HAL
open science

Identification des mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine de la perte précoce des îlots pancréatiques au cours de la transplantation

Kevin Vivot

To cite this version:

Kevin Vivot. Identification des mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine de la perte précoce des îlots pancréatiques au cours de la transplantation. Médecine humaine et pathologie. Université de Strasbourg, 2012. Français. NNT : 2012STRAJ062 . tel-00806576

HAL Id: tel-00806576

https://theses.hal.science/tel-00806576

Submitted on 2 Apr 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE 414

Centre Européen d'étude du Diabète

THÈSE présentée par :

Kevin VIVOT

Soutenue le : **28 septembre 2012**

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

Discipline/ Spécialité : Science de la vie et de la santé

Identification des mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine de la perte précoce des îlots pancréatiques au cours de la transplantation

THÈSE dirigée par :

SIGRIST Séverine	Docteur, université de Strasbourg

THÈSE co-dirigée par :

Gies Jean-Pierre	Professeur, université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Gairin Jean-Edouard	Professeur, université de Toulouse
Dalle Stéphane	Docteur, université de Montpellier

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Gianello Pierre	Professeur, université catholique de Louvain

« Le génie, c’est 1% d’inspiration et 99% de transpiration »

Thomas Edison

REMERCIEMENTS

Je remercie le Pr. Michel Pinget pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, le Centre européen d'étude du Diabète.

Je tiens à remercier tout particulièrement le Dr Séverine Sigrist pour avoir accepté de diriger cette thèse. Merci de m'avoir guidé pendant ces 3 années. Merci pour la confiance que tu m'as toujours témoignée tout au long de cette thèse. Merci pour ta disponibilité, ton investissement et pour tout le temps que tu m'as consacré pour corriger ce manuscrit. Enfin, certainement le plus grand des merci pour avoir jour après jour validé mon quota de blagues « pas drôles ».

Je remercie également le Pr Jean-Pierre Gies pour avoir accepté la co-direction de ce travail, pour tous les échanges lors des réunions qui ont permis de faire avancer ce travail et pour la correction de ce manuscrit.

Je remercie vivement les membres du jury pour l'honneur que vous me faites d'avoir accepté de juger ce travail : Pr Dominique Wachsmann, directrice de recherche à l'Université de Strasbourg (Faculté de pharmacie, Physiopathologie des arthrites), Dr Stéphane Dalle, directeur de recherche à l'INSERM de Montpellier (Institut de génomique fonctionnelle, Physiopathologie de la cellule β-pancréatiques), Pr Jean-Edouard Gairin, directeur de recherche à l'Université Paul Sabatier de Toulouse (Faculté de pharmacie, laboratoire de Pharmacochimie et Pharmacologie pour le développement (PHARMA-DEV)), Pr Pierre Gianello, directeur de recherche de l'Université catholique de Louvain (Pôle de chirurgie expérimentale et transplantation).

Ce travail a avant tout été un travail d'équipe c'est pourquoi je tiens aussi à remercier le Dr Allan Langlois, tu m'as laissé une grande place au sein de ta thématique tout en m'accordant ta confiance dans l'orientation de mon travail. Je tiens également à remercier le Dr Stéphanie Ros pour son accompagnement et son expertise lors de mes manips concernant le stress oxydant.

Je tiens tout particulièrement à remercier Elodie Seyfritz, dite « la lavandière » ou mon « Larousse » personel, sans qui ce travail n'aurait pas été achevé à temps. Le temps que tu m'as fait gagner et la qualité de ton travail m'ont été très précieux. Je n'oublie pas William

Bietiger, « le geek du labo », pour m'avoir formé sur la majorité des manips et ensuite pour m'avoir aidé tout au long de ma thèse. Désolé pour tes soirées sans geekage par ma faute.

Mes remerciements vont également à toutes les équipes externes qui ont contribuées à ce travail. Christiane Arnold de l'unité INSERM U682 pour son aide concernant les études d'histologie, Philippe Hamann de la plateforme de protéomique de l'Esplanade pour les analyses d'électrophorèse 2D, Dr Michèle Jacobs et Eliane Mengus du laboratoire de biologie et de biochimie moléculaire de l'hôpital de Hautepierre pour les études par qPCR, Dr Christian Muller du laboratoire de l'innovation thérapeutique pour les analyses de cytométrie en flux et le Dr Nathalie Reix du Laboratoire d'Explorations Fonctionnelles par les Isotopes pour les études par RMN.

Merci à mes amis les « THESARD » pour votre aide, votre soutien et votre amitié. En chef de file Pauline : « Il y a un copain qui m'a raconté qu'une de ces copines avait rencontré le copain d'une de ses meilleures amies… » Sans oublier mon Remmelt : « Ooooh Remmelt ». Courage à vous deux pour la suite de cette aventure. Votre « chef des THESARD ».

Je tiens à remercier également toutes les personnes qui se sont investit dans ce travail. Claude qui a pris soin de mes 641 rats morts pour la science, Nathalie Stiegler toujours prête à rendre service et Cyrielle étudiante en DUT qui a apporté son aide.

Merci à toute l'équipe de Defymed, Richard, Charles-Thibault et Jordan. Richard j'ai particulièrement apprécié toute l'attention que tu m'as accordé et merci pour toutes les discussions intéressantes que nous avons pu avoir.

Je tiens à saluer « l'esprit CEED » qui fait régner la bonne humeur et les bonnes conditions de travail du laboratoire. Merci à Harzo, Elisa, Carole M., Doudou et tous les autres qui ont croisés mon chemin durant ces 4 années passées au laboratoire Eglantine, Nico, Akkiz, Gigi, Pierre, Iona et Carole B.

Merci aux médecins du service d'Endocrinologie, de Diabétologie et des Maladies métaboliques, Dr François Moreau, Pr Nathalie Jean Didier et Dr Lucille Ratheau. Merci pour votre partage de connaissance et votre expertise en diabétologie. Merci François pour toutes les discussions enrichissantes que nous avons pu avoir.

Je tiens à remercier toutes les personnes de l'Institut Prévention Santé, diabète et recherche que j'ai pu croiser dans les couloirs tous les jours. Merci à Carine, Mr Mignot, Mr Seyller, les

personnes d'ASDIA, de RésoDiab67 et de L'ETP. Merci également à tous les bénévoles du CeeD qui apportent leur soutien sans faille.

Je remercie également le groupe Réunica et plus particulièrement Arpège Prévoyance, qui par le biais d'une subvention a entièrement couvert mon salaire durant ces 3 années de travail et sans lequel je n'aurais, par conséquent, pu mener à bien cette thèse.

Je voulais remercier mes amis pour tous les bons moments passés à Strasbourg et ceux à venir. Plus particulièrement, merci Rémi d'avoir toujours été là pour moi et de m'avoir soutenu pendant toutes ces années.

Merci à ma « bonne amie » Anaïs pour m'avoir supporté ces derniers mois et merci pour le soutien et l'amour que tu m'apportes tous les jours. Je remercie également toute ta famille qui m'a toujours accueillie les bras ouverts et qui a su me remonter le moral.

Enfin, mes derniers remerciements qui sont certainement les plus importants à mes yeux vont à mes parents et à ma sœur. Merci papa et maman de m'avoir soutenu dans mes choix depuis toujours, c'est grâce à vous si je suis arrivé jusqu'ici. Merci ma sœur préférée d'avoir toujours été là pour moi et pour le plus beau des cadeaux que tu m'ais fait avec Alex : Esteban.

SOMMAIRE

1 PROBLEMATIQUE 16
2 INTRODUCTION 16
2.1 Le pancréas, les îlots pancréatiques et l'insuline 16
2.1.1 Les îlots pancréatiques 17
2.1.2 L'insuline 18
2.2 Physiopathologie du diabète 21
2.2.1 Définition 21
2.2.2 Histoire du Diabète 22
2.2.3 Données épidémiologiques 23
2.2.4 Le diabète de type 1 25
2.2.4.1 La génétique du diabète de type 1 25
2.2.4.2 Les facteurs environnementaux liés au diabète de type 1 25
2.2.4.3 La pathogénie du diabète de type 1 26
2.2.5 Le diabète de type 2 26
2.2.5.1 La génétique du diabète de type 2 27
2.2.5.2 Les facteurs environnementaux liés au diabète de type 2 27
2.2.5.3 La pathogénie du diabète de type 2 28
2.2.6 Les complications du diabète (Perlemuter, et al., 2003) 28
2.2.6.1 Les complications métaboliques aiguës 28
2.2.6.1.1 L'hyperglycémie 28
2.2.6.1.2 L'hypoglycémie 29
2.2.6.1.3 L'acidocétose diabétique 29
2.2.6.1.4 Le coma hyperosmolaire 29
2.2.6.2 Les complications chroniques dégénératives 29
2.2.6.2.1 Microangiopathie & Macroangiopathie 29
2.2.6.2.2 Risques cardiovasculaires 30
2.2.6.2.3 Néphropathie 30
2.2.6.2.4 Rétinopathie 30
2.2.6.2.5 Neuropathie 31
2.2.6.2.6 Les risques infectieux 31
2.2.6.2.7 Le pied diabétique 31
2.2.7 Préventions des complications liées au diabète 31
2.3 Les thérapeutiques du diabète de type 1 (Monnier, 2010) 32
2.3.1 Apport exogène d'insuline 32
2.3.1.1 L'insulinothérapie 32

2.3.1.2 Les différentes catégories d'insuline de synthèse 33
2.3.2 Apport endogène d'insuline 34
2.3.2.1 La transplantation de pancréas 34
2.4 La transplantation d'îlots pancréatiques 36
2.4.1.1.1 L'histoire de la transplantation d'îlots pancréatiques 36
2.4.1.1.2 Résultats cliniques de la transplantation d'îlots pancréatiques 37
2.4.1.1.3 Procédures de la transplantation d'îlots pancréatiques 39
2.4.1.1.3.1 Le choix du receveur 39
2.4.1.1.3.2 Le choix du donneur 40
2.4.1.1.3.3 Préservation du pancréas 41
2.4.1.1.3.4 Isolement des îlots pancréatiques 45
2.4.1.1.3.5 La culture d'îlots pancréatiques 48
2.4.1.1.3.6 L'implantation des îlots pancréatiques 50
2.5 Inflammation et transplantation d'îlots pancréatiques 54
2.5.1 L'inflammation 54
2.5.2 La réponse inflammatoire aiguë 54
2.5.2.1 Les voies de signalisation 54
2.5.2.1.1 Les récepteurs de l'inflammation 57
2.5.2.1.2 Les médiateurs de l'inflammation 61
2.5.2.1.2.1 Les protéines de la phase aiguë de l'inflammation 61
2.5.2.1.2.2 Cytokines 63
2.5.2.1.3 Inflammation et stress oxydant 68
2.5.2.1.3.1 Rôle particulier de l'Hème Oxygénase-1 68
2.5.2.1.3.2 ROS & Inflammation 70
2.5.2.2 Les différentes étapes de IBMIR : Instant Blood Mediated Inflammatory Reaction 71
2.5.2.2.1 Activation de la coagulation 73
2.5.2.2.1.1 Le système de la coagulation 73
2.5.2.2.1.2 IBMIR & coagulation 75
2.5.2.2.2 Activation du système du complément 76
2.5.2.2.2.1 Le système du complément 76
2.5.2.2.3 Recrutement des cellules inflammatoires 81
2.5.2.2.3.1 Les cellules de l'inflammation 81
2.5.2.2.3.2 IBMIR et cellules inflammatoires 86
2.5.2.3 Stratégies développées pour limiter IBMIR 87
2.5.2.3.1 Le prétraitement des îlots 87
2.5.2.3.2 Le traitement du receveur 88

3 OBJECTIFS 90
4 MATERIELS ET METHODES 91
4.1 Modèles d'étude 91
4.1.1 La lignée cellulaire RINm5F 91
4.1.2 Les macrophages péritonéaux 91
4.1.3 Les îlots pancréatiques de Rat 92
4.1.4 Les traitements chimiques et pharmacologiques 94
4.1.4.1 Inhibiteur de la voie PI3K/Akt 94
4.1.4.2 Activateur de HO-1 95
4.1.4.3 Inhibiteurs de la voie TLRs 96
4.2 Etude *in vitro* de l'activité cellulaire 97
4.2.1 Test aux sels de Tétrazolium (MTS) 97
4.2.2 L'apoptose cellulaire 98
4.2.3 La viabilité des îlots pancréatiques 99
4.3 Etude *in vitro* de la fonctionnalité des îlots 99
4.4 Etude *in vitro* de la migration cellulaire 100
4.5 Dosage de la capacité antioxydante totale 100
4.6 Dosage des endotoxines 101
4.7 Etude de l'expression des ARNs 102
4.7.1 Extraction des ARNs 102
4.7.2 Transcription inverse des ARNs 102
4.7.3 Quantification des ARNs 103
4.7.4 La transplantation d'îlots pancréatiques 103
4.7.4.1 Induction du diabète par la Streptozotocine (STZ) chez le rat 103
4.7.4.2 Protocole de transplantation in situ 104
4.7.4.3 Prélèvements post transplantation 105
4.8 Etudes histologiques 106
4.8.1 Préparation des blocs d'inclusion 106
4.8.2 Coloration 106
4.8.2.1 Coloration Hématoxyline / Eosine 106
4.8.2.2 Coloration selon la méthode « Alcoholic Periodic Acid-Aqueous Schiff's » adaptée pour le dextran 107
4.8.3 Marquage immunohistochimique 107
4.8.3.1 Révélation à la diaminobenzidine (DAB) 107
4.8.3.2 Révélation avec des anticorps secondaires fluorescents 108
4.8.4 Marquage des espèces réactives de l'oxygène avec la sonde dihydroéthidium 109
4.8.4.1 Principe du marquage avec la sonde dihydroéthidium 109

4.8.4.2 Protocole du marquage avec la sonde dihydroethidium 110
4.9 Etude de l'expression protéique 110
4.9.1.1 Extraction des protéines 110
4.9.1.1.1 A partir de cellules en culture (Western blot)..... 110
4.9.1.1.2 A partir de tissus (Electrophorèse 2D) 111
4.9.1.2 Dosage des protéines..... 111
4.9.1.3 Western-Blot 111
4.9.1.4 Electrophorèse Bidimensionnelle 113
4.9.1.5 Dosage "Enzyme Linked Immunosorbent Assay" (ELISA) 116
4.9.1.5.1 Principe du dosage ELISA double sandwich 116
4.9.1.5.2 Principe du dosage ELISA multiplexe 117
4.10 Statistiques 118
5 RESULTATS ET DISCUSSIONS 119
5.1 Mise en évidence du processus inflammatoire au cours de la culture d'îlots 119
5.1.1 Discussion : Les îlots sont pro-inflammatoires et pro-oxydants en culture 137
5.2 Evaluation du rôle des TLRs dans ce processus inflammatoire *in vitro* 141
5.2.1 Discussion : Implication de la voie des TLRs..... 152
5.3 Caractérisation des réactions inflammatoires précoces chez le Rongeur..... 155
5.3.1 Discussion : Caractérisation d'IBMIR chez le Rat 167
5.4 Prévention des réactions inflammatoires précoces..... 174
5.4.1 Discussion : traiter les îlots et le receveur pour limiter l'inflammation au cours de la transplantation d'îlots 187
6 DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 190
7 BIBLIOGRAPHIE 199
8 PUBLICATIONS RELATIVES AU TRAVAIL DE THESE 218

LISTE DES FIGURES

Figure 1-1. Schéma de la face ventrale d'un pancréas humain. 16
Figure 1-2. Ilot pancréatique de Rat par microscopie à épifluorescence 18
Figue 1-3. La structure de la pré-proinsuline. 19
Figure 1-4. La régulation du métabolisme par l'insuline 20
Figure 1-5. Description de l'effet incrétine. 21
Figure 1-6. Relation entre les facteurs sociétaux et la prévalence du Diabète 23
Figure 1-7. Taux standardisés de prévalence du diabète traité, par département, en 2009 24
Figure 1-8. Pathogénie du diabète de type 1 26
Figure 1-9. Profils des différentes catégories d'insuline en fonction de leur durée d'action... 34
Figure 1-10. Taux de survie du greffon après transplantation de pancréas. 35
Figure 1-11. Principe général de la transplantation d'îlots pancréatiques 36
Figure 1-12. Evaluation du taux d'hypoglycémie sévères (A) et de l'HbA1c (B). 38
Figure 1-13. La méthode de préservation du pancréas à deux couches 44
Figure 1-14. Section en série de pancréas humain adulte 46
Figure 1-15. Préparations d'îlots pancréatiques de rat. 47
Figure 1-16. Voies de signalisation médiées par les différentes classes de PRRs 56
Figure 1-17. Vue d'ensemble de la signalisation des TLR-2 ;-3 ;-4 ;-5. 60
Figure 1-18. Evolution de la concentration en α2-Macroglobuline (α2-M) après injection d'huile de térébenthine chez le rat 62
Figure 1-19. Evolution de la concentration en interleukine-6 (IL-6) après injection d'huile de térébenthine chez le rat 62
Figure 1-20. Les différentes classes de chimiokines et leurs récepteurs 67
Figure 1-21. Rôle régulateur de l'Hème Oxygénase-1 dans la réponse inflammatoire macrophagique 69
Figure 1-22.« Instant Blood Mediated Inflammatory Reaction » selon le modèle développé par Nilsson et al.(2011) 72
Figure 1-23. La cascade de la coagulation. 74
Figure 1-24. Les trois étapes de la coagulation. 75
Figure 1-25. Le modèle « tubing loops » 75
Figure 1-26. Schéma des voies d'activation du complément et de l'interaction entre les cellules et la cascade de coagulation avec le système du complément 77
Figure 1-27. Schéma du complexe d'attaque membranaire 79
Figure 1-28. Les principaux types de cellules inflammatoires. 81
Figure 1-29. Les différentes populations de macrophages et leurs phénotypes fonctionnels .. 84
Figure 3-1. Photographie en microscopie en contraste de phase de la lignée cellulaire RINm5F (x 400). 91
Figure 3-2. Prélèvement d'un pancréas de Rat. 93
Figure 3-3. Formule structurale de la molécule de la rapamycine (Sirolimus). 94
Figure 3-4. Formule structurale de la protoporphyrine IX de cobalt. 95
Figure 3-5. Formule structurale de CLI-095. 96
Figure 3-6. Formules structurales des différents phospholipides composant la molécule OxPAPc. 97
Figure 3-7. Face caudale du foie de Rat. 105
Figure 3-8. Schéma des différentes sections du lobe caudé total transplanté et prélevé. 106
Figure 3-9. Principe du Cytokine Array (A) et du Quantiboby® Array (B) 117
Figure 4-1. (A) Viabilité et (B) fonctionnalité des îlots pancréatiques de Rat en fonction du temps de culture. 119

Figure 4-2. Profil d'expression génique de la voie des Toll-like récepteurs..... 120
Figure 4-3. Quantification relative de l'ARNm transcrit des gènes *Tlr-2, Tlr-4, MyD88* à partir d'extraits d'îlots pancréatiques de Rat par PCR arrays..... 121
Figure 4-4. Quantification relative de l'ARNm transcrit des gènes *Nf-κb2* et *Cox-2* à partir d'extraits d'îlots pancréatiques de Rat par PCR arrays..... 122
Figure 4-5. Quantification relative de l'ARNm transcrit des gènes *Ccl2* et *Cxcl10* à partir d'extraits d'îlots pancréatiques de Rat par PCR arrays..... 123
Figure 4-6. Quantification relative de l'ARNm transcrits des gènes *Il-6* et *Il-10* à partir d'extraits d'îlots pancréatiques de Rat par PCR arrays..... 124
Figure 4-7. Quantification de l'activation relative et de l'expression du gène *Tlr-2* à partir d'extrait d'îlots pancréatiques de Rat par qPCR et Western Blot..... 125
Figure 4-8. Quantification de l'activation relative et de l'expression du gène *Tlr-4* à partir d'extraits d'îlots pancréatiques de Rat par qPCR et Western Blot. 126
Figure 4-9. Quantification de l'activation relative et de l'expression du gène *Ho-1* à partir d'extraits d'îlots pancréatiques de Rat par qPCR et Western Blot. 127
Figure 4-10. Quantification de l'activation relative et de l'expression du gène *Cox-2* à partir d'extraits d'îlots pancréatiques de Rat par qPCR et Western Blot. 128
Figure 4-11. Quantification de l'activation relative génique du gène *Nf-κB2* à partir d'extraits d'îlots pancréatiques de Rat par qPCR..... 129
Figure 4-12. Quantification de l'activation relative génique du gène *Ccl2* et de la sécrétion de CCL2 à partir d'extraits d'îlots pancréatiques de Rat par qPCR et ELISA. 130
Figure 4-13. Quantification de l'activation relative génique du gène *Il-6* et de la sécrétion d'IL-6 à partir d'extraits d'îlots pancréatiques de Rat par qPCR et ELISA. 131
Figure 4-14. Quantification de l'activation relative génique du gène *Il-10* et de la sécrétion d'IL-10 à partir d'extraits d'îlots pancréatiques de Rat par qPCR et ELISA 132
Figure 4-15.Quantification des espèces réactives de l'oxygène (ROS) produites par les îlots pancréatiques de Rat à l'aide d'une sonde de Dihydroéthidium (DHE)..... 133
Figure 4-16.Quantification des anions superoxyde (O_2^-) produits par les îlots pancréatiques de Rat à l'aide d'une sonde de Dihydroéthidium (DHE) en présence de MnTMPyP. 134
Figure 4-17.Quantification du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) produit par les îlots pancréatiques de Rat à l'aide d'une sonde de Dihydroéthidium (DHE) en présence de PEG-catalase. 135
Figure 4-18. Evaluation de la capacité antioxydante totale de surnageants d'îlots pancréatiques de Rat par la méthode ABTS..... 137
Figure 4-19. Quantification de l'activation génique (qPCR) et de l'expression protéique (Western Blot) de HO-1 induites par la protoporphyrine de Cobalt (CoPP) dans des cellules RINm5f..... 142
Figure 4-20. Quantification relative de l'ARNm transcrit du gène *Ho-1* à partir d'extraits d'îlots pancréatiques de Rat par qPCR..... 143
Figure 4-21. Quantification relative de l'ARNm transcrit du gène *Cox-2* à partir d'extraits d'îlots pancréatiques de Rat par qPCR..... 144
Figure 4-22. Quantification relative de l'ARNm transcrit du gène *Nf-κb2* à partir d'extraits d'îlots pancréatiques de Rat par qPCR..... 145
Figure 4-23. Quantification relative de l'ARNm transcrit du gène Tlr-2 à partir d'extraits d'îlots pancréatiques de Rat par qPCR..... 146
Figure 4-24. Quantification relative de l'ARNm transcrit du gène *Tlr-4* à partir d'extraits d'îlots pancréatiques de Rat par qPCR..... 147
Figure 4-25. Quantification relative de l'ARNm transcrit du gène *Ccl2* et de la sécrétion de CCL2 d'îlots pancréatiques de Rat par qPCR et ELISA..... 148

Figure 4-26.Quantification de l'expression relative génique et de la la sécrétion d'Il-6 à partir d'extraits d'îlots pancréatiques de Rat par qPCR et ELISA. 149
Figure 4-27. Quantification des espèces réactives de l'oxygène (ROS) produites par les îlots pancréatiques de Rat à l'aide d'une sonde de Dihydroéthidium (DHE) après traitement. 150
Figure 4-28. Evaluation de la capacité antioxydante totale de surnageants d'îlots pancréatiques de Rat par la méthode ABTS..... 151
Figure 4-29. Schéma des effets induits par les différentes molécules utilisées 152
Figure 4-30. Schéma des effets induits par les différentes molécules utilisées 154
Figure 4-31. Contrôle de la présence (A) des îlots pancréatiques et (B) des billes de dextran après transplantation et injection intra portale chez le Rat..... 155
Figure 4-32. Quantification de l'expression de l'α2-macroglobuline plasmatique après transplantation d'îlots ou injection de billes de dextran par ELISA. 156
Figure 4-33. Quantification de l'expression de l'IL-6 plasmatique après transplantation d'îlots ou injection de billes de dextran par ELISA. 157
Figure 4-34. Représentation de l'expression de l' α2-Macroglobuline et l'IL-6 plasmatique après transplantation d'îlots (A) ou injection de billes de dextran(B) par ELISA. 158
Figure 4-35. Quantification du relargage de peptide C plasmatique d'îlots pancréatiques par ELISA..... 159
Figure 4-36. Quantification des espèces réactives de l'oxygène (ROS) produites par le foie de Rat à l'aide d'une sonde de Dihydroéthidium (DHE) après transplantation d'îlots ou injection de billes de dextran..... 160
Figure 4-37. Analyse immunohistochimique de l'infiltration leucocytaire et de la génération de thrombine après transplantation intra portale d'îlots pancréatiques..... 162
Figure 4-38. Analyse immunohistochimique de l'infiltration leucocytaire et de la génération de thrombine après injection intra portale de billes de dextran..... 163
Figure 4-39. Analyse comparative du protéome total d'extrait de foie après transplantation intra portale d'îlots par électrophorèse 2D. 165
Figure 4-40. Analyse comparative du spot 1501..... 166
Figure 4-41. Quantification par test ELISA de la sécrétion d'IL-6 par les îlots pancréatiques. 174
Figure 4-42. Quantification des espèces réactives de l'oxygène (ROS) produites par les îlots pancréatiques de Rat à l'aide d'une sonde de Dihydroéthidium (DHE) après traitement. 176
Figure 4-43. Quantification l'expression protéique (Western Blot) de HO-1 induite par l'IL-10 (IL-10) et la rapamycine (rapa) dans des îlots pancréatiques de rat..... 177
Figure 4-44. Evaluation de la migration macrophagique induite par le surnageant d'îlots traités ou non. 178
Figure 4-45. Evaluation de l'activité mitochondriale macrophagique induite par la rapamycine. 179
Figure 4-46. Evaluation de l'apoptose macrophagique induite par la rapamycine 180
Figure 4-47. Evaluation de la migration macrophagique induite par la rapamycine 181
Figure 4-48. (A) Localisation des anticorps anti-cytokines (B) analyse des surnageants de culture macrophagiques par Cytokine Antibody Arrays®. 182
Figure 4-49. Quantification par test ELISA de la sécrétion d'IL-6 macrophagique de cytokines..... 182
Figure 4-50. Quantification par test ELISA de la sécrétion d'IL-10 macrophagique de cytokines..... 183
Figure 4-51. Quantification par test ELISA de la sécrétion de TNF-α macrophagique de cytokines..... 184
Figure 4-52. Quantification du taux de phosphorylation des protéines gènes mTOR par Western Blot..... 185

Figure 4-53. Quantification du taux de phosphorylation des protéines gènes JAK-2 par Western Blot..... 186
Figure 5-1. Schéma récapitulatif du processus conduisant au phénotype pro-inflammatoire et pro-oxydant de l'îlot..... 192
Figure 5-2. Schéma récapitulatif du processus inflammatoire précoce après transplantation d'îlots pancréatiques intraportale. 193
Figure 5-3. Effets biologiques des produits de l'hème oxygénase (HO-1)..... 196

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1-1. Caractéristiques des diabètes de type 1 et 2 22
Tableau 1-2. Critères simplifiés d'éligibilité et d'exclusion pour la transplantation d'îlots pancréatiques 39
Tableau 1-3. Conversion en îlots équivalent. 48
Tableau 1-4. Quantité d'îlots requise pour inverser l'hyperglycémie dans divers sites de trasnplantation 51
Tableau 1-5. Activateurs endogènes des TLR. 58
Tableau 1-6. Les différentes familles de cytokines 63
Tableau 3-1. .Récapitulatif des anticorps utilisés pour les études d'immunohistochimie 109
Tableau 3-2. Récapitulatif des anticorps utilisés pour les analyses par Western blot 112
Tableau 3-3. Récapitulatifs des conditions de focalisations 114
Tableau 3-4. Récapitulatif des kits ELISA utilisés 116
Tableau 3-5. Tableau récapitulatif des cytokines présentes sur le « RayBio® Rat AntibodyArray 1 ». 118
Tableau 4-1. Résumé des variations (par rapport à T0) de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), d'anion superoxyde (O2-) et de peroxyde d'hydrogène (H2O2) par les îlots pancréatiques au cours du temps de culture. 136
Tableau 4-2. Identification des protéines contenues dans les spots observés en électrophorèse 2D par spectrométrie de masse maldi tof tof 166

LISTE DES ABREVIATIONS

AAT - alpha 1-Antitrypsine
AB/AM - Antbiotique / Antimycotique
ABTS - 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-aicde sulphonique)
ACDC - « Adiponectin, C1Q and collagen domain containing »
ACT - alpha 1-Antichymotrypsine
ADA - « American Diabetes Association »
ADN - Acide désoxyribonucléique
ADNc - Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADP - Adénosine diphosphate
AEC - 3-Amino-9-ethylcarbazole
APC - « Activated proteinC »
ARN - Acide ribonucléique
ARNm - Acide ribonucléique messager
ATP - Adénosine-5'-triphosphate
BSA - Albumine de sérum bovin
CAM - Complexe d'Attaque Membranaire
CAPN10 - « Calcium-activated neutral proteinase 10»
CD - Cluster de differentiation
cGMP - « current good manufacturing practices»
CITR - « Collaborative Islet Transplant Registry »
CIVD - coagulation intravasculaire disséminée
CMH - Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA - Cellules présentatrices d'antigène
CRP - Protéine C-réactive
CSF - « Colony stimulating factor»
CTLA4 -« Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4»
DAMP - « Damage associated molecular pattern»
DAPI - 4',6'-diamidino-2-phénylindole
DC - Cellule dendritique
DHA - Dihydroxyacétone
DHE - Dihydroethidium
DMSO - Diméthylsulfoxyde
DO - Densité optique
DT1 - Diabète de type 1
DT2 - Diabète de type 2
DTT - Dithiothréitol
ELISA - « Enzyme-linked immunosorbent assay»
ENPP1 - « Ecto-nucleotide pyrophosphatase / phosphodiesterase»
Mal – « MyD88-adaptor like »
MALDI / TOF - « Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation / Time of flight mass»
MAPK - « Mitogen-activated protein kinases»
MASP - « MBL-associated serine protease»
MBL - « Mannose-binding lectin »
MEC - Matrice Extra Cellulaire »
mIAA - « Micro Insulin Autoantibodies »
MnTMPyP - Manganese(III) tetrakis(1-methyl-4-pyridyl)porphyrin »
mTOR – « mammalian Target of rapamycin »
MTS - « 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium »
MyD88 - « Myeloid differentiation factor 88 »
NADH - « Nicotinamide adénine dinucléotide réduit »
NF-κB - « Nuclear factor-kappa B»
NK - Natural killer
NLR - «NOD-like receptors »
NO - Oxyde Nitrique
NPH - « Neutral protamine hagedorn »
OMS - Organisation mondiale de la santé
OxPAPc - Oxidized 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
PAMP – « Pathogen Associated Molecular Pattern »
PBS - « Phosphate buffered saline »
PCR - « Polymerase chain reaction »
PDGF - « platelet-derived growth factor»
PEG - Polyéthylène glycol
PFC - Perfluorocarbure
PGM - Phosphoglucomutase
PI - Iodure de propidium
PI3K - Phosphatidylinositol 3-kinase
PPARδ - «Peroxisome proliferator-activated receptor δ»
PRR - « Pathogen recognition receptor »
PTPN22 - « Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22 »
PVDF - «Polyvinylidene difluoride »
RE - Réticulum endoplasmique
RLR - «RIG-I-like Receptor »
ROS - «Reactive oxygen species »
SAA - «Sérumamyloïde A »

FDA - Fluoréscéine diacétate
FKBP12 - « FK506-binding protein 12»
fMLP - formyl-Met-Leu- Phe
GAD65 – Acide Glutamate decarboxylase 65
GRP78 – «Glucose regulated protein 78 kDa»
HbA1c - Hémoglobine glyquée
HBSS - « Hank's balanced salt solution»
HDL - « High density lipoprotein»
HIF - « Hypoxia inducible factors »
HMGB1 - « High-mobility group protein 1»
HNF4A - « Hepatocyte nuclear factor 4 alpha»
HO-1 - Hème oxygénase-1
HSP - « Heat shock protein »
IBMIR - « Instant blood mediated inflammatory reaction »
ICAM - « Intercellular adhesion molecule»
IEQ - « Islets equivalent »
IFIH1 - « Interferon-induced helicase C domain-containing protein 1"
IFN - Interféron
Ig - Immunoglobuline
IL - Interleukine
IL-1ra - « Interleukin 1 receptor antagonist »
IL-2Rα - « Interleukin 2 receptor alpha »
IMC - Indice de Masse Corporelle
IRAK - « Interleukin-1 receptor-associated kinase »
IRF - « Interferon regulatory factor »
KCNJ11 - « potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 11»
LAL - Lysat d'amoebocyte de limus
LDL - « Low Density Lipoprotein »
LPS - Lipopolysaccharide
SARM - « sterile alpha and HEAT Armadillo motifs»
SCR1 - « soluble complement receptor1 »
SDS - Sodium Dodecyl Sulfate
SPI-3 - Sérine protéase A3N
STZ - Strepotozotocine
SVF - Sérum de veau fœtal
TAT - Thrombine / antithrombine
TBS - « Tris buffered saline »
TCF7L2 - « Transcription factor 7-like 2 »
TEAC - « Trolox equivalent antioxidant capacity"
TF - Facteur tissulaire
TGFβ - « Transforming growth factor β »
TIR - Toll/interleukine-1 récepteur
TK - T-Kininogène
TLM - « Two layered method »
TLR - Toll-like récepteurs
TMB - Tétraméthylbenzidine
TNF - « Tumor Necrosis Factor »
TPI - Triose phosphate isomérase
TRAM - «TRIF-related adaptor molecule »
Treg - Cellule T régulatrice
TRIF - « TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β »
UKPDS - « United Kingdom Prospective Diabetes Study»
VCAM - « Vascular cell adhesion molecule »
VEGF - « Vascular endothelial growth factor »
VLDL - « Very low density lipoprotein»
ZnT8 - « Zinc transporter 8 »
α2-M - « alpha2-Macroglobuline »
α1-CPI - « alpha1-cysteine proteinase inhibitor »

1 PROBLEMATIQUE

De l'isolement des îlots pancréatiques à leur implantation, l'inflammation est omniprésente au cours de la transplantation d'îlots pancréatiques. En effet, le greffon est soumis à un stress physique et chimique considérable au cours des procédures préimplantatoires. Pourtant, le maintien d'une inflammation contrôlée est essentiel pour préserver la survie et la fonctionnalité du greffon à court et long terme. Ce travail de thèse a pour but d'identifier précisément les mécanismes inflammatoires à l'origine de la perte précoce des îlots et de déterminer des cibles thérapeutiques pour limiter ces réactions inflammatoires.

2 INTRODUCTION

2.1 Le pancréas, les îlots pancréatiques et l'insuline

- Le pancréas

Le pancréas est une glande mixte qui pèse entre 70 à 110g (en moyenne 80g) chez l'homme adulte. Il se divise en trois parties : la tête, le corps et la queue. De forme triangulaire, il est situé en grande partie derrière l'estomac, sa tête se coiffant de l'anse duodénale et sa queue se poursuivant par la rate (**Fig. 1-1**).

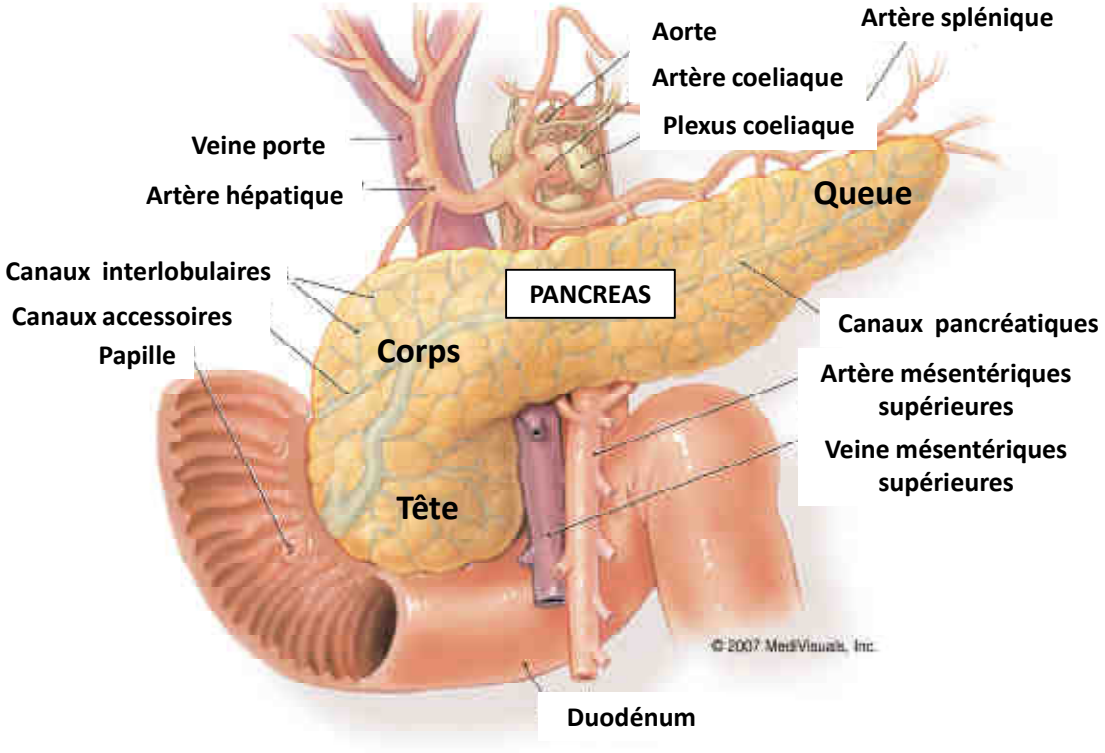


Figure 2-1. Schéma de la face ventrale d'un pancréas humain.
Source : http://www.arizonatransplant.com

Le pancréas comporte deux parties anatomiquement et physiologiquement différentes :

- Une partie exocrine composée par les cellules acineuses du pancréas qui produisent et sécrètent des enzymes digestives et des ions bicarbonate (HCO_3^-). HCO_3^- est un anion basique qui neutralise l'acide chlorhydrique (HCl) produit dans l'estomac. Les protéases, nucléases, et lipases digestives synthétisés permettent de dégrader les nutriments. Les enzymes pancréatiques et HCO_3^- sont collectés dans les canaux pancréatiques qui se déversent dans le duodénum (Suckale & Solimena, 2008).

- Une partie endocrine formée de nombreux îlots pancréatiques (décrits par Langerhans), notamment dans la région de la queue de la glande et près des vaisseaux (au nombre de 1 à 2 millions). Leur poids total ne constitue qu'environ 1% du poids total de la glande.

Ainsi, la majorité des cellules du pancréas travaille pour la digestion d'un repas alors qu'une infime minorité, les îlots, envoie des signaux à d'autres organes qui collaborent pour réguler le métabolisme et spécifiquement pour maintenir l'homéostasie glycémique.

2.1.1 Les îlots pancréatiques

Les îlots pancréatiques forment une partie relativement modeste, mais vitale de la masse pancréatique. Il s'agit d'un groupe de cellules organisées dans des sphères minuscules ou îlots d'environ 150-200 µm de diamètre. Les îlots pancréatiques forment un dispositif de détection des éléments nutritifs. Ils sont étroitement connectés à l'organe source, l'intestin, et aux organes cibles, le foie, les muscles et les cellules graisseuses par un réseau de capillaires très développé. En effet, les îlots sont très bien vascularisés et reçoivent environ 15% des ressources sanguines du pancréas (soit 10 fois plus de sang par volume de tissu que tout le compartiment exocrine) (Henderson & Moss, 1985). De plus, la sécrétion d'insuline dans le flux sanguin est facilitée par la présence de capillaires insulaires plus grands (5 vs. 4 micromètres) et d'un endothélium fenestré qui augmente la perméabilité (Bendayan, 1993).

Les îlots (**Fig. 1-2**) sont composés de trois types cellulaires majeurs et plusieurs types de cellules mineures : les cellules ß, les plus nombreuses (2/3 des cellules insulaires), qui sécrètent l'insuline, une hormone hypoglycémiante ; les cellules α qui sécrètent le glucagon, une hormone hyperglycémiante ; les cellules δ qui sécrètent la somatostatine et les cellules PP qui sécrètent le polypeptide pancréatique qui exerce des effets sur le tractus digestif. En moyenne, dans le pancréas humain, les cellules des îlots produisent de l'insuline (67%) du glucagon (10%), de la somatostatine (3%), ou du polypeptide pancréatique (19%)(Stefan, et

al., 1982). Ces chiffres masquent toutefois des variations considérables entre les régions distinctes du pancréas, entre les sexes, et entre les espèces.

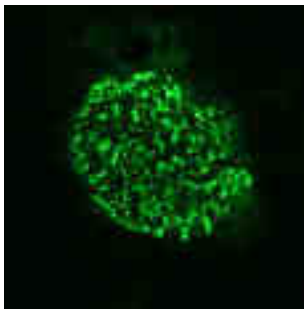


Figure 2-2. Ilot pancréatique de Rat par microscopie à épifluorescence

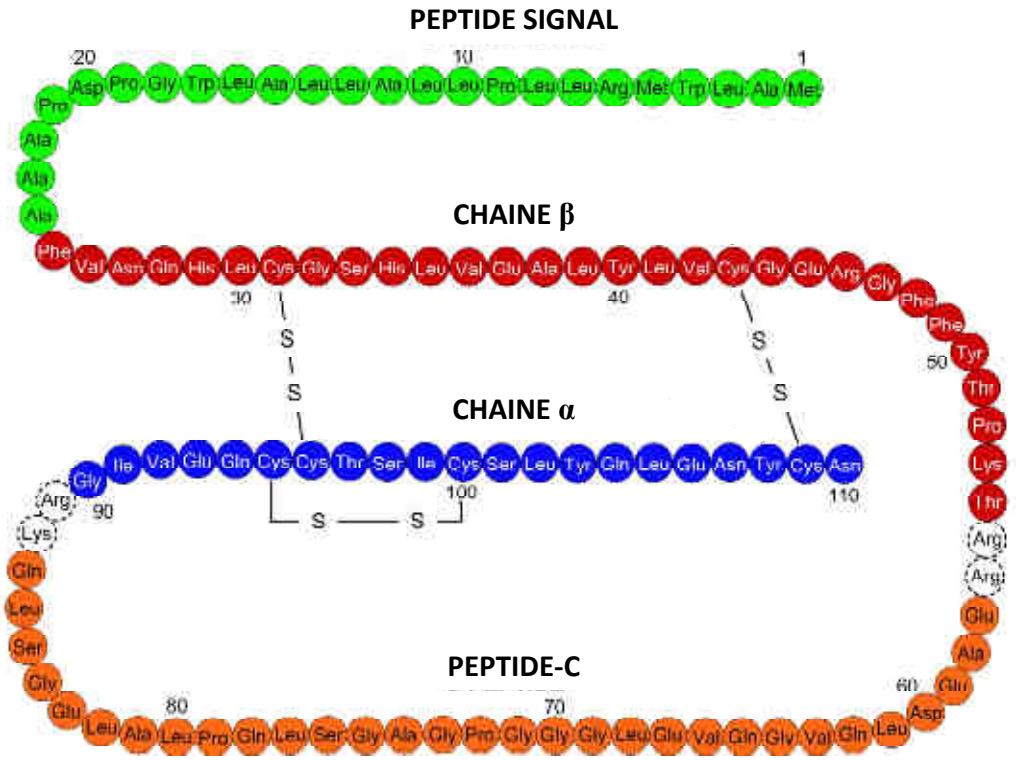
Le marquage de l'îlot est réalisé par immunohistochimie à l'aide d'un anticorps primaire anti-insuline et d'un anticorps secondaire couplé à l'Alexa 488. (Cliché du laboratoire)

Par exemple, chez la souris, les îlots produisent plus d'insuline et moins de glucagon par rapport à l'homme. De plus, les cellules insulaires de souris sont réparties avec un noyau central de cellules ß et une enveloppe contenant les types de cellules restantes, alors que dans les îlots humains, la distribution apparaît aléatoire (Brissova, et al., 2005; Cabrera, et al., 2006).

2.1.2 L'insuline

L'insuline est une hormone peptidique hétérodimérique formée d'une chaîne A de 21 acides aminés et d'une chaîne B de 30 acides aminés unies par 2 ponts disulfure interchaînes. La chaîne A porte en outre un pont disulfure intrachaîne (Moussard, 2006).

Dans le pancréas, l'insuline est synthétisée sous la forme d'une préprohormone (pré-proinsuline) constituée d'une seule chaîne peptidique et biologiquement peu active. L'élimination du peptide signal permet l'obtention de prohormone (proinsuline) qui subit une maturation en hormone active dans l'appareil de golgi. La prohormone est alors scindée en un peptide C, constitué de 33 acides aminés et en insuline active.



Figue 2-3. La structure de la pré-proinsuline.

(Støy, et al., 2007)

Sa sécrétion est, pour une large part, sous la dépendance du glucose. L'insuline est la seule hormone hypoglycémiante. Malgré les périodes de prise alimentaire et de jeûne, le glucose plasmatique reste compris entre 4 et 7 mmol.l^{-1} chez des individus normaux. Ce contrôle strict est régulé par l'équilibre entre l'absorption du glucose dans l'intestin, sa production hépatique, et son absorption ou utilisation dans les tissus périphériques. L'insuline exerce son rôle de principal régulateur de la glycémie en augmentant l'absorption du glucose dans le foie et le tissu adipeux, la lipogenèse hépatique et musculaire, la glycogénogenèse et la synthèse de protéines. Elle agit aussi en inhibant la lipolyse, la glycogénolyse et la dégradation des protéines (**Fig.1-4**). De plus, l'insuline stimule la croissance et la différenciation cellulaire, et favorise le stockage de substrats dans le tissu adipeux (Saltiel & Kahn, 2001).

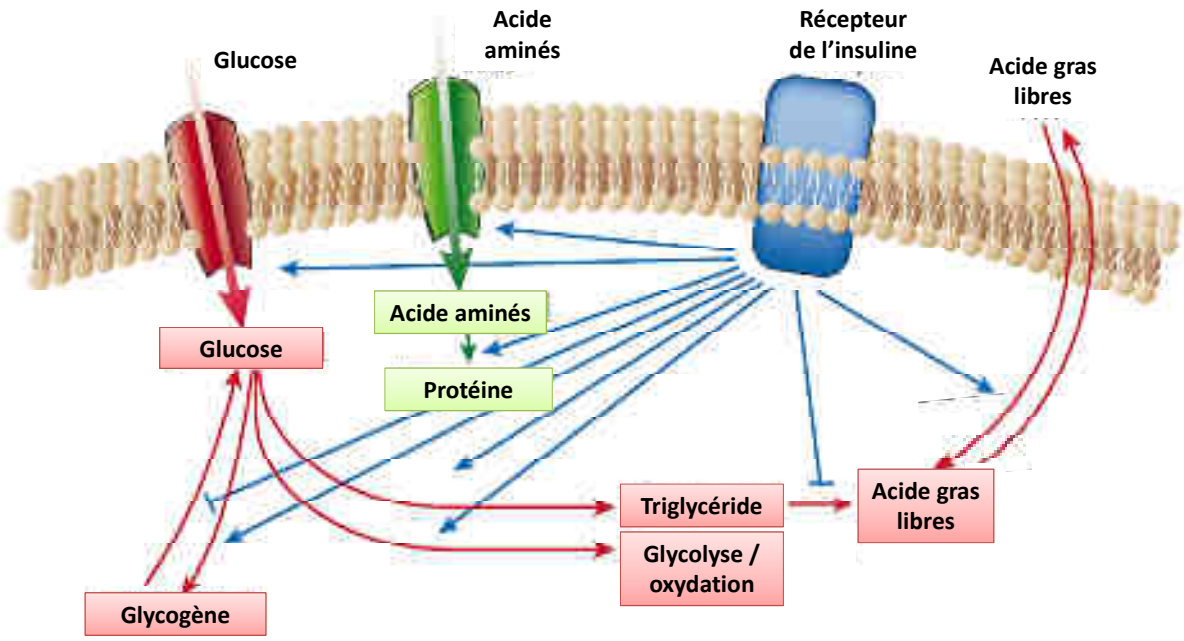


Figure 2-4. La régulation du métabolisme par l'insuline

L'insuline favorise la synthèse et le stockage des glucides, des lipides et des protéines, en inhibant leur dégradation et leur libération dans la circulation. L'insuline stimule l'absorption du glucose, des acides aminés et d'acides gras dans les cellules. Elle augmente l'expression ou l'activité d es enzymes qui catalysent la synthèse du glycogène, des lipides et protéines, tout en inhibant l'activité ou l'expression des enzymes qui catalysent la dégradation. (Saltiel & Kahn, 2001)

Toutefois, il a été démontré qu'une montée glycémique identique après une charge orale ou intraveineuse en glucose induit une réponse insulinique nettement plus importante lorsque le glucose est administré par voie orale (Nauck, et al., 1986). Cet effet est attribué à la situmulation par le bol alimentaire d'hormones intestinales désignées sous le nom d'incrétines (Vilsbøll & Holst, 2004). Parmi ces hormones, le GLP-1, est libéré au niveau du tube digestif dans les minutes qui suivent l'ingestion d'un repas. Sa libération est suivie d'une sécrétion d'insuline glucodépendante. Le GLP-1 est donc considéré comme une hormone insulinotrope glucodépendante qui ne stimule l'insulino-sécrétion qu'en présence de glucose intestinal. L'effet incrétine est responsable de 60 % de la production d'insuline (**Fig. 1-5**).

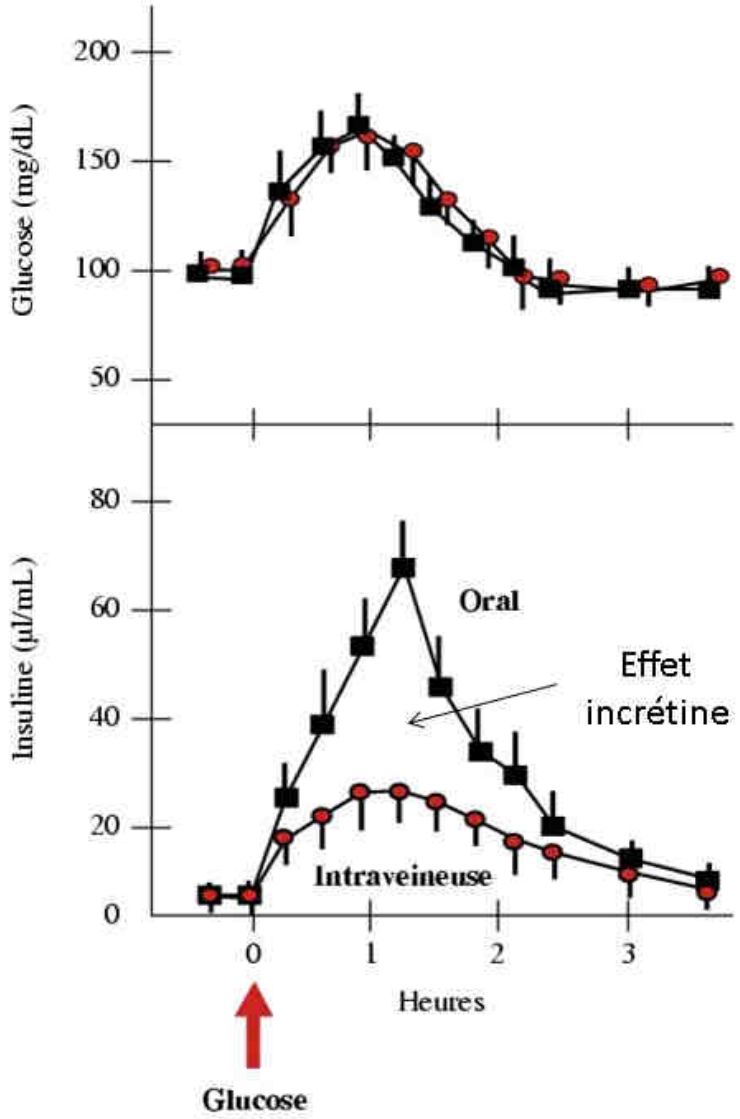


Figure 2-5. Description de l'effet incrétine.

En réponse à une absorption orale de glucose, un messager hormonal, le GLP-1 est synthétisé par les cellules L intestinales, libéré dans la veine hépatoportale ce qui aboutit à la stimulation de la sécrétion d'insuline. (Burecelin, et al., 2007).

2.2 Physiopathologie du diabète

2.2.1 Définition

Le diabète est défini par une hyperglycémie chronique liée soit à un trouble de la sécrétion de l'insuline, soit à un trouble de l'action de l'insuline, soit les deux. Selon les critères actuels, le diabète est défini par une glycémie plasmatique à jeun supérieure à 1,26 g/l. L'hyperglycémie chronique est la cause principale de la survenue des complications dégénératives de la maladie diabétique mais celles-ci sont néanmoins susceptibles d'être évitées ou tout au moins retardées par un traitement adéquat.

Actuellement, la classification nosologique du diabète utilisée est celle publiée en 1997 par un groupe d'experts sous la responsabilité de l'Association Américaine du Diabète (ADA) et entérinée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS).

Cette classification met en exergue les différences de physiopathologie des diabètes de type 1 (DT1) et de type 2 (DT2). Dans le DT1, l'hyperglycémie est due à une carence absolue en insuline, secondaire à la destruction auto-immune des cellules β des îlots de Langerhans. Dans le DT2, la carence en insuline est relative et l'hyperglycémie est liée à l'association, à des degrés divers, d'une insulinorésistance et d'une insulinopénie. Ces 2 types de diabète ont de nombreuses caractéristiques cliniques et biologiques différentes (**Tab. 1-1**).

	Diabète de type 1	Diabète de type 2
Fréquence relative	10-15%	85-90%
Antécédents familiaux	+	+++
Découverte de la maladie	Brutale & avant 30 ans	Progressive & après 40 ans
Surpoids	Absent	Présent
Symptômes	+++	-
Insulinosécrétion	Absente	Persistante
Auto-anticorps	Oui	Non
Traitement	Insuline	Régime, exercice, ADO

Tableau 2-1. Caractéristiques des diabètes de type 1 et 2
(Rodier, 2001)

D'autre part, les diabètes dits "spécifiques" sont secondaires à une maladie pancréatique, à une endocrinopathie, iatrogènes ou encore liés à des anomalies génétiques. Le diabète gestationnel correspond à un trouble de la tolérance glucidique apparaissant entre la 24ème et la 28ème semaine de grossesse et disparaissant après l'accouchement. Enfin, la classe "altération de l'homéostasie glucidique" correspond à des anomalies minimes de la régulation glycémique qui traduisent une augmentation du risque de diabète et de maladie cardiovasculaire.

2.2.2 Histoire du Diabète

Le terme diabète vient du grec « *dia-baïno* » qui signifie traverser. Il caractérisait des personnes ayant une maladie dramatique qui entraînait une mort rapide chez des sujets jeunes. Brièvement résumé, l'histoire du diabète commence au XVIIème siècle notamment avec Thomas Willis qui fut l'un des premiers à décrire la présence de sucre dans l'urine des

patients diabétiques. Il distingue alors la maladie diabétique en 2 classes : le diabète sucré dit « mellitus » et le diabète insipide dit « insipidus ». En 1869, Paul Langerhans montre que le pancréas contient non seulement des cellules secrétant du suc pancréatique, mais un autre type de cellules dont il ignore la fonction. Ces cellules porteront plus tard son nom. Ultérieurement, les travaux de Claude Bernard sur la fonction glycogénique du foie permettront à Oscar Minkowski et Joseph Von Mehring d'établir le rôle du pancréas en 1886 à l'université de Strasbourg. Enfin, l'insuline sera découverte en 1921 par Frederick Banting et Charles Best.

2.2.3 Données épidémiologiques

Selon l'OMS, 366 millions de personnes dans le monde étaient atteintes de diabète en 2011. Les prévisions pour 2030 ne sont pas très encourageantes et envisagent 552 millions de cas. En 2011, le diabète est à l'origine de 4,6 millions de décès**.** Ces chiffres peuvent notamment s'expliquer par le lien étroit qu'il existe avec le mode de vie, incluant l'inactivité physique et les choix alimentaires (Cecchini, et al., 2010). En effet, la croissance économique et le développement facilitent l'accès aux commodités modernes, augmentent ainsi l'apport calorique et réduisent les dépenses énergétiques (Hawkes, 2006). D'autre part, l'urbanisation promouvoit également la sédentarité à travers les transports mécanisés, l'exposition au marketing et l'accès à une alimentation industrielle (Sturm, 2004) (**Fig. 1-6**).

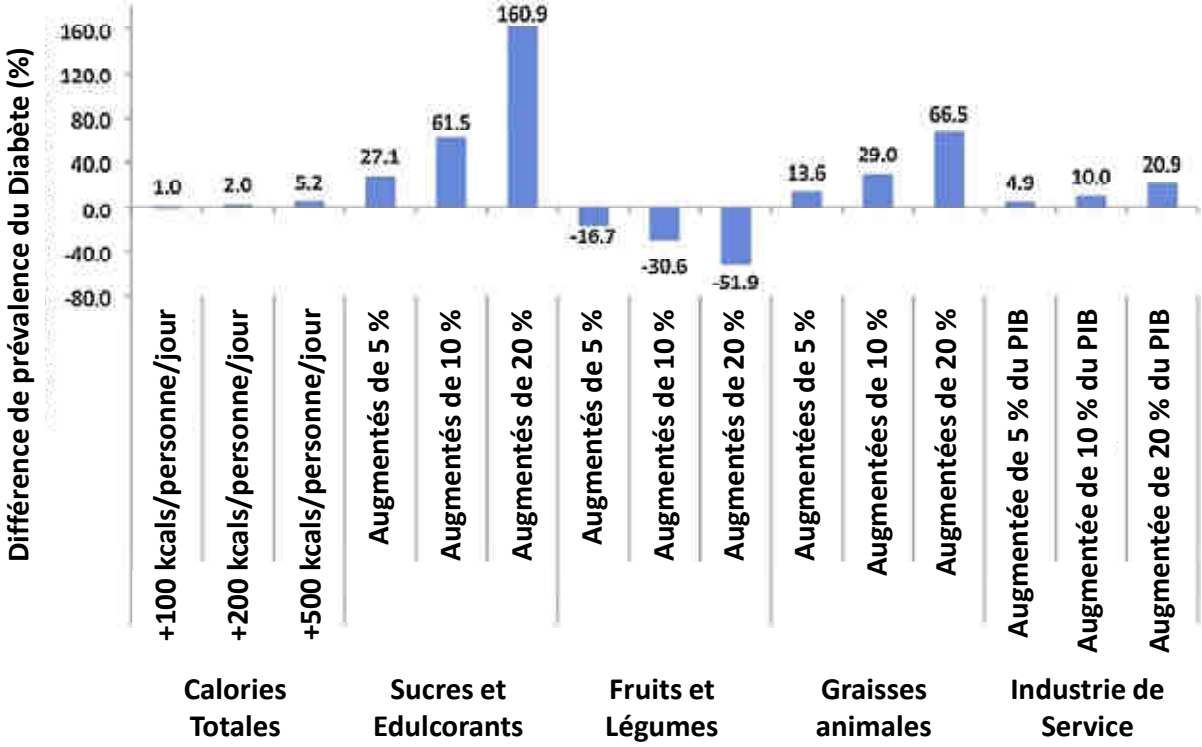


Figure 2-6. Relation entre les facteurs sociétaux et la prévalence du Diabète (Siegel, et al., 2011)

D'après l'institut de veille sanitaire, en 2009 la prévalence du diabète traité pharmacologiquement était estimée à 4,4% de la population résidant en France. Ainsi le nombre de personnes diabétiques a été estimé à environ 2,9 millions de personnes, soit au moins 160 000 personnes diabétiques de type 1 (5,6%), au moins 2,7 millions de personnes diabétiques de type 2 traitées pharmacologiquement (91,9%), et environ 70 000 autres types ou cas non typés de diabète traité pharmacologiquement (2,5%). En 2009, il existe de fortes variations des taux standardisés de prévalence du diabète traité pharmacologiquement entre les zones géographiques françaises considérées. Par exemple, une prévalence particulièrement élevée était observée dans les Départements d'Outre Mer : La Réunion 8,8%, Guadeloupe 8,1%, Martinique 7,4%, Guyane 7,3%. En métropole, le quart nord-est n'est pas épargné avec une prévalence de 5,4% dans le Nord-Pas-De-Calais et de 5% en Alsace (**Fig. 1-7**).

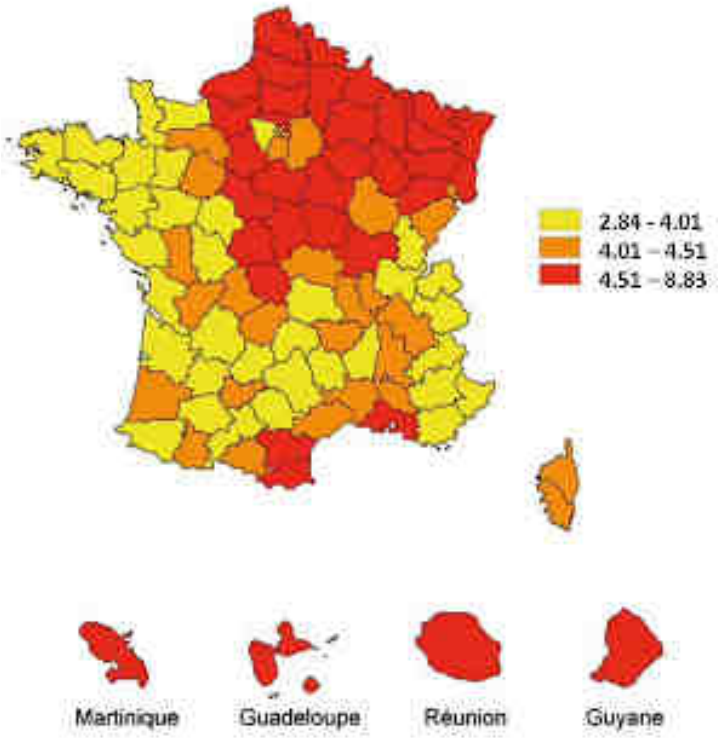


Figure 2-7. Taux standardisés de prévalence du diabète traité, par département, en 2009

Source : http://www.invs.sante.fr

Par rapport à ses voisins européens, la France aurait une prévalence du diabète diagnostiqué, à âge et sexe égaux, qui se situerait dans la moyenne. Toutefois, ces estimations reposent sur des définitions du diabète qui varient d'un pays à l'autre. En 2005, la prévalence était estimée en France à 3,2 %, une estimation proche de celle des Pays-Bas (3 %), du Danemark (3,1 %) et de l'Angleterre (3,3 %), alors que des taux plus élevés étaient retrouvés en Autriche (3,8 %) et au Luxembourg (3,5 %), et des taux plus bas en Finlande (2,6 %), Écosse (2,7 %), Belgique (2,9 %) et Suède (2,8 %).

2.2.4 Le diabète de type 1

Le DT1 est une maladie auto-immune déclenchée par un ou plusieurs facteurs liés à l'environnement. Il survient chez des sujets génétiquement prédisposés (Atkinson & Eisenbarth, 2001). Le déclenchement de la réaction auto-immune induit la destruction progressive des cellules β des îlots de Langerhans qui conduit à une insulinopénie progressive.

2.2.4.1 La génétique du diabète de type 1

Les formes monogéniques de DT1 sont rares et sont typiquement accompagnées par d'autres manifestations auto-immunes liées aux perturbations de voies régulatrices communes. Les gènes liés à une susceptibilité accrue de développer un DT1 sont nombreux et sont impliqués pour la plupart d'entre eux dans la réponse immune. Toutefois, l'haplotype hétérozygote DR3/4-DQ8 codant pour le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) représente le plus grand facteur de risque (30 à 50%) de développer un DT1 (Noble, et al., 1996). D'autres loci indépendants du CMH contribuent au risque de développer la maladie, mais avec des effets plus faibles. Parmi eux figurent entre autres, certaines régions du gène de l'insuline, « Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22 » (PTPN22), « Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 » (CTLA4), « Interleukin 2 receptor alpha »(IL2Rα) et « Interferon-induced helicase C domain-containing protein 1 » (IFIH1) (Van Belle, et al., 2011). De plus, les séquençages récents du génome humain entier ont établi de nouveaux le lien entre 40 loci et un risque accru de développement du DT1 (Barret & al, 2009).

2.2.4.2 Les facteurs environnementaux liés au diabète de type 1

La présence d'auto-anticorps dirigés contre les îlots pancréatiques avant le début clinique de la maladie suggère qu'il existe une séquence d'évènements précédant l'hyperglycémie. Les années, les mois qui séparent l'initiation de la détection des évènements diabétogènes posent donc le problème de la découverte des facteurs environnementaux déclenchants. Pour expliquer ces évènements, des liens ont été établis entre des infections virales avec des entérovirus (Filippi & von Herrath, 2008) et la survenue du diabète de type 1. Les virus ne sont pas les seuls à être mis en cause, les bactéries via la flore intestinale pourraient jouer leur propre rôle. En effet, la paroi intestinale des modèles de DT1 et des patients diabétiques ne semble pas avoir la même capacité à former une barrière séparant efficacement les bactéries du système immunitaire. Ce manque d'étanchéité pourrait ainsi augmenter l'exposition des

antigènes bactériens au système immunitaire et favoriser la survenue de l'auto-immunité diabétique (Vaarala, et al., 2008).

2.2.4.3 La pathogénie du diabète de type 1

L'hypothèse du déclin linéaire des cellules β pancréatiques établie par Eisenbarth en 1986 reste le modèle de référence pour le DT1 (**Fig.1-8**) (Eisenbarth, 1986). Selon ce modèle, un individu génétiquement prédisposé rencontre à un moment donné certains agents environnementaux qui vont initier l'auto-immunité dirigée contre les îlots pancréatiques. Ce processus va conduire à un déclin linéaire de la masse β pancréatique, le développement d'auto-anticorps, l'hyperglycémie et éventuellement la perte complète du peptide-C. Les principaux auto-anticorps sont réactifs avec 4 autoantigènes d'îlots : « Insulinoma-associated antigen-2 » (I-A2) ; l'insuline (mIAA), l'acide glutamique décarboxylase 65 (GAD65) et le transporteur du Zinc 8 (ZnT8) (Van Belle, et al., 2011).

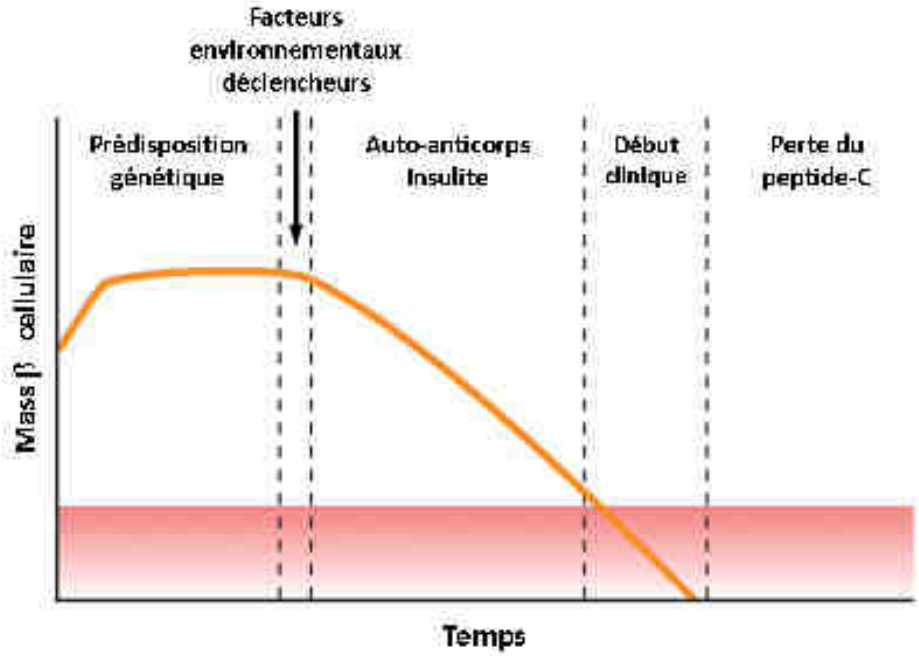


Figure 2-8. Pathogénie du diabète de type 1
(Van Belle, et al., 2011)

2.2.5 Le diabète de type 2

Le DT2 représente 90% des diabètes rencontrés dans le monde. Il est en grande partie le résultat d'une surcharge pondérale et de la sédentarité. Même si les causes directes du DT2 sont partiellement comprises, il est maintenant clairement établi que le DT2 est une pathologie multifactorielle. Comme pour le DT1, des facteurs génétiques et environnementaux contribuent à la survenue de la maladie

2.2.5.1 La génétique du diabète de type 2

Le fait que le DT2 soit une maladie génétique est bien connu des cliniciens par la façon dont il survient dans certains cercles familiaux, et dans certaines ethnies à risque. Cela fait déjà 2 décennies que le lien génétique est établi, notamment avec la célèbre étude de jumeaux monozygotes en Grande-Bretagne qui montrait un taux de concordance de 100% pour cette maladie (Barnett, et al., 1981). Toutefois, ce type d'étude ne fournit aucune information sur l'impact de la génétique dans cette maladie. Existe-t-il un gène défectueux qui détériore directement le système de l'homéostasie glucidique ? Alternativement, existe-t-il une ou plusieurs anomalies génétiques qui prédisposent à la maladie ? Bien que les causes génétiques de plusieurs formes monogéniques de diabète soient établies, seulement quelques variabilités conduisant à un DT2 commun ont été clairement identifiées et confèrent individuellement seulement un faible risque de développer un DT2 (Permutt, et al., 2005). Des études de lien ont reporté plusieurs régions chromosomiques liées au DT2 et ont permis d'identifier des variabilités génétiques présumées responsable dans « Calcium-Activated Neutral Proteinase 10 » (CAPN10), « Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 1 » (ENPP1), « Hepatocyte nuclear factor 4 alpha » (HNF4A) et « adiponectin, C1Q and collagen domain containing » (ACDC). En parallèle, certains gènes candidats ont été reportés comme des loci associés au DT2. Plus précisément, les variabilités observées pour le récepteur nucléaire « peroxisome proliferator-activated receptor δ » (PPARδ) et le canal potassique « potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 11 » (KCNJ11) font parties des associations les plus convaincantes. L'association la plus forte du DT2 a été localisée avec le facteur de transcription « Transcription factor 7-like 2 » (TCF7L2) et a été constamment répliquée dans plusieurs populations (Sladek, et al., 2007)

2.2.5.2 Les facteurs environnementaux liés au diabète de type 2

Le génotype diabétique cause uniquement une prédisposition pour l'intolérance au glucose. Toutefois, le développement du phénotype diabétique dépend des facteurs environnementaux, le mode d'action de certains paraissant évident et d'autres moins. Comme attendu, l'association positive entre l'obésité et le manque d'activité physique dans le développement DT2 existe. Toutefois les individus qui ne fument pas et qui ont une consommation d'alcool modérée sont mieux protégés (Hu, et al., 2001). D'autre part, de nombreuses études ont montré une association forte entre une alimentation riche en calories, le manque d'activité physique et le risque de développer un diabète (Leahy, 2005).

2.2.5.3 La pathogénie du diabète de type 2

Les sujets atteints de DT2 présentent plusieurs perturbations de l'homéostasie glucidique, dont une perturbation de la sécrétion d'insuline, une insulino-résistance dans les muscles, le foie et les adipocytes et des anomalies de la prise de glucose splanchnique (DeFronzo, 1997).
L'insulino-résistance dans les muscles et le foie est une caractéristique majeure du DT2. Chez les sujets obèses, le tissu adipeux viscéral libère une grande quantité d'acides gras libres qui sont transportés au niveau du foie. Ces acides gras libres favorisent une surproduction de glucose et la synthèse de triglycérides. Au niveau musculaire, l'augmentation des acides gras circulants rend leur utilisation préférentielle tandis que le stockage et l'utilisation du glucose musculaire sont diminués. Ainsi, l'augmentation de la production de glucose hépatique détermine l'élévation du glucose plasmatique à jeun chez les individus atteints de DT2. Cette augmentation s'explique par l'insulino-résistance, mais également par une augmentation de la production de glucagon.
Bien que l'insulino-résistance soit établie, la tolérance glucidique reste normale grâce à l'augmentation de la sécrétion d'insuline. L'hyperinsulinisme vise à compenser l'insulino-résistance afin de permettre aux cellules de recevoir le glucose dont elles ont besoin. L'hyperinsulinisme peut se prolonger pendant plusieurs années et maintenir une normoglycémie. Toutefois, cette hyperinsulinisme va conduire à long terme à l'épuisement progressif du pancréas et donc à l'incapacité du pancréas à sécréter les quantités d'insuline nécessaires à la régulation de la glycémie. De plus, la production excessive d'acides gras par le tissu adipeux chez les sujets qui ont un surpoids et l'élévation à bas bruit de la glycémie contribuent d'ailleurs à une insulinopénie progressive.

2.2.6 Les complications du diabète (Perlemuter, et al., 2003)

2.2.6.1 Les complications métaboliques aiguës

2.2.6.1.1 L'hyperglycémie

L'hyperglycémie se définit par une glycémie trop élevée supérieure à 7 $mmol.l^{-1}$ à jeun et de 11 $mmol.l^{-1}$, une à deux heures après un repas. Elle se produit lorsque la quantité d'insuline dans le sang est insuffisante par rapport à la quantité de glucose qui apparaît dans le sang. Les principales causes de l'hyperglycémie sont un surplus d'alimentation, une diminution de l'activité physique, une insuffisance d'insuline et/ou d'antidiabétiques oraux (erreur de dosage), un stress physique (maladie, chirurgie, infection, etc.) ou psychologique (deuil, nouvel emploi, déménagement, etc.), la prise de certains médicaments (comme la cortisone).

Elle se caractérise entre autres par de la fatigue, une polyurie, une polydipsie, une respiration rapide, une haleine fruitée, des douleurs abdominales et des troubles de la conscience.

2.2.6.1.2 L'hypoglycémie

L'hypoglycémie se définit par une glycémie inférieure à 4 mmol.l^{-1}. Elle est généralement liée aux traitements prescrits, à la quantité et la nature des aliments consommés et à la quantité et le type d'activité physique pratiquée. Les principaux symptômes de l'hypoglycémie se divisent en deux catégories. En effet pour lutter contre l'hypoglycémie, l'organisme sécrète des catécholamines (adrénaline et noradrénaline) qui vont entraîner les symptômes suivants : anxiété, faim, nausées, transpiration, tremblement etc. D'autre part, l'insuffisance de glucose au niveau des cellules du système nerveux engendre une neuroglycopénie qui peut déclencher les symptômes suivants : changement de l'humeur, confusion, convulsions, faiblesse, fatigue, maux de tête, troubles de la concentration etc.

2.2.6.1.3 L'acidocétose diabétique

Elle est définit par l'association d'une hyperglycémie, d'une cétonurie élevée, d'un pH sanguin acide ou d'un taux de bicarbonates plasmatique faible. L'acidocétose diabétique est la conséquence d'un déficit absolu ou relatif en insuline. Dans 30% des cas, elle survient très exceptionnellement chez les diabétiques de type 2. Elle se caractérise par une dyspnée de Kussmaul, un état de conscience le plus souvent stuporeux, une déshydratation le plus souvent extracellulaire et quelques symptômes divers notamment l'odeur acétonique « pomme reinette » de l'haleine.

2.2.6.1.4 Le coma hyperosmolaire

Moins fréquent que l'acidocétose diabétique, le coma hyperosmolaire est de bien plus mauvais pronostic (20 – 50% de mortalité). Il survient habituellement chez des patients âgés porteurs du DT2. Les symptômes s'installent très progressivement sur plusieurs jours, voire sur plusieurs semaines. Il se caractérise principalement par des troubles profonds de la conscience et une déshydratation intracellulaire massive.

2.2.6.2 Les complications chroniques dégénératives

2.2.6.2.1 Microangiopathie & Macroangiopathie

La microangiopathie recouvre l'ensemble des lésions constatées au cours du diabète sur les petits vaisseaux (artères, veines, capillaires) d'un diamètre inférieur à 30µm. La

microangiopathie est spécifique du diabète. Elle est responsable de l'atteinte des capillaires rétiniens et glomérulaires rénaux. Elle participe aux lésions du système nerveux.
La macroangiopathie définit les lésions des grosses et moyennes artères. C'est le plus important facteur de mortalité des diabétiques. Coronarite, infarctus du myocarde, artérite des membres inférieurs et hypertension artérielle sont plus fréquents chez les diabétiques. Dans les coronaires et les artères des membres inférieurs des diabétiques, les dépôts lipidiques et les lésions athéroscléreuses compliquées de sténose et d'oblitérations vasculaires sont plus importantes que chez les non diabétiques

2.2.6.2.2 Risques cardiovasculaires

L'athérosclérose prématurée du diabétique est très particulière par sa précocité d'apparition, ses localisations multiples (coronaires, artères cérébrales, artères périphériques) et sa gravité évolutive. Une surmortalité d'origine cardiovasculaire est clairement établie, aussi bien chez les patients atteints de DT1 que ceux de DT2. 75% des décès chez les diabétiques sont dus à des accidents cardiovasculaires (angine de poitrine, infarctus du myocarde, artériopathie des membres inférieurs, accidents vasculaires cérébraux).
Les anomalies du métabolisme des lipides sont également plus fréquentes dans la population diabétique. En effet, l'augmentation de la concentration des lipoprotéines de très faible densité (VLDL) induit une hypertriglycéridémie, qui s'accompagne fréquemment de taux insuffisants du cholestérol lié aux lipoprotéines de haute densité (HDL). La concentration en lipoprotéines de faible densité (LDL) est en général normale, mais la taille et la densité de ces particules sont modifiées dans un sens athérogène : les LDL sont plus denses, plus petites et infiltrent plus facilement la paroi artérielle. Les autres facteurs de risque tels que l'obésité, l'hypertension artérielle, le tabagisme…etc doivent être pris en compte.

2.2.6.2.3 Néphropathie

La néphropathie diabétique est la complication rénale du diabète. Elle est responsable d'environ 30% des malades pris en charge dans les programmes d'insuffisance rénale terminale. Après vingt ans ou plus de diabète, elle se voit chez 40 à 50% des patients atteints de DT1 contre 5 à 10% de DT2. Une fois la protéinurie macroscopique apparue, la progression vers l'insuffisance rénale est inéluctable.

2.2.6.2.4 Rétinopathie

La rétinopathie diabétique constitue une des complications majeures du DT2 par sa fréquence et sa gravité potentielle. C'est la complication la plus spécifique, liée directement à la

microangiopathie. Ainsi, le diabète est la première cause de cécité dans le monde occidental. D'autres complications ophtalmologiques sont cependant possibles au cours de la maladie diabétique : atteinte du cristallin, de l'iris, glaucome. L'ensemble de ces manifestations explique les graves conséquences sur la vision d'un diabète non ou mal traité.

2.2.6.2.5 Neuropathie

La neuropathie diabétique est définie par l'atteinte du système nerveux périphérique et du système nerveux végétatif. Elle est fréquente et peut se manifester de manières très diverses. La neuropathie périphérique touche les membres inférieurs. Elle est à prédominance sensitive (trouble de la sensibilité à la chaleur et à la douleur). Ces troubles sensitifs prédisposent à l'ostéoarthropathie et au mal perforant plantaire.

La mononeuropathie s'exprime par l'atteinte d'un seul nerf. Les nerfs les plus touchés sont les nerfs oculaires commun (III) et externe (VI) responsable d'une diplopie le plus souvent transitoire.

L'atteinte du système nerveux végétatif se traduit par des troubles digestifs, génito-urinaires, vasculaires (hypotension orthostatique) et par la disparition des symptômes d'origine adrénergique des hypoglycémies (pâleur, sueurs…).

2.2.6.2.6 Les risques infectieux

Les complications infectieuses chez les personnes atteintes de diabète sont fréquentes et peuvent être graves. Il s'agit principalement d'infections broncho-pulmonaires, urinaires et cutanées.

2.2.6.2.7 Le pied diabétique

Les lésions du pied doivent être prises en compte très sérieusement chez une personne diabétique car elles peuvent, dans certaines situations, entraîner une amputation. Ces lésions sont très souvent occasionnées par des traumatismes mineurs. Elles sont liées au diabète lui-même avec l'atteinte vasculaire, nerveuse et le risque d'infection qui affectent la sensibilité thermique et douloureuse.

2.2.7 Préventions des complications liées au diabète

Le diabète, qu'il soit de type 1 ou 2, représente une charge importante en santé publique essentiellement à cause des complications à long terme qu'il favorise. Les plus connues du grand public et les plus redoutées sont les complications microvasculaires avec leur menace

de cécité ou de dialyse. Le facteur de risque principal est l'hyperglycémie qui définit la maladie.

Cependant, il ne faut pas oublier que la grande majorité des décès chez les diabétiques est liée aux complications artérielles (macrovasculaires). En reprenant les résultats observés dans les groupes témoins de l'essai multicentrique britannique UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study)(UK Prospective Diabetes Study Group (UKPDS), 1998a)(UK Prospective Diabetes Study Group (UKPDS), 1998b) qui a inclus plus de 5000 diabétiques de type 2 récemment diagnostiqués, on peut calculer que pour un décès lié à une complication microvasculaire, on dénombre environ 50 décès macrovasculaires. La morbidité suit la même hiérarchie : si l'on compare les complications microvasculaires graves (insuffisance rénale terminale, cécité, hémorragie vitréenne) aux complications macrovasculaires graves (toutes sauf l'angine de poitrine), on arrive à des incidents de 5 à 9 contre 30 à 50 pour 1000 par an.

La prévention de ces complications est possible, elle passe par une approche multifactorielle de réduction de tous les principaux facteurs de risque cardiovasculaire (non seulement glycémie, mais aussi surpoids, sédentarité, hypertension, anomalies des lipides).

Ainsi, il est possible de retarder de manière significative l'incidence des complications du diabète par la correction des valeurs glycémiques et le contrôle des autres facteurs de risque cardiovasculaire. De plus, le dépistage précoce des complications débutantes permet dans certains cas d'intervenir pour éviter leur évolution vers les formes sévères.

2.3 Les thérapeutiques du diabète de type 1 (Monnier, 2010)

2.3.1 Apport exogène d'insuline

2.3.1.1 L'insulinothérapie

L'insuline est le traitement incontournable du diabète de type 1. Ce traitement doit être mis en œuvre dès la découverte du diabète. L'insulinothérapie a deux objectifs fondamentaux :

- Dès le diagnostic, dans l'urgence, traiter la carence insulinique qui est pratiquement totale ;
- Après le diagnostic, de manière chronique et dans la durée, essayer d'assurer un contrôle glycémique satisfaisant pour éviter le développement ou la progression des complications liées aux désordres glycémiques.

Chez le patient, l'apport exogène d'insuline se fait soit sous forme d'injections (avec une seringue ou un stylo), soit avec une pompe à insuline, (appareil portable, ou plus rarement

“implantable”), destinée à administrer l’insuline en continu. Le principe du traitement par apport d’insuline exogène repose sur l’administration d’insuline adaptée en fonction du besoin en insuline de l’individu, apprécié sur les données de l’autosurveillance glycémique capillaire et différents paramètres tels que la prise alimentaire, la pratique d’une activité physique ou la survenue d’un événement intercurrent altérant la sensibilité à l’insuline (fièvre, stress, etc.).

2.3.1.2 Les différentes catégories d’insuline de synthèse

Pour permettre de moduler le temps d’action de l’insuline, une des avancées majeures a été de remplacer l’insuline humaine par des analogues de l’insuline, qui sont des peptides modifiés dont les caractéristiques pharmacocinétiques peuvent être changées.

La combinaison des injections de ces insulines à différentes durées d’action pendant les 24 h d’une journée permet d’obtenir un schéma insulinique qui se rapproche le plus possible du fonctionnement naturel du pancréas.

C’est la durée d’action des insulines par voie sous-cutanée qui permet leur classification en insulines ultrarapides (analogues rapides de l’insuline, Humalog® Novorapid®), insulines rapides (insulines régulières, Actrapid®), insulines à action intermédiaire (insuline NPH® : Neutral Protamine Hagedron®, Insulatard®) et insulines lentes (analogues prolongés de l’insuline, Lantus®, Levemir®). La durée d’action de ces insulines peut être résumée par une règle simple : 3, 6, 12, 24, c'est-à-dire 3 heures de durée d’action pour les analogues rapides, 6 heures pour les insulines régulières, 12 heures pour les insulines intermédiaires et 24 heures pour les insulines lentes. La durée d’action n’est pas le seul facteur qui intervient. Il convient également de considérer le profil de durée d’action qui peut être assimilé à une courbe passant par un maximum avec une montée progressive de l’activité pendant la période qui précède le maximum et une diminution pendant la période qui suit le pic d’activité (**Fig. 1-9**).

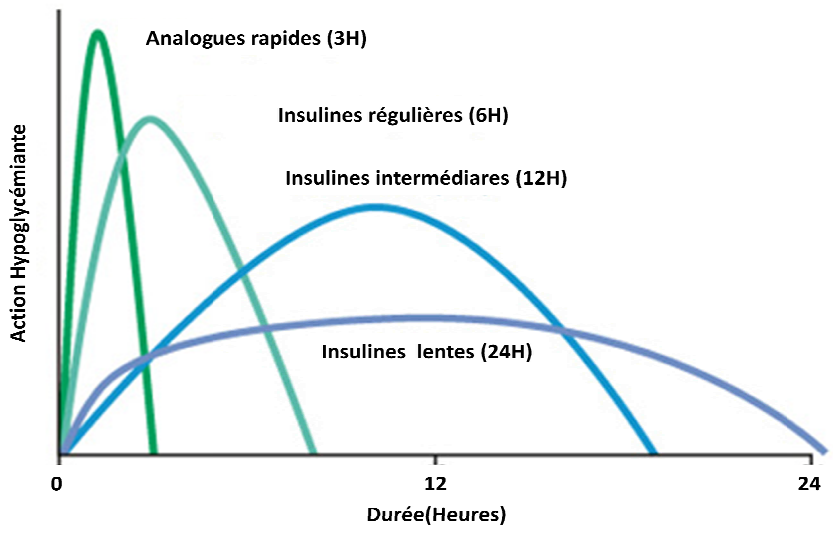


Figure 2-9. Profils des différentes catégories d'insuline en fonction de leur durée d'action.
Source : http://www.docvadis.fr

Il faut noter que les durées totales d'activité, les moments de survenue et les amplitudes des pics d'activité sont des paramètres qui font l'objet d'une assez grande variabilité d'un sujet à l'autre et chez un même sujet d'un jour à l'autre.

2.3.2 Apport endogène d'insuline

Actuellement, la seule méthode disponible pour prolonger la normalisation de la glycémie chez les patients diabétiques de type 1 est la restauration de l'insuline endogène. Deux procédés sont couramment utilisés pour remplacer les cellules productrices d'insuline soit la transplantation de pancréas total soit la transplantation d'îlots pancréatiques.

2.3.2.1 La transplantation de pancréas

La greffe allogénique de pancréas, c'est-à-dire entre un donneur et un receveur de la même espèce mais différents par un ou plusieurs antigènes d'histocompatibilité, est un traitement curatif pour les patients atteints de diabète de type 1. La transplantation de pancréas permet de restaurer l'équilibre hormonal physiologique et, si elle est effectuée au stade précoce, la transplantation de pancréas a probablement le potentiel de stabiliser ou d'améliorer les complications à long terme associées au diabète (rétinopathie, néphropathie, et neuropathie)(Berney & Johnson, 2010).

Trois options pour la transplantation de pancréas sont disponibles :

- La transplantation simultanée du pancréas et du rein ; c'est la façon de procéder la plus commune, elle représente entre 75 et 85% de toutes les procédures. La transplantation rein-pancréas associés est généralement recommandée pour les patients diabétiques de type 1 avec

une insuffisance rénale chronique. Ces patients reçoivent à la fois le rein et le pancréas d'un donneur d'organe décédé unique.

- La transplantation pancréatique après transplantation rénale est réalisée chez les patients diabétiques avec une greffe de rein réussie. Ce type de greffe est particulièrement pertinente pour le nombre croissant de patients diabétiques qui ont d'abord subit une transplantation rénale à partir d'un donneur vivant. Aujourd'hui 8 à 15% des greffes de pancréas sont effectuées de cette manière.

- La transplantation du pancréas seul concerne les patients diabétiques de type 1 avec une fonction rénale normale. Le diabète de ces patients est très instable, il est associé à des hypoglycémies avec perte de conscience et une progression rapide des effets secondaires graves du diabète de type 1 (neuropathie, rétinopathie, etc.).

L'amélioration des traitements immunosuppresseurs, la meilleure sélection des donneurs et des receveurs, l'amélioration des techniques chirurgicales et les progrès dans les soins postopératoires ont permis d'améliorer sensiblement les résultats de la transplantation pancréatique au cours des dernières décennies.

Un an après transplantation, les taux de survie des patients sont semblables chez les trois catégories de patients transplantés et dépasse 95% un an après transplantation. Le taux de survie global du greffon à 1 an associé avec une insulino-indépendance dépasse 80%. Dix ans après transplantation, l'insulino-indépendance s'étend chez 50% des patients transplantés simultanément pancréas et rein (Vogel & Friend, 2011)(**Fig. 1-10**).

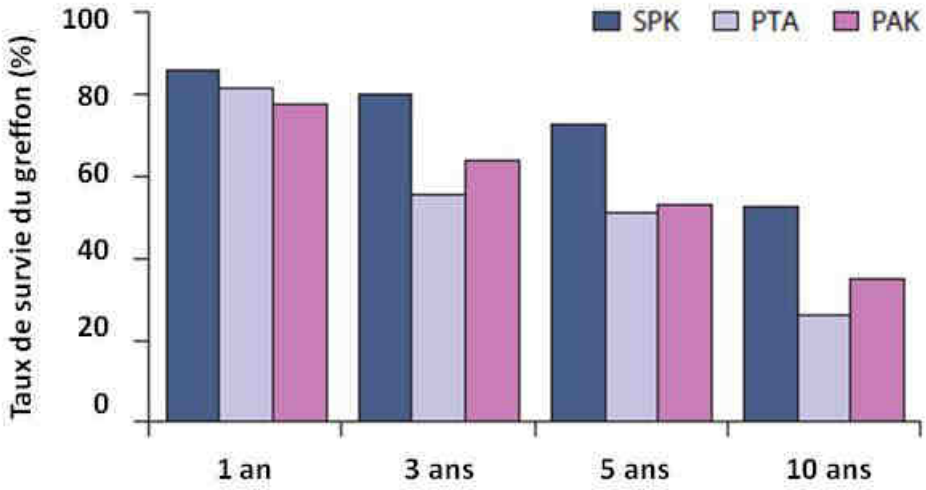


Figure 2-10. Taux de survie du greffon après transplantation de pancréas.

Les résultats sont présentés suivant le type de transplantation. SPK : « Simultaneous Pancreas Kidney » ; PTA : « Pancreas Transplantation Alone » ; PAK : « Pancreas After Kidney ».(Richter, et al., 2011)

Toutefois, la décision de transplanter est fondée sur une analyse de la balance bénéfices-risques, en comparant les risques liés au diabète avec ceux de la transplantation (chirurgie lourde, immunosuppression à long terme). Les résultats post-transplantation dépendent de plusieurs facteurs, notamment de la qualité de l'organe du donneur, des co-morbidités du bénéficiaire, des techniques chirurgicales à la fois pour la chirurgie du donneur, et pour celle du receveur et de la gestion des immunosuppresseurs.

2.4 La transplantation d'îlots pancréatiques

L'allogreffe d'îlots pancréatiques repose sur l'isolement d'îlots de Langerhans à partir du pancréas de sujets non diabétiques. Les îlots sont injectés dans la veine porte du receveur diabétique et viennent s'implanter dans les veinules pré-sinusoïdales du foie (**Fig 1-11**).

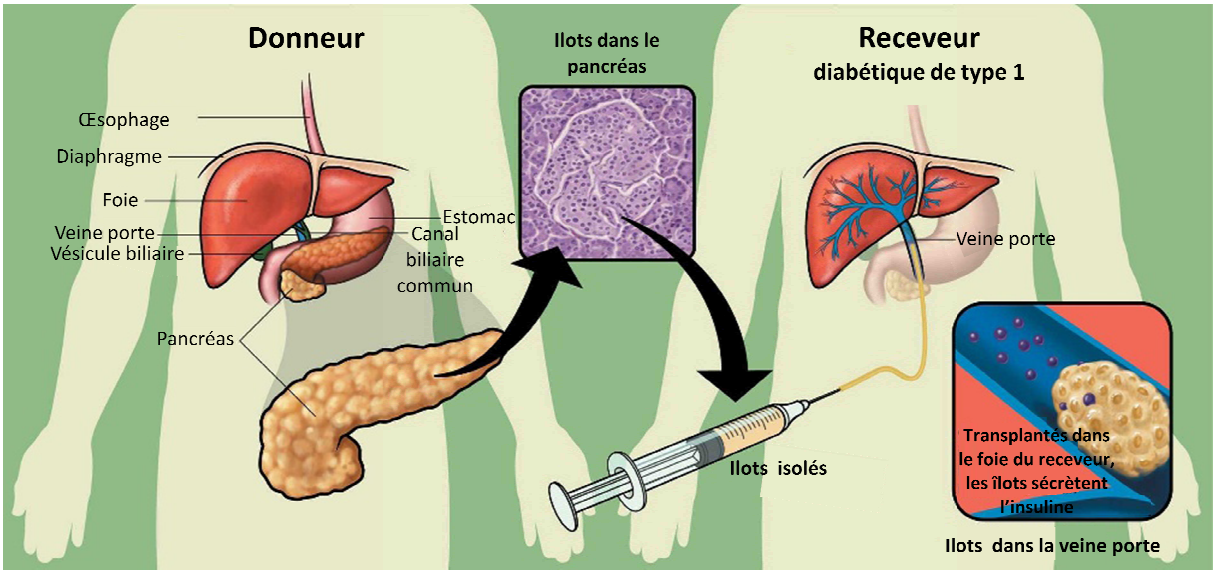


Figure 2-11. Principe général de la transplantation d'îlots pancréatiques
(Naftanel & Harlan, 2004)

2.4.1.1.1 L'histoire de la transplantation d'îlots pancréatiques

En 1972, les travaux fructueux chez le rongeur de Paul E. Lacy vont rapidement transmettre un enthousiasme partagé pour le recours à la greffe d'îlots en pratique clinique (Ballinger & Lacy, 1972). La première transplantation allogénique d'îlots pancréatiques chez l'homme est réalisée en 1977, ces essais n'ont toutefois jamais permis aux patients de devenir insulino-indépendants. Il faudra attendre 1990, pour que Scharp et ses collaborateurs relatent une insulino-indépendance d'un mois chez des patients diabétiques de type 1 après transplantation d'îlots pancréatiques (Scharp, et al., 1990). Toutefois, les limites des techniques d'isolement des îlots et l'immunosuppression empêchent une applicabilité à grande échelle. Durant les dix

années suivantes, environ 450 tentatives de transplantation d'îlots ont été menées, mais moins de 8% des sujets ont été rendus insulino-indépendants.

Ce n'est qu'en 2000 que la transplantation d'îlots pancréatiques connaîtra un véritable essor grâce à l'étude de référence publiée par Shapiro et al (Shapiro, et al., 2000). Cette étude rapporte le cas de sept patients consécutifs traités par greffe d'îlots et maintenus insulino-indépendants pendant 1 an. L'approche est baptisée « protocole d'Edmonton » et inclut: (i) la sélection des diabétiques de type 1 qui souffrent d'hypoglycémie sévère ou de diabète instable ; (ii) un protocole immunosuppresseur dépourvu de stéroïdes, composé de dacluzimab (anti-CD25mAb), de sirolimus (inhibiteur de « mamalian Target of Rapamycin » (mTOR)) et une faible dose d'un inhibiteur de la calcineurine, le tacrolimus ; (iii) les îlots sont préparés pour la transplantation en l'absence de protéines xénogéniques (l'albumine humaine remplace l'albumine bovine) et (iv) 10 000 îlots équivalents par kilogramme de poids corporel sont transplantés à chaque patient, souvent administrés en deux ou parfois trois perfusions différentes.

Depuis le rapport initial du protocole d'Edmonton en 2000, environ 500 greffes d'îlots ont été réalisées à travers le monde en utilisant des variantes et de nouvelles avancées. Bien que l'état actuel de la transplantation d'îlots pancréatiques représente une avancée essentielle et quasi exponentielle, la nécessité de l'immunosuppression tout au long de la vie, la pénurie de donneurs et l'inefficacité des techniques pour l'isolement des îlots sont un obstacle à un usage généralisé de cette thérapie pour remplacer l'insuline. Toutefois, la transplantation d'îlots pancréatiques fournit un avantage certain chez les patients présentant un très mauvais contrôle glycémique malgré l'optimisation du traitement à l'insuline (Ryan, et al., 2002).

2.4.1.1.2 Résultats cliniques de la transplantation d'îlots pancréatiques

Un succès total de la greffe d'îlots pancréatiques se traduirait par l'arrêt de la dépendance vis-à-vis des injections d'insuline exogène, la disparition des accidents métaboliques aigus (hypoglycémie ou acidocétose), la normalisation prolongée de la glycémie et, soit de la réduction du risque d'apparition de complications micro-angiopathiques (rétine, rein), cardio-vasculaires et neuropathiques, soit de la stabilisation ou de la régression de ces dernières si elles étaient présentes avant la greffe. Tous ces facteurs permettraient une amélioration de la qualité de vie du patient.

Un succès partiel, comportant la restauration d'une insulinosécrétion (insuffisante pour autoriser l'insulino-indépendance) contribue également à améliorer le contrôle métabolique

du diabète par des doses réduites d'insuline, et à réduire le risque de complications aiguës et chroniques, en améliorant la qualité de vie du patient.

À 1 an, approximativement 59 % de tous les receveurs de greffe d'îlots seuls sont libres d'épisodes hypoglycémiques sévères et maintiennent l'hémoglobine A1c (HbA1c) à un niveau inférieur à 6,5% (Tiwari, et al., 2012).

Les données recueillies par le « Collaborative Islet Transplant Registry » (CITR) ont montré qu'environ 70%, 60% et 50% des receveurs transplantés seulement avec des îlots sont libres d'épisodes hypoglycémiques sévères à 2, 3 et 4 ans, respectivement (**Fig. 1-12A**). En outre, ces mêmes données ont montré que l'HbA1c est en moyenne < 6.5% chez les sujets transplantés avec des îlots seuls durant les 4 années qui ont suivis la dernière injection (CITR, 2011) (**Fig. 1-12B**).

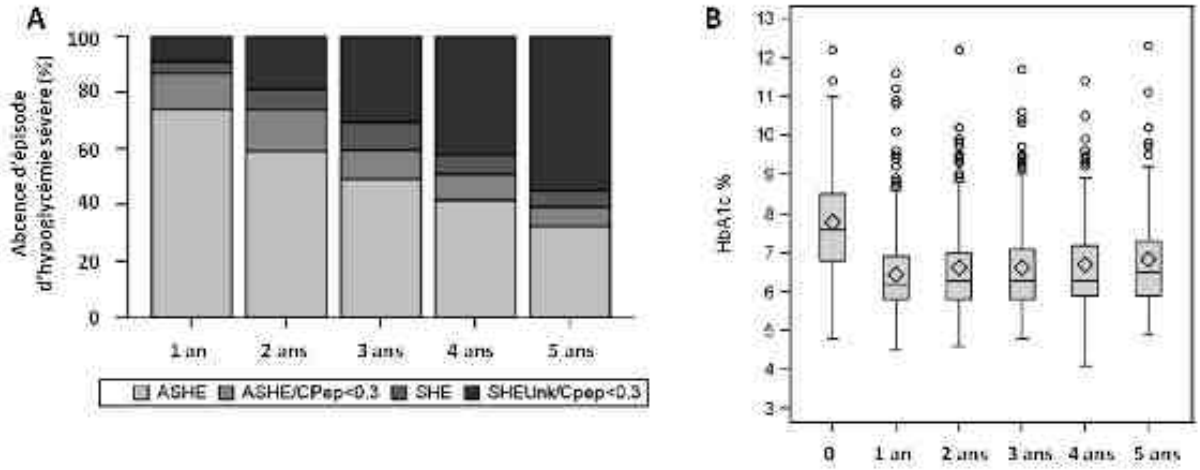


Figure 2-12. Evaluation du taux d'hypoglycémie sévères (A) et de l'HbA1c (B).

Les résultats présentés concernent les receveurs transplantés avec des îlots seuls et sont représentés par le nombre d'années suivant la dernière injection. ASHE: « Absence Severe Hypoglycemia » ; ASHE/ Cpep <0.3 : «Absence Severe Hypoglycemia + C-peptide < 0.3 ng.-ml^{-1}»; SHE: «Severe Hypoglycemia Episode»; SHEUnk/Cpep<0.3: « Severe Hypoglycemia Episode + -peptide < 0.3 ng.-ml^{-1}» (CITR, 2011).

Actuellement, les données confirment les principaux avantages de la transplantation d'îlots tels que la stabilisation du métabolisme du glucose, la diminution soutenue de graves épisodes d'hypoglycémie, la restauration de la conscience des symptômes, et la réduction de l'HbA1c à moins de 6,5 pour plus de 50% des bénéficiaires à 1 an. Les résultats cumulatifs de la base de registre confirment l'impact positif et sans conteste de la transplantation d'îlots sur le contrôle métabolique du diabète de type 1 (CITR, 2011). Elle est proposée aujourd'hui pour traiter la variabilité glycémique extrême associée ou non à une insulinothérapie. A l'avenir, l'obtention de l'insulino-indépendance par la transplantation d'îlots ne pourra être envisagée que par l'amélioration des procédures de transplantation (choix du donneur, isolement des îlots…etc).

2.4.1.1.3 Procédures de la transplantation d'îlots pancréatiques

2.4.1.1.3.1 Le choix du receveur

Une sélection drastique des patients candidats à la greffe associée à une analyse bénéfices-risques sont nécessaires pour la transplantation d'îlots. La procédure de transplantation d'îlots et le traitement immunosuppresseur doivent être considérés comme les principaux facteurs de risque. En effet, la procédure de transplantation peut engendrer un risque de saignement, de thrombose, de perforation biliaire, d'élévation transitoire de la transaminase sérique et de fistules artério-veineuses. D'autre part, la prise de traitements anti-rejet peut induire des ulcères buccaux, une anémie, des diarrhées, une perte de poids, de la fatigue, une élévation des lipoprotéines de basse densité, de l'hypertension, un dysfonctionnement rénal et des œdèmes périphériques (Merani & Shapiro, 2006).

Les facteurs d'inclusion pour la transplantation d'îlots libres se concentrent autour des patients avec un diabète de type 1 instable. Généralement, la transplantation d'îlots pancréatiques est envisagée chez les diabétiques de type 1 dont la fonction rénale est préservée mais est associée à une grande instabilité métabolique persistante caractérisée par une labilité glycémique et/ou une non-perception marquée de l'hypoglycémie malgré tous les efforts possibles d'optimisation du contrôle de la glycémie (Merani & Shapiro, 2006) (**Tab. 1-2**).

Indications	Exclusions
Diabète type 1	**Hémoglobine glyquée (HbA_{1c})> 10 %**
Peptide-C stimulé négatif (< 0,3 ng/ml)	**Rétinopathie proliférative inexistante**
Gestion intensive du diabète (Prise de glycémie ≥ 3 / jours ; Injection d'insuline ≥ 3 / jours ou pompe à insuline)	**Tension artériel élevée**
	Fonction rénale altérée
Hypoglycémies sévères avec perte de conscience	**Pathologie cardiaque sévère**
	Grossesse envisagée
Instabilité glycémique marquée	**Patient satisfait de son traitement actuel**

Tableau 2-2. Critères simplifiés d'éligibilité et d'exclusion pour la transplantation d'îlots pancréatiques (Merani & Shapiro, 2006).

2.4.1.1.3.2 Le choix du donneur

A ce jour, il est encore difficile de dresser une liste exhaustive des facteurs donneur-dépendants identifiés comme influençant le résultat de la procédure d'isolement (Berney & Johnson, 2010). Toutefois, l'âge du donneur, l'indice de masse corporelle (IMC), la stabilité hémodynamique du donneur, le temps d'ischémie froide et chaude semblent être des indicateurs fiables (Toso, et al., 2002; Benhamou, et al., 1994).

- ***Le poids du donneur***

En ce qui concerne le poids ou l'IMC, les donneurs obèses sont considérés comme d'excellents donneurs en terme de rendement d'îlots de Langerhans (Brandhorst, et al., 1994; Matsumoto, et al., 2004). En effet, pour répondre à la demande métabolique des personnes obèses, le pancréas s'adapte par une augmentation de la masse ß-cellulaire (Liu, et al., 2002). De plus, Matsumoto et ses collaborateurs ont montré que des îlots isolés à partir de donneurs obèses (IMC 30 kg/m2) avaient une viabilité, une fonctionnalité *in vitro*, et une fonctionnalité *in vivo* quasi-identique dans un modèle de souris nude (Matsumoto, et al., 2004). Bien que les îlots isolés à partir de donneurs non diabétiques obèses semblent bien fonctionner, il faut se poser la question d'un éventuel diabète de type 2 non déclaré chez ces donneurs. Une étude comparative a été menée entre des îlots isolés chez des diabétiques de type 2 par rapport à des donneurs contrôles de même IMC. Une quantité significativement plus faible d'îlots récupérés et une fonctionnalité endocrine anormale *in vitro* et *in vivo* ont été observées dans un modèle de souris nude (Deng, et al., 2004). Etant donné que la fonction des îlots humains *in vivo* n'est que faiblement corrélée avec la quantité d'îlots transplantés (Caiazzo, et al., 2008), le choix du donneur devrait se baser sur la physiologie et la fonction des îlots, plutôt que sur des rendements d'isolement.

- ***L'âge du donneur***

Dans la mesure où l'âge du donneur est considéré, les donneurs pédiatriques (<18 ans) sont toujours considérés comme des donneurs pauvres en îlots en raison de la difficulté de "l'extraction" des îlots de la matrice extracellulaire du pancréas jeune (Lakey, et al., 1996; Toso, et al., 2002). D'après la littérature, le collapsus des canaux pancréatiques de ces donneurs ne permet pas une distribution correcte de la solution d'enzyme de digestion dans l'ensemble du parenchyme (Balamurugan, et al., 2006). Pour cette raison, le rendement en îlot est inférieur à celui d'un donneur adulte et seulement 15% des préparations obtenues à partir

de donneurs pédiatriques sont appropriées pour la transplantation d'îlots (Lakey, et al., 1996; Toso, et al., 2002). Toutefois, les îlots de donneurs pédiatriques semblent avoir une meilleure fonctionnalité *in vitro* (Toso, et al., 2002). Leur meilleure fonctionnalité a été confirmée par un taux plus élevé d'inversion du diabète chez des souris immunodéficientes (Balamurugan, et al., 2006).

À l'autre extrémité du spectre, les donneurs plus âgés (> 45 ans) permettent l'obtention d'un nombre élevé d'îlots (Berney & Johnson, 2010). Cependant, une corrélation négative entre l'âge du donneur et la fonctionnalité *in vitro