaux matériaux utilisés pour ce type de technique sont des matériaux synthétiques tels que les PEG. Les PEG sont directement fixés à la membrane des cellules par photopolymérisation interfaciale ^(121,130).

Des résultats encourageants ont été obtenus chez l'homme bien que l'insulino-indépendance n'ait pas encore été acquise de manière définitive ⁽¹⁵²⁾. Les propriétés immunoprotectrices de ce type de membrane ainsi que leur stabilité à long terme restent toutefois à confirmer par le biais d'études *in vivo* supplémentaires.

4 Alternatives aux îlots de Langerhans humains

De nombreuses études sont en cours pour trouver des alternatives aux îlots de Langerhans cadavériques, comme les îlots porcins ou les cellules souches. Ces cellules ont l'avantage de pouvoir être produites en grande quantité et pourraient ainsi contrer le manque de donneurs.

4.1 Les xénogreffes

La transplantation d'îlots d'origine animale et tout particulièrement d'îlots porcins présentent de nombreux avantages :

- ces cellules ont la possibilité d'être modifiées génétiquement pour limiter la réponse immunitaire et/ou inflammatoire, prolonger leur survie et améliorer leur fonction sécrétoire ^(199,200) ;
- elles représentent une source presque illimitée d'îlots.

Au vu de ses similarités physiologiques et anatomiques avec les êtres humains, le porc est actuellement le candidat le plus approprié pour fournir des cellules xénogéniques ⁽²⁰²⁾.

L'insuline porcine est très proche de l'insuline humaine, elle ne diffère que d'un acide aminé ⁽²⁰³⁾.

Cependant d'un point de vue fonctionnel, des différences subsistent. Les îlots de Langerhans porcins sécrètent moins d'insuline que ceux humains. C'est la raison pour laquelle il est nécessaire de transplanter un plus grand nombre d'îlots de Langerhans porcins pour produire une quantité d'insuline suffisante à la régulation de la glycémie ⁽²⁰⁴⁾. Au cours de ces dernières années, de nombreux modèles de porcs transgéniques ont donc été développés afin d'améliorer leur fonction sécrétoire. Mourad et son équipe ont démontré que l'expression transgénique du glucagon-like peptide 1 (GLP-1) associée à une activation constitutive du récepteur muscarinique de type 3 (M3R) permettait de multiplier par quatre la sécrétion d'insuline ⁽²⁰⁴⁾.

La principale crainte face à la xénogreffe est le risque de transmission de maladies infectieuses (zoonose, rétrovirus). Toutefois, ce risque est en cours de réévaluation car aucune preuve d'infection n'a été trouvée dans plusieurs études précliniques et cliniques ⁽²⁰⁵⁾.

Les premiers essais cliniques de xénotransplantation ont été conduits dans les années 1990 ⁽²⁰⁶⁾. Depuis, plusieurs autres essais cliniques de xénotransplantation ont été menés ⁽²⁰⁷⁾.

Une étude récente menée par Matsumoto et son équipe sur huit patients xénotransplantés ont mis en évidence des résultats encourageants : la xénotransplantation d'îlots porcins néonataux encapsulés a permis de maintenir une Hb1Ac < 7% et de réduire significativement les hypoglycémies sans

immunosuppression et ce sur une durée supérieure à 600 jours. Cette étude pourrait être le prologue de la xénotransplantation clinique pour résoudre le problème de la pénurie de donneurs ⁽²⁰⁸⁾.

4.2 La thérapie cellulaire

La thérapie cellulaire offre la possibilité de remplacer les îlots de Langerhans déficients par de nouvelles cellules insulino-sécrétantes dérivées des cellules souches pluripotentes.

Plusieurs types de cellules souches pluripotentes sont à distinguer. Les principales utilisées dans le traitement du diabète de type 1 sont les cellules souches embryonnaires (CSE) et les cellules stromales mésenchymateuses (CSM).

Le potentiel des cellules souches pour la thérapie cellulaire du diabète est multiple :

- disponibilité à large échelle ;
- capacité de différenciation *in vitro* et *in vivo* ;
- capacité de prolifération à l'infini.

Le domaine des CSE a connu un essor important après la publication en 2006 des travaux de l'équipe de ViaCyte, une compagnie localisée à San Diego aux Etats Unis et spécialisée dans le développement de thérapies pour le diabète. Dans cette publication, Viacyte y décrit un procédé de production de progéniteurs pancréatiques dérivés de CSE humaines capables de se différencier en cellules bêta fonctionnelles *in vivo* chez des souris. Les souris traitées par la streptozotocine maintenaient des taux glycémiques normaux grâce à la sécrétion d'insuline humaine active par les greffons de CSE différenciées ^(96,209).

Depuis, le champ d'application des CSE s'est largement élargi. En 2014, deux études ont démontré les capacités des CSE à acquérir des caractéristiques matures de cellules bêta *in vitro* :

- L'équipe de Kieffer, à Vancouver, a abouti à la production *ex vivo* en quarante jours de cellules endocrines capable d'exprimer toutes les caractéristiques de cellules bêta excepté le processus calcium-dépendant de sécrétion d'insuline. Ces cellules bêta, dérivées des CSE humaines, ont réussi à inverser le diabète de souris, deux mois après leur transplantation via la sécrétion d'insuline en réponse au glucose ⁽²¹⁰⁾.

- L'équipe de Melton a, quant à elle, obtenu des cellules bêta complètes sur les plans phénotypique et fonctionnel. Une fois différenciées, ces cellules étaient capables de produire des quantités physiologiques d'insuline sous stimulus glucosé. Dans cette même étude, l'insuline humaine a été détectée dans le sérum des souris seulement deux semaines après la transplantation des CSE (211).

Parallèlement à ces études précliniques, ViaCyte a débuté une étude clinique de phase I/IIa. L'étude consiste à administrer en sous-cutanée un implant constitué de progéniteurs pancréatiques dérivés des CSE humaines. Les cellules sont conditionnées dans un système de macroencapsulation développé par la firme Encaptra®. Il ne fait nul doute que les résultats de cette étude clinique auront un impact important sur le devenir des CSE humaines comme option thérapeutique pour les patients diabétiques.

Une autre stratégie vise à générer des progéniteurs pancréatiques à partir des CSM. Les CSM sont des cellules capables d'auto-renouvellement et de différenciation vers divers spécificités. Elles sont obtenues majoritairement à partir de la moelle osseuse et du tissu adipeux.

Les CSM présentent plusieurs propriétés intéressantes qui font d'elles des candidats attractifs comme thérapeutique alternative à la greffe d'îlots de Langerhans humains :

- elles exercent une action immunorégulatrice. Cette propriété a été démontrée dans des modèles animaux de diabète auto-immun (212,213).
- elles favorisent la préservation du greffon par la production de cytokines (IL-6, IL-8), de facteurs de croissance (VEGF) et de facteurs anti-inflammatoires (210,211).

La co-transplantation de ces cellules avec les îlots de Langerhans favorise la revascularisation de ces derniers, limite leur perte précoce et ralentit la dysfonction chronique du greffon chez le rongeur *in vivo* (214).

Des essais cliniques commencent à être référencés dans le cadre du diabète de type 1 (215).

Malgré les succès actuels obtenus avec les cellules souches, leurs utilisations restent controversées. Une des principales limitations à leurs utilisations est le risque

carcinogénique avec la formation de tératomes par prolifération et différenciation incontrôlée des populations cellulaires indifférenciées ^(216,217).

Une autre limitation est le manque de reproductibilité des protocoles de différenciation de lignées cellulaires : les populations cellulaires dérivées sont souvent très hétérogènes.

Enfin comme leur nom l'indique, les CSE proviennent d'embryons et nécessitent leurs destructions pour être extraites, ce qui pose des problèmes éthiques.

En conclusion de cette partie, la thérapie cellulaire semble être une alternative prometteuse. Toutefois, elle nécessite encore des efforts de recherche et de collaborations multidisciplinaires pour mieux approfondir les connaissances et créer des standards dans ce domaine.

Conclusion

A l'heure où l'incidence du diabète est accrue, le pancréas bioartificiel laisse entrevoir de nouveaux espoirs pour le traitement du diabète de type 1.

La transplantation d'îlots de Langerhans microencapsulés apparaît comme une alternative attractive pour plusieurs raisons :

- à ce jour, c'est la seule approche thérapeutique qui permet le rétablissement d'un métabolisme insulinique physiologique ;
- la microcapsule permet l'isolation des îlots de Langerhans vis-à-vis du système immunitaire de l'hôte tout en s'affranchissant de l'utilisation de traitement immunosuppresseurs ;
- elle ne requiert qu'un geste technique très peu invasif.

Il apparaît que même si le concept a initialement été présenté comme simple, l'application pratique de cette approche n'est pas évidente. En effet, les résultats encourageants obtenus chez l'animal n'ont, à l'heure d'aujourd'hui, pas pu être reproduits chez l'homme. Certes, les résultats des études cliniques ont permis de valider la sécurité de cette approche. Toutefois, la fonctionnalité du système sur le long terme reste un challenge.

Ainsi, malgré les importantes avancées dans le domaine de la greffe des îlots de Langerhans, certaines problématiques limitent encore le développement de cette approche à un plus grand nombre de patient. Parmi ces freins, nous pouvons citer: le faible nombre de pancréas et donc d'îlots de Langerhans disponibles, le manque de reproductibilité du procédé de fabrication ou encore la survie limitée des greffons.

Les efforts actuels de recherche nécessitent une collaboration multidisciplinaire afin de comprendre et résoudre les problèmes qui apparaissent. De nombreux laboratoires cherchent aujourd'hui à mettre au point des procédés de fabrication standardisés. Depuis quelques années, la recherche microfluidique appliquée au domaine de l'encapsulation de cellules se développe dans cet objectif.

Par ailleurs, le manque de donneurs cadavériques pour la transplantation a stimulé la recherche de sources alternatives dont le palmarès est dominé par les îlots porcins et les cellules souches. Les progrès considérables réalisés au cours de ces dernières années dans la génération de ces cellules sécrétrices d'insuline pourraient permettre de transposer cette technique à un plus grand nombre de patients.

Bibliographie

1. Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW. Type 1 diabetes. *The Lancet*. 2014;383(9911):69-82.
2. Atlas du Diabète de la FID – 8e édition. 2017.
3. World Health Organization. Dept. of Noncommunicable Disease Surveillance. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications : report of a WHO consultation. Part 1, Diagnosis and classification of diabetes mellitus. 1999.
4. Bluestone JA, Herold K, Eisenbarth G. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature*. 2010;464(7293):1293-300.
5. Concannon P, Rich SS, Nepom GT. Genetics of type 1A diabetes. *N Engl J Med*. 2009;360(16):1646-54.
6. Todd JA. Etiology of type 1 diabetes. *Immunity*. 2010;32(4):457-67.
7. Marchand L, Thivolet C. Étiologie et physiopathologie du diabète de type 1. *EMC Endocrinologie Nutrition*. 2016;13(4):1-12.
8. Chmiel R, Beyerlein A, Knopff A, Hummel S, Ziegler A-G, Winkler C. Early infant feeding and risk of developing islet autoimmunity and type 1 diabetes. *Acta Diabetol*. 2015;52(3):621-4.
9. Meijer CR, Discepolo V, Troncone R, Mearin ML. Does infant feeding modulate the manifestation of celiac disease and type 1 diabetes? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2017;20(3):222-6.
10. Schneider DA, von Herrath MG. Potential viral pathogenic mechanism in human type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2014;57(10):2009-18.
11. Yeung W-CG, Rawlinson WD, Craig ME. Enterovirus infection and type 1 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis of observational molecular studies. *BMJ*. 2011;342:d35.
12. Campbell-Thompson ML, Atkinson MA, Butler AE, Chapman NM, Frisk G, Gianani R, et al. The diagnosis of insulinitis in human type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2013;56(11):2541-3.
13. Atkinson MA, Bluestone JA, Eisenbarth GS, Hebrok M, Herold KC, Accili D, et al. How Does Type 1 Diabetes Develop?: The Notion of Homicide or -Cell Suicide Revisited. *Diabetes*. 2011;60(5):1370-9.
14. Knip M. Can we predict type 1 diabetes in the general population? Vol. 25. *Diabetes*; 2002. 623-5 p.

15. Wenzlau JM, Hutton JC. Novel diabetes autoantibodies and prediction of type 1 diabetes. *Curr Diab Rep.* 2013;13(5):608-15.
16. Emdin SO, Dodson GG, Cutfield JM, Cutfield SM. Role of zinc in insulin biosynthesis. Some possible zinc-insulin interactions in the pancreatic B-cell. *Diabetologia.* sept 1980;19(3):174-82.
17. Wenzlau JM, Juhl K, Yu L, Moua O, Sarkar SA, Gottlieb P, et al. The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(43):17040-5.
18. Klenczar K, Deja G, Kalina-Faska B, Jarosz-Chobot P. Myasthenia gravis, Graves-Basedow disease and other autoimmune diseases in patient with diabetes type 1 - APS-3 case report, therapeutic complications. *Pediatr Endocrinol Diabetes Metab.* 2017;23(3):159-64.
19. Kahaly GJ, Hansen MP. Type 1 diabetes associated autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2016;15(7):644-8.
20. Nolan CJ, Damm P, Prentki M. Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. *Lancet Lond Engl.* 2011;378(9786):169-81.
21. Bergman M. Pathophysiology of prediabetes and treatment implications for the prevention of type 2 diabetes mellitus. *Endocrine.* 2013;43(3):504-13.
22. D'Adamo E, Caprio S. Type 2 Diabetes in Youth: Epidemiology and Pathophysiology. *Diabetes Care.* 2011;34(Suppl. 2):161-5.
23. Grimaldi A. *Traité de diabétologie.* Paris: Flammarion médecine-sciences; 2009.
24. Firdous P, Nissar K, Ali S, Ganai BA, Shabir U, Hassan T, et al. Genetic Testing of Maturity-Onset Diabetes of the Young Current Status and Future Perspectives. *Front Endocrinol.* 2018;9(253):1-13.
25. Timsit J, Saint-Martin C, Dubois-Laforgue D, Bellanné-Chantelot C. Diabète de type MODY. *EMC-Endocrinologie-Nutrition* 2016; 13(2):1-13.
26. Meas T, Laloi-Michelin M, Virally M, Ambonville C, Kevorkian J-P, Guillausseau P-J. Mitochondrial diabetes: clinical features, diagnosis and management. *Rev Med Interne.* 2010;31(3):216-21.
27. Reardon W, Ross RJ, Sweeney MG, Luxon LM, Pembrey ME, Harding AE, et al. Diabetes mellitus associated with a pathogenic point mutation in mitochondrial DNA. *Lancet Lond Engl.* 1992;340(8832):1376-9.
28. Narbonne H, Vialettes B. Les diabètes par cytopathie mitochondriale. *Médecine thérapeutique / Endocrinologie.* 2000;2(3):217-28.

29. De Bruijn KMJ, van Eijck CHJ. New-onset diabetes after distal pancreatectomy: a systematic review. *Ann Surg.* 2015;261(5):854-61.
30. Burkhart RA, Gerber SM, Tholey RM, Lamb KM, Somasundaram A, McIntyre CA, et al. Incidence and severity of pancreatogenic diabetes after pancreatic resection. *J Gastrointest Surg.* 2015;19(2):217-25.
31. McAuliffe JC, Christein JD. Type 2 diabetes mellitus and pancreatic cancer. *Surg Clin North Am.* 2013;93(3):619-27.
32. Creighton Mitchell T, McClain DA. Diabetes and hemochromatosis. *Curr Diab Rep.* 2014;14(5):488.
33. O'Shea D, O'Connell J. Cystic fibrosis related diabetes. *Curr Diab Rep.* 2014;14(8):511.
34. Mercado M, Ramírez-Rentería C. Metabolic Complications of Acromegaly. *Front Horm Res.* 2018;49:20-8.
35. Ferraù F, Korbonits M. Metabolic Syndrome in Cushing's Syndrome Patients. *Front Horm Res.* 2018;49:85-103.
36. Ferrau F, Albani A, Ciresi A, Giordano C, Cannavo S. Diabetes Secondary to Acromegaly: Physiopathology, Clinical Features and Effects of Treatment. *Front Endocrinol.* 2018;9(358):1-9.
37. Perez A, Jansen-Chaparro S, Saigi I, Bernal-Lopez MR, Miñambres I, Gomez-Huelgas R. Glucocorticoid-induced hyperglycemia: Corticosteroid-induced hyperglycemia. *J Diabetes.* 2014;6(1):9-20.
38. Paredes S, Alves M. Management and Treatment of Glucocorticoid-Induced Hyperglycemia. *Acta Med Port.* 2016;29(9):556-63.
39. Balduyck M. Régulation de la glycémie et exploration biologique du diabète : Diagnostic et surveillance biologique du diabète. Cours faculté de pharmacie, Université de Lille : 2014.
40. Alfadhli E. Gestational diabetes mellitus. *Saudi Med J.* 2015;36(4):399-406.
41. Coustan DR. Gestational Diabetes Mellitus. *Clin Chem.* 2013;59(9):1310-21.
42. Gosmanov AR, Gosmanova E, Dillard-Cannon E. Management of adult diabetic ketoacidosis. *Diabetes Metab Syndr Obes Targets Ther.* 2014;7:255-64.
43. Mouraux T, Dorchy H. Diabetic ketoacidosis: diagnosis, management, prevention. *Rev Med Brux.* 2010;31(2Suppl):S71-6.
44. Iqbal A, Heller S. Managing hypoglycaemia. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2016;30(3):413-30.

45. Nathan, DM. Long-Term Complications of Diabetes Mellitus. *N Engl J Med.* 1993; 328(23): 1676-85.
46. Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of Diabetic Complications. *Physiol Rev.* 2013;93(1):137-88.
47. Brissova M, Fowler MJ, Nicholson WE, Chu A, Hirshberg B, Harlan DM, et al. Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *J Histochem Cytochem.* 2005;53(9):1087-97.
48. Arrojo R, Ali Y, Diez J, Srinivasan DK, Berggren P-O, Boehm BO. New insights into the architecture of the islet of Langerhans: a focused cross-species assessment. *Diabetologia.* 2015;58(10):2218-28.
49. Sanlioglu AD, Altunbas HA, Balci MK, Griffith TS, Sanlioglu S. Clinical utility of insulin and insulin analogs. *Islets.* 2013;5(2):67-78.
50. Luc G. « Le pancréas endocrine ». Cours faculté de pharmacie, Université de Lille : 2014.
51. Dalle S. Effets du glucose sur la cellule bêta pancréatique mature. *Correspondances en Métabolismes Hormones Diabète et Nutrition.* 2009;8(1):29-35.
52. Floyd JC J, Fajans SS, Conn JW, Knopf RF, Rull J. Stimulation of insulin secretion by amino acids. *J Clin Invest.* 1966;45(9):1487-502.
53. Malaisse WJ, Malaisse-Lagae F, Sener A, Hellerström C. Participation of endogenous fatty acids in the secretory activity of the pancreatic B-cell. *Biochem J.* 1985;227(3):995-1002.
54. Thorens B. Gluco-incretin hormones in insulin secretion and diabetes. *Med Sci MS.* 2003;19(8-9):860-3.
55. Decaudin B. « Insulinothérapie: recommandations et optimisation thérapeutique ». Cours faculté de pharmacie, Université de Lille : 2014.
56. Tibaldi JM. Evolution of Insulin: From Human to Analog. *Am J Med.* 2014;127(10):25-38.
57. Grunberger G. The need for better insulin therapy. *Diabetes Obes Metab.* 2013;15(Suppl.1):1-5.
58. MacLeod KM, Hepburn DA, Frier BM. Frequency and morbidity of severe hypoglycaemia in insulin-treated diabetic patients. *Diabet Med J Br Diabet Assoc.* 1993;10(3):238-45.
59. Pozzuoli GM, Laudato M, Barone M, Crisci F, Pozzuoli B. Errors in insulin treatment management and risk of lipohypertrophy. *Acta Diabetol.* 2018;55(1):67-73.

60. Vardar B, Kizilci S. Incidence of lipohypertrophy in diabetic patients and a study of influencing factors. *Diabetes Res Clin Pract.* 2007;77(2):231-6.
61. Sousa F, Castro P, Fonte P, Sarmiento B. How to overcome the limitations of current insulin administration with new non-invasive delivery systems. *Ther Deliv.* 2015;6(1):83-94.
62. Matteucci E, Giampietro O, Covolan V, Giustarini D, Fanti P, Rossi R. Insulin administration: present strategies and future directions for a noninvasive (possibly more physiological) delivery. *Drug Des Devel Ther.* 2015;9:3109-18.
63. Verge D. Insulinothérapie Nouvelles molécules et voies d'administration. *médecine/sciences.* 2004;20(11):986–8.
64. Siekmeier R, Scheuch G. Inhaled insulin--does it become reality? *J Physiol Pharmacol Off J Pol Physiol Soc.* déc 2008;59 Suppl 6:81-113.
65. Nixon R, Folwell R, Pickup JC. Variations in the quality and sustainability of long-term glycaemic control with continuous subcutaneous insulin infusion. *Diabet Med.* 2014;31(10):1174-7.
66. Incidents liés aux pompes à insuline externes survenus entre 2002 et 2006. AFSSAPS - 2007.
67. Group JDRFCGMS. Continuous glucose monitoring and intensive treatment of type 1 diabetes. *N Engl J Med.* 2008;2008(359):1464–76.
68. Pickup JC, Freeman SC, Sutton AJ. Glycaemic control in type 1 diabetes during real time continuous glucose monitoring compared with self monitoring of blood glucose: meta-analysis of randomised controlled trials using individual patient data. *BMJ.* 2011;343:d3805.
69. Garg S, Zisser H, Schwartz S, Bailey T, Kaplan R, Ellis S, et al. Improvement in glycemic excursions with a transcutaneous, real-time continuous glucose sensor. *Diabetes Care.* 2006;29(1):44-50.
70. Adolfsson P, Parkin CG, Thomas A, Krinelke LG. Selecting the Appropriate Continuous Glucose Monitoring System – a Practical Approach. *Eur Endocrinol.* 2018;14(1):24-9.
71. Ancona P, Eastwood GM, Lucchetta L, Ekinici EI, Bellomo R, Mårtensson J. The performance of flash glucose monitoring in critically ill patients with diabetes. *Crit Care Resusc J Australas Acad Crit Care Med.* 2017;19(2):167-74.
72. Lodwig V, Kulzer B, Schnell O, Heinemann L. Current trends in continuous glucose monitoring. *J Diabetes Sci Technol.* 2014;8(2):390-6.
73. Bucher P, Mathe Z, Buhler LH, Andres A, Bosco D, Berney T, et al. Le traitement du diabète de type I par transplantation. *Ann Chir.* 2005;130(6-7):374-83.

74. Gruessner AC, Gruessner RWG. Pancreas Transplantation of US and Non-US Cases from 2005 to 2014 as Reported to the United Network for Organ Sharing (UNOS) and the International Pancreas Transplant Registry (IPTR). *Rev Diabet Stud.* 2016;13(1):35-58.
75. Egidi FM. Management of hyperglycaemia after pancreas transplantation: are new immunosuppressants the answer? *Drugs.* 2005;65(2):153-66.
76. Shapiro AJ, Lakey JR, Ryan EA, Korbutt GS, Toth E, Warnock GL, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med.* 2000;343(4):230-8.
77. Shapiro AM, Nanji SA, Lakey JR. Clinical islet transplant: current and future directions towards tolerance. *Immunol Rev.* 2003;196(1):219-36.
78. Lakey JR, Burridge PW, Shapiro AJ. Technical aspects of islet preparation and transplantation. *Transpl Int.* 2003;16(9):613-32.
79. Iwanaga Y, Sutherland DE, Harmon JV, Papas KK. Pancreas preservation for pancreas and islet transplantation: *Curr Opin Organ Transplant.* 2008;13(4):445-51.
80. Ricordi C, Lacy PE, Finke EH, Olack BJ, Scharp DW. Automated method for isolation of human pancreatic islets. *Diabetes.* 1988;37(4):413-20.
81. Ricordi C, Lacy PE, Finke EH, Olack BJ, Scharp DW. Automated method for isolation of human pancreatic islets. *Diabetes.* 1988;37(4):413-20.
82. Rheinheimer J, Bauer AC, Silveiro SP, Estivalet AAF, Bouças AP, Rosa AR, et al. Human pancreatic islet transplantation: an update and description of the establishment of a pancreatic islet isolation laboratory. *Arch Endocrinol Metab.* 2015;59(2):161-70.
83. Kessler L, Bucher P, Milliat-Guittard L, Benhamou PY, Berney T, Penfornis A, et al. Influence of islet transportation on pancreatic islet allotransplantation in type 1 diabetic patients within the Swiss-French GRAGIL network. *Transplantation.* 2004;77(8):1301-4.
84. Yamamoto T, Horiguchi A, Ito M, Nagata H, Ichii H, Ricordi C, et al. Quality control for clinical islet transplantation: organ procurement and preservation, the islet processing facility, isolation, and potency tests. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2009;16(2):131-6.
85. Merani S, Shapiro AMJ. Current status of pancreatic islet transplantation. *Clin Sci.* 2006;110(6):611-25.
86. Bucher P, Mathe Z, Bosco D, Becker C, Kessler L, Greget M, et al. Morbidity associated with intraportal islet transplantation. *Transplantation Proceedings.* 2004;36(4):1119-20.

87. Lehmann R, Spinas GA, Moritz W, Weber M. Has time come for new goals in human islet transplantation? *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2008;8(6):1096-100.
88. CITR coordinating center. CITR 10 th Annual report. 2017.
89. Vantyghem MC, Chetboun M, Benomar K, Le Mapihan K, Caiazzo R, Kerr-Conte J, Pattou F. Impact of primary graft function on long term (10 years) outcome of islet transplantation. *Diabetes Metab.* 2017; 43(2),19.
90. Lablanche S, Vantyghem MC, Kessler L, Wojtuszczyzn A, Borot S. TRIMECO : Essai contrôlé randomisé comparant l'efficacité métabolique de la transplantation d'îlots pancréatiques allogéniques à l'insulinothérapie intensive pour le traitement du diabète de type 1. Données préliminaires. *Diabetes Metab.* 2017;43(2):17.
91. Lablanche S, Vantyghem M-C, Kessler L, Wojtuszczyzn A, Borot S, Thivolet C, et al. Islet transplantation versus insulin therapy in patients with type 1 diabetes with severe hypoglycaemia or poorly controlled glycaemia after kidney transplantation (TRIMECO): a multicentre, randomised controlled trial. *Lancet Diabetes Endocrinol.* juill 2018;6(7):527-37.
92. Lablanche S, David-Tchouda S, Margier J, Schir E, Wojtuszczyzn A, Borot S, et al. Randomised, prospective, medico-economic nationwide French study of islet transplantation in patients with severely unstable type 1 diabetes: the STABILOT study protocol. *BMJ Open.* 2017;7(2):e013434.
93. Piemonti L, Pileggi A. Islet Transplantation. In: *Endotext.* South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2016.
94. Bassi R, Fiorina P. Impact of islet transplantation on diabetes complications and quality of life. *Curr Diab Rep.* 2011;11(5):355-63.
95. Benhamou PY, Milliat-Guittard L, Wojtuszczyzn A, Kessler L, Toso C, Baertschiger R, et al. Quality of life after islet transplantation: data from the GRAGIL 1 and 2 trials. *Diabet Med.* 2009;26(6):617-21.
96. D'Amour KA, Bang AG, Eliazer S, Kelly OG, Agulnick AD, Smart NG, et al. Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2006;24(11):1392-401.
97. Russ HA, Ravassard P, Kerr-Conte J, Pattou F, Efrat S. Epithelial-Mesenchymal Transition in Cells Expanded In Vitro from Lineage-Traced Adult Human Pancreatic Beta Cells. Maedler K, éditeur. *PLoS ONE.* 2009;4(7):e6417.
98. Ryan EA, Lakey JR, Rajotte RV, Korbutt GS, Kin T, Imes S, et al. Clinical outcomes and insulin secretion after islet transplantation with the Edmonton protocol. *Diabetes.* 2001;50(4):710-9.
99. Vaithilingam V, Tuch BE. Islet Transplantation and Encapsulation: An Update on Recent Developments. *Rev Diabet Stud.* 2011;8(1):51-67.

100. Robitaille R, Leblond FA, Bourgeois Y, Henley N, Loignon M, Hallé JP. Studies on small (<350 microm) alginate-poly-L-lysine microcapsules. V. Determination of carbohydrate and protein permeation through microcapsules by reverse-size exclusion chromatography. *J Biomed Mater Res.* 2000;50(3):420-7.
101. Brissova M, Petro M, Lacik I, Powers AC, Wang T. Evaluation of microcapsule permeability via inverse size exclusion chromatography. *Anal Biochem.* 1996;242(1):104-11.
102. De Vos P, Faas MM, Strand B, Calafiore R. Alginate-based microcapsules for immunoisolation of pancreatic islets. *Biomaterials.* 2006;27(32):5603-17.
103. De Groot M, Keizer PP, de Haan BJ, Schuurs TA, Leuvenink HG, van Schilfgaarde R, et al. Microcapsules and their ability to protect islets against cytokine-mediated dysfunction. *Transplant Proc.* 2001;33(1-2):1711-2.
104. Piro S, Lupi R, Dotta F, Patanè G, Rabuazzo MA, Marselli L, et al. Bovine islets are less susceptible than human islets to damage by human cytokines. *Transplantation.* 2001;71(1):21-6.
105. Chae S. Protection of insulin secreting cells from nitric oxide induced cellular damage by crosslinked hemoglobin. *Biomaterials.* 2004;25(5):843-50.
106. Orive G, Hernandez RM, Gascon AR, Igartua M, Pedraz JL. Survival of different cell lines in alginate-agarose microcapsules. *Eur J Pharm Sci.* 2003;18(1):23-30.
107. Ma J, Qi W, Xie Y, Wang W, Yu W, Ma X. K562 cell growth activity and metabolism characteristics in APA microencapsulated culture and modeling study. *J Biotechnol.* 2006;125(2):242-51.
108. De Vos P, Van Straaten JF, Nieuwenhuizen AG, de Groot M, Ploeg RJ, De Haan BJ, et al. Why do microencapsulated islet grafts fail in the absence of fibrotic overgrowth? *Diabetes.* 1999;48(7):1381-8.
109. Korbitt GS, Mallett AG, Ao Z, Flashner M, Rajotte RV. Improved survival of microencapsulated islets during in vitro culture and enhanced metabolic function following transplantation. *Diabetologia.* 2004;47(10):1810-8.
110. Paredes Juarez GA, Spasojevic M, Faas MM, de Vos P. Immunological and Technical Considerations in Application of Alginate-Based Microencapsulation Systems. *Front Bioeng Biotechnol.* 2014;2(26):1-15.
111. Ricci M, Blasi P, Giovagnoli S, Rossi C, Macchiarulo G, Luca G, et al. Ketoprofen controlled release from composite microcapsules for cell encapsulation: Effect on post-transplant acute inflammation. *J Control Release.* 2005;107(3):395-407.
112. Baruch L, Benny O, Gilert A, Ukobnik M, Ben Itzhak O, Machluf M. Alginate-PLL cell encapsulation system Co-entrapping PLGA-microspheres for the

- continuous release of anti-inflammatory drugs. *Biomed Microdevices*. 2009;11(5):1103-13.
113. Tam SK, Dusseault J, Polizu S, Ménard M, Hallé J-P, Yahia L. Impact of residual contamination on the biofunctional properties of purified alginates used for cell encapsulation. *Biomaterials*. 2006;27(8):1296-305.
114. Skjak-Braek G, Murano E, Paoletti S. Alginate as immobilization material. II: Determination of polyphenol contaminants by fluorescence spectroscopy, and evaluation of methods for their removal. *Biotechnol Bioeng*. 1989;33(1):90-4.
115. Klöck G, Frank H, Houben R, Zekorn T, Horcher A, Siebers U, et al. Production of purified alginates suitable for use in immunoisolated transplantation. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1994;40(5):638-43.
116. De Vos P, De Haan BJ, Wolters GH, Strubbe JH, Van Schilfgaarde R. Improved biocompatibility but limited graft survival after purification of alginate for microencapsulation of pancreatic islets. *Diabetologia*. 1997;40(3):262-70.
117. Babensee JE, Sodhi RN, Sefton MV. X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) surface analysis of HEMA-MMA microcapsules. *J Biomater Sci Polym Ed*. 1997;8(9):655-65.
118. Orive G, Hernández RM, Gascón AR, Calafiore R, Chang TMS, De Vos P, et al. Cell encapsulation: promise and progress. *Nat Med*. 2003;9(1):104-7.
119. De Vos P, van Hoogmoed CG, van Zanten J, Netter S, Strubbe JH, Busscher HJ. Long-term biocompatibility, chemistry, and function of microencapsulated pancreatic islets. *Biomaterials*. 2003;24(2):305-12.
120. De Vos P, de Haan BJ, Kamps JAAM, Faas MM, Kitano T. Zeta-potentials of alginate-PLL capsules: A predictive measure for biocompatibility? *J Biomed Mater Res A*. 2007;80(4):813-9.
121. Uludag H, De Vos P, Tresco PA. Technology of mammalian cell encapsulation. *Adv Drug Deliv Rev*. 2000;42(1):29-64.
122. Bungler CM, Gerlach C, Freier T, Schmitz KP, Pilz M, Werner C, et al. Biocompatibility and surface structure of chemically modified immunoisolating alginate-PLL capsules. *J Biomed Mater Res A*. 2003;67(4):1219-27.
123. Zimmermann H, Hillgärtner M, Manz B, Feilen P, Brunnenmeier F, Leinfelder U, et al. Fabrication of homogeneously cross-linked, functional alginate microcapsules validated by NMR-, CLSM- and AFM-imaging. *Biomaterials*. 2003;24(12):2083-96.
124. Thu B, Bruheim P, Espevik T, Smidsrød O, Soon-Shiong P, Skjak-Braek G. Alginate polycation microcapsules. II. Some functional properties. *Biomaterials*. 1996;17(11):1069-79.

125. Lacik I. Polymer Chemistry in Diabetes Treatment by Encapsulated Islets of Langerhans. *Aust J Chem.* 2006;59(8):508-24.
126. Van Raamsdonk JM, Chang PL. Osmotic pressure test: a simple, quantitative method to assess the mechanical stability of alginate microcapsules. *J Biomed Mater Res A.* 2001;54(2):264-71.
127. Rehor A, Canaple L, Zhang Z, Hunkeler D. The compressive deformation of multicomponent microcapsules: influence of size, membrane thickness, and compression speed. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2001;12(2):157-70.
128. Leblond FA, Tessier J, Hallé J-P. Quantitative method for the evaluation of biomicrocapsule resistance to mechanical stress. *Biomaterials.* 1996;17(21):2097-102.
129. Ludwig B, Ludwig S. Transplantable bioartificial pancreas devices: current status and future prospects. *Langenbecks Arch Surg.* 2015;400(5):531-40.
130. Vaithilingam V, Bal S, Tuch BE. Encapsulated Islet Transplantation: Where Do We Stand? *Rev Diabet Stud.* 2017;14(1):51-78.
131. Zimmermann H, Zimmermann D, Reuss R, Feilen PJ, Manz B, Katsen A, et al. Towards a medically approved technology for alginate-based microcapsules allowing long-term immunoisolated transplantation. *J Mater Sci Mater Med.* 2005;16(6):491-501.
132. Lim F, Sun AM. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science.* 1980;210(4472):908-10.
133. Orive G, Tam S, Pedraz J, Halle J. Biocompatibility of alginate–poly-L-lysine microcapsules for cell therapy. *Biomaterials.* 2006;27(20):3691-700.
134. De Castro M, Orive G, Hernández RM, Gascón AR, Pedraz JL. Comparative study of microcapsules elaborated with three polycations (PLL, PDL, PLO) for cell immobilization. *J Microencapsul.* 2005;22(3):303-15.
135. Darrabie MD, Kendall WF, Opara EC. Characteristics of Poly-L-Ornithine-coated alginate microcapsules. *Biomaterials.* 2005;26(34):6846-52.
136. Orive G, Hernández RM, Gascón AR, Igartua M, Pedraz JL. Development and optimisation of alginate-PMCG-alginate microcapsules for cell immobilisation. *Int J Pharm.* 2003;259(1-2):57-68.
137. Tam SK, Bilodeau S, Dusseault J, Langlois G, Hallé J-P, Yahia LH. Biocompatibility and physicochemical characteristics of alginate–polycation microcapsules. *Acta Biomater.* 2011;7(4):1683-92.
138. Morch Y, Donati I, Strand BL. Effect of Ca²⁺, Ba²⁺, and Sr²⁺ on Alginate Microbeads. *Biomacromolecules.* 2006;7(5):1471-80.

139. Duvivier-Kali VF, Omer A, Parent RJ, O'Neil JJ, Weir GC. Complete Protection of Islets Against Allorejection and Autoimmunity by a Simple Barium-Alginate Membrane. *Diabetes*. 2001;50(8):1698-705.
140. Tuch BE, Keogh GW, Williams LJ, Wu W, Foster JL, Vaithilingam V, et al. Safety and Viability of Microencapsulated Human Islets Transplanted Into Diabetic Humans. *Diabetes Care*. 1 oct 2009;32(10):1887-9.
141. De Vos P, Lazarjani HA, Poncelet D, Faas MM. Polymers in cell encapsulation from an enveloped cell perspective. *Adv Drug Deliv Rev*. 2014;67-68:15-34.
142. Kobayashi T, Aomatsu Y, Kanehiro H, Hisanaga M, Nakajima Y. Protection of NOD islet isograft from autoimmune destruction by agarose microencapsulation. *Transplant Proc*. 2003;35(1):484-5.
143. Tashiro H, Iwata H, Warnock GL, Ikada Y, Tsuji T. Viability studies of agarose microencapsulated islets of Langerhans from dogs. *Transplant Proc*. 1998;30(2):490.
144. Iwata H, Murakami Y, Ikada Y. Control of complement activities for immunoisolation. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;875:7-23.
145. Tun T, Inoue K, Hayashi H, Aung T, Gu YJ, Doi R, et al. A newly developed three-layer agarose microcapsule for a promising biohybrid artificial pancreas: rat to mouse xenotransplantation. *Cell Transplant*. 1996;5(1):59-63.
146. Kubota N, Tatsumoto N, Sano T, Toya K. A simple preparation of half N-acetylated chitosan highly soluble in water and aqueous organic solvents. *Carbohydr Res*. 2000;324(4):268-74.
147. Zhu J-H, Wang X-W, Ng S, Quek C-H, Ho H-T, Lao X-J, et al. Encapsulating live cells with water-soluble chitosan in physiological conditions. *J Biotechnol*. 2005;117(4):355-65.
148. Dautzenberg H, Schuldt U, Grasnack G, Karle P, Müller P, Löhr M, et al. Development of cellulose sulfate-based polyelectrolyte complex microcapsules for medical applications. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;875:46-63.
149. Chia SM, Wan ACA, Quek CH, Mao HQ, Xu X, Shen L, et al. Multi-layered microcapsules for cell encapsulation. *Biomaterials*. 2002;23(3):849-56.
150. Alcantar NA, Aydil ES, Israelachvili JN. Polyethylene glycol-coated biocompatible surfaces. *J Biomed Mater Res*. 2000;51(3):343-51.
151. Nguyen KT, West JL. Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications. *Biomaterials*. 2002;23(22):4307-14.
152. Scharp DW, Marchetti P. Encapsulated islets for diabetes therapy: History, current progress, and critical issues requiring solution. *Adv Drug Deliv Rev*. 2014;67(68):35-73.

153. Jeyanthi R, Rao KP. In vivo biocompatibility of collagen-poly(hydroxyethyl methacrylate) hydrogels. *Biomaterials*. 1990;11(4):238-43.
154. Lahooti S, Sefton MV. Methods for Microencapsulation with HEMA-MMA. *Methods Mol Med*. 1999;18:331-48.
155. Babensee JE, Sefton MV. Viability of HEMA-MMA microencapsulated model hepatoma cells in rats and the host response. *Tissue Eng*. 2000;6(2):165-82.
156. Prusse U, Bilancetti L, Bučko M, Bugarski B, Bukowski J, Gemeiner P, et al. Comparison of different technologies for alginate beads production. *Chem Pap*. 2008;62(4):364-74.
157. De Vos P, De Haan BJ, Van Schilfgaarde R. Upscaling the production of microencapsulated pancreatic islets. *Biomaterials*. 1997;18(16):1085-90.
158. Wolters GHJ, Fritschy WM, Gerrits D, Van Schilfgaarde R. A versatile alginate droplet generator applicable for microencapsulation of pancreatic islets. *J Appl Biomater*. 1992;3(4):281-6.
159. Klock TI, Melvik JE. Controlling the size of alginate gel beads by use of a high electrostatic potential. *J Microencapsul*. 2002;19(4):415-24.
160. Strand BL, Gåserød O, Kulseng B, Espevik T, Skjåk-Bæk G. Alginate-polylysine-alginate microcapsules: effect of size reduction on capsule properties. *J Microencapsul*. 2002;19(5):615-30.
161. Seifert DB, Phillips JA. Production of small, monodispersed alginate beads for cell immobilization. *Biotechnol Prog*. 1997;13(5):562-68.
162. Prube U. Bead production with JetCutting and rotating disk/nozzle technologies. *Landbauforsch Völkenrode*. 2002;241:1-10.
163. Sakai S, Kawabata K, Ono T, Ijima H, Kawakami K. Development of mammalian cell-enclosing subsieve-size agarose capsules (<100 microm) for cell therapy. *Biomaterials*. 2005;26(23):4786-92.
164. Narang AS. Biological and Biomaterial Approaches for Improved Islet Transplantation. *Pharmacol Rev*. 2006;58(2):194-243.
165. Sikorski P, Mo F, Skjåk-Bræk G, Stokke BT. Evidence for Egg-Box-Compatible Interactions in Calcium-Alginate Gels from Fiber X-ray Diffraction. *Biomacromolecules*. 2007;8(7):2098-103.
166. Sawhney AS, Pathak CP, Hubbell JA. Interfacial photopolymerization of poly(ethylene glycol)-based hydrogels upon alginate-poly(L-lysine) microcapsules for enhanced biocompatibility. *Biomaterials*. 1993;14(13):1008-16.
167. Baruch L, Machluf M. Alginate-chitosan complex coacervation for cell encapsulation: Effect on mechanical properties and on long-term viability. *Biopolymers*. 2006;82(6):570-9.

168. Zimmermann H, Ehrhart F, Zimmermann D, Mueller K et al. Hydrogel-based encapsulation of biological, functional tissue: fundamentals, technologies and applications. *Applied Physics A*. 2007;89(4):909-22.
169. Sharma V, Hunckler M, Ramasubramanian MK, Opara EC, Katuri KC. Microfluidic Approach to Cell Microencapsulation. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2017;1479:71-6.
170. Mazzitelli S, Capretto L, Quinci F, Piva R, Nastruzzi C. Preparation of cell-encapsulation devices in confined microenvironment. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;65(11-12):1533-55.
171. Thorsen T, Roberts RW, Arnold FH, Quake SR. Dynamic pattern formation in a vesicle-generating microfluidic device. *Phys Rev Lett*. 2001;86(18):4163-6.
172. Seiffert S, Weitz DA. Microfluidic fabrication of smart microgels from macromolecular precursors. *Polymer*. 2010;51(25):5883-9.
173. Chen H, Zhao Y, Li J, Guo M, Wan J, Weitz DA, et al. Reactions in double emulsions by flow-controlled coalescence of encapsulated drops. *Lab Chip*. 2011;11(14):2312-5.
174. Kim C, Lee KS, Kim YE, Lee K-J, Lee SH, Kim TS, et al. Rapid exchange of oil-phase in microencapsulation chip to enhance cell viability. *Lab Chip*. 2009;9(9):1294-7.
175. Zhang H, Tumarkin E, Sullan R M A, Walker G C, Kumacheva E. Exploring Microfluidic Routes to Microgels of Biological Polymers. 2007;28(5):527-38.
176. Kemna EWM, Schoeman RM, Wolbers F, Vermes I, Weitz DA, van den Berg A. High-yield cell ordering and deterministic cell-in-droplet encapsulation using Dean flow in a curved microchannel. *Lab Chip*. 2012;12(16):2881-7.
177. Nam J, Lim H, Kim C, Yoon Kang J, Shin S. Density-dependent separation of encapsulated cells in a microfluidic channel by using a standing surface acoustic wave. *Biomicrofluidics*. 2012;6(2):24120-2412010.
178. Kintses B, van Vliet LD, Devenish SR, Hollfelder F. Microfluidic droplets: new integrated workflows for biological experiments. *Curr Opin Chem Biol*. 2010;14(5):548-55.
179. O'Sullivan ES, Vegas A, Anderson DG, Weir GC. Islets transplanted in immunoisolation devices: a review of the progress and the challenges that remain. *Endocr Rev*. 2011;32(6):827-44.
180. Kobayashi T, Aomatsu Y, Iwata H, Kin T, Kanehiro H, Hisanga M, et al. Survival of microencapsulated islets at 400 days posttransplantation in the omental pouch of NOD mice. *Cell Transplant*. 2006;15(4):359-65.
181. Pareta R, McQuilling JP, Sittadjody S, Jenkins R, Bowden S, Orlando G, et al. Long-term function of islets encapsulated in a redesigned alginate microcapsule

- construct in omentum pouches of immune-competent diabetic rats. *Pancreas*. 2014;43(4):605-13.
182. Dufrane D, Goebbels R-M, Saliez A, Guiot Y, Gianello P. Six-month survival of microencapsulated pig islets and alginate biocompatibility in primates: proof of concept. *Transplantation*. 2006;81(9):1345-53.
183. Cantarelli E, Piemonti L. Alternative transplantation sites for pancreatic islet grafts. *Curr Diab Rep*. 2011;11(5):364-74.
184. Calafiore R, Basta G, Luca G, Lemmi A, Racanicchi L, Mancuso F, et al. Standard technical procedures for microencapsulation of human islets for graft into nonimmunosuppressed patients with type 1 diabetes mellitus. *Transplant Proc*. 2006;38(4):1156-7.
185. Basta G, Montanucci P, Luca G, Boselli C, Noya G, Barbaro B, et al. Long-Term Metabolic and Immunological Follow-Up of Nonimmunosuppressed Patients With Type 1 Diabetes Treated With Microencapsulated Islet Allografts: Four cases. *Diabetes Care*. 2011;34(11):2406-9.
186. Soon-Shiong P, Heintz RE, Merideth N, Yao QX, Yao Z, Zheng T, et al. Insulin independence in a type 1 diabetic patient after encapsulated islet transplantation. *Lancet Lond Engl*. 1994;343(8903):950-1.
187. Soon-Shiong P. Treatment of type I diabetes using encapsulated islets. *Adv Drug Deliv Rev*. 1999;35(2-3):259-70.
188. Calafiore R, Basta G, Luca G, Lemmi A, Montanucci MP, Calabrese G, et al. Microencapsulated pancreatic islet allografts into nonimmunosuppressed patients with type 1 diabetes: first two cases. *Diabetes Care*. 2006;29(1):137-8.
189. Basta G, Montanucci P, Luca G, Boselli C, Noya G, Barbaro B, et al. Long-Term Metabolic and Immunological Follow-Up of Nonimmunosuppressed Patients With Type 1 Diabetes Treated With Microencapsulated Islet Allografts: Four cases. *Diabetes Care*. 2011;34(11):2406-9.
190. Jacobs-Tulleneers-Thevissen D, Ling Z, Gillard P, Schoonjans L, Delvaux G, Strand BL, et al. Sustained function of alginate-encapsulated human islet cell implants in the peritoneal cavity of mice leading to a pilot study in a type 1 diabetic patient. *Diabetologia*. 2013;56(7):1605-14.
191. Rosenberg L, Wang R, Paraskevas S, Maysinger D. Structural and functional changes resulting from islet isolation lead to islet cell death. *Surgery*. 1999;126(2):393-8.
192. Ilieva A, Yuan S, Wang RN, Agapitos D, Hill DJ, Rosenberg L. Pancreatic islet cell survival following islet isolation: the role of cellular interactions in the pancreas. *J Endocrinol*. 1999;161(3):357-64.

193. Lehmann R, Zuellig RA, Kugelmeier P, Baenninger PB, Moritz W, Perren A, et al. Superiority of Small Islets in Human Islet Transplantation. *Diabetes*. 2007;56(3):594-603.
194. MacGregor RR, Williams SJ, Tong PY, Kover K, Moore WV, Stehno-Bittel L. Small rat islets are superior to large islets in in vitro function and in transplantation outcomes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006;290(5):771-9.
195. Bilodeau S. Amélioration de la résistance à l'hypoxie des îlots de Langerhans microencapsulés par l'utilisation d'agrégats de cellules dispersées. Thèse de doctorat en sciences biomédicales. Université de Montréal. 2010.
196. Hopcroft DW, Mason DR, Scott RS. Insulin secretion from perfused rat pancreatic pseudoislets. *Vitro Cell Dev Biol J Tissue Cult Assoc*. 1985;21(8):421-7.
197. Zhang N, Richter A, Suriawinata J, Harbaran S, Altomonte J, Cong L, et al. Elevated Vascular Endothelial Growth Factor Production in Islets Improves Islet Graft Vascularization. *Diabetes*. 2004;53(4):963-70.
198. Nagy JA, Dvorak AM, Dvorak HF. Vascular hyperpermeability, angiogenesis, and stroma generation. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(2):a006544.
199. Sigrist S, Mechine-Neuville A, Mandes K, Calenda V, Braun S, Legeay G, et al. Influence of VEGF on the viability of encapsulated pancreatic rat islets after transplantation in diabetic mice. *Cell Transplant*. 2003;12(6):627-35.
200. Lammert E, Gu G, McLaughlin M, Brown D, Brekken R, Murtaugh LC, et al. Role of VEGF-A in Vascularization of Pancreatic Islets. *Curr Biol*. 2003;13(12):1070-4.
201. Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. Angiogenic and cell survival functions of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). *J Cell Mol Med*. 2005;9(4):777-94.
202. van der Windt DJ, Bottino R, Kumar G, Wijkstrom M, Hara H, Ezzelarab M, et al. Clinical Islet Xenotransplantation: How Close Are We? *Diabetes*. 2012;61(12):3046-55.
203. Vériter S, Aouassar N, Beaurin G, Goebbels R-M, Gianello P, Dufrane D. Improvement of pig islet function by in vivo pancreatic tissue remodeling: a « human-like » pig islet structure with streptozotocin treatment. *Cell Transplant*. 2013;22(11):2161-73.
204. Mourad NI, Perota A, Xhema D, Galli C, Gianello P. Transgenic Expression of Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) and Activated Muscarinic Receptor (M3R) Significantly Improves Pig Islet Secretory Function. *Cell Transplant*. 2017;26(5):901-11.
205. Mourad NI, Gianello PR. Xenoislets: porcine pancreatic islets for the treatment of type I diabetes. *Curr Opin Organ Transplant*. 2017;22(6):529-34.

206. Groth CG, Korsgren O, Tibell A, Tollemar J, Möller E, Bolinder J, et al. Transplantation of porcine fetal pancreas to diabetic patients. *Lancet Lond Engl.* 1994;344(8934):1402-4.
207. Park C-G, Bottino R, Hawthorne WJ. Current status of islet xenotransplantation. *Int J Surg.* 2015;23:261-6.
208. Matsumoto S, Abalovich A, Wechsler C, Wynyard S, Elliott RB. Clinical Benefit of Islet Xenotransplantation for the Treatment of Type 1 Diabetes. *EBioMedicine.* 2016;12:255-62.
209. Kroon E, Martinson LA, Kadoya K, Bang AG, Kelly OG, Eliazar S, et al. Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nat Biotechnol.* 2008;26(4):443-52.
210. Rezanian A, Bruin JE, Arora P, Rubin A, Batushansky I, Asadi A, et al. Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol.* 2014;32(11):1121-33.
211. Pagliuca FW, Millman JR, Gürtler M, Segel M, Van Dervort A, Ryu JH, et al. Generation of Functional Human Pancreatic β Cells In Vitro. *Cell.* 2014;159(2):428-39.
212. Guan J, Zhang ZY, Zhou ZQ, Li H, Tong DN, Zhou GW. Mesenchymal Stem Cell Modulates T Follicular Helper Cell to Induce Immunotolerance of Islet Allograft. *Transplant Proc.* 2015;47(6):2050-6.
213. Madec AM, Mallone R, Afonso G, Abou Mrad E, Mesnier A, Eljaafari A, et al. Mesenchymal stem cells protect NOD mice from diabetes by inducing regulatory T cells. *Diabetologia.* 2009;52(7):1391-9.
214. Arzouni AA, Vargas-Seymour A, Nardi N, J.F. King A, Jones PM. Using Mesenchymal Stromal Cells in Islet Transplantation: MSCs in Islet Transplantation. *Stem Cells Transl Med.* 2018;7(8):559-63.
215. Busch SA, van Crutchen STJ, Deans RJ, Ting AE. Mesenchymal Stromal Cells as a Therapeutic Strategy to Support Islet Transplantation in Type 1 Diabetes Mellitus. *Cell Med.* 2011;2(2):43-53.
216. Fujikawa T, Oh S-H, Pi L, Hatch HM, Shupe T, Petersen BE. Teratoma Formation Leads to Failure of Treatment for Type I Diabetes Using Embryonic Stem Cell-Derived Insulin-Producing Cells. *Am J Pathol.* 2005;166(6):1781-91.
217. Blum B, Benvenisty N. The tumorigenicity of diploid and aneuploid human pluripotent stem cells. *Cell Cycle Georget Tex.* 2009;8(23):3822-30.

Université de Lille
FACULTE DE PHARMACIE DE LILLE
DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
Année Universitaire 2018/2019

Nom, prénom : BREUVAL Adeline

Titre de la thèse : La greffe d'îlots de Langerhans microencapsulés comme traitement du diabète de type 1.

Mots-clés : diabète de type 1, îlots de Langerhans, microencapsulation, immunoprotection, xénogreffes, thérapie cellulaire.

Résumé :

Le diabète est une des plus grandes crises de santé mondiale du XXI^e siècle. Cette maladie entraîne de nombreuses complications macrovasculaires et microvasculaires. Elle touche plus de 400 millions de personnes dans le monde et sa prévalence est en constante augmentation.

Au cours de ces dernières années de réelles avancées ont été faites dans la recherche d'alternatives aux traitements classiques basés sur un apport exogène d'insuline. La thérapie cellulaire et plus particulièrement la greffe d'îlots de Langerhans microencapsulés apparaît comme une approche thérapeutique prometteuse.

Elle permet le rétablissement d'un métabolisme insulinique physiologique. La microcapsule permet l'isolation des îlots de Langerhans vis-à-vis du système immunitaire de l'hôte tout en s'affranchissant de l'utilisation de traitement immunosuppresseurs. Elle ne requiert qu'un geste technique très peu invasif. Toutefois la microencapsulation des îlots de Langerhans est un système complexe puisque les capsules contiennent des cellules vivantes.

Ce travail expose le choix des matériaux et les méthodes de production de ces dispositifs ainsi que les différentes options envisagées pour optimiser la survie et la fonctionnalité des îlots de Langerhans microencapsulés transplantés.

Membres du jury :

Président : Madame SIEPMANN Florence, Professeur des Universités, Faculté de Pharmacie de Lille

Assesseur : Madame HAMOUDI Mounira, Maître de Conférences, Faculté de Pharmacie de Lille

Membre extérieur : Madame VANTYGHEM Marie-Christine, Professeur des Universités et Praticien Hospitalier en endocrinologie, diabétologie et maladies métaboliques, CHRU de Lille

Membre extérieur : Madame DE LABBEY Agathe, Docteur en Pharmacie, Lille

Membre extérieur : Madame CARRET Nathalie, Docteur en Pharmacie, Lille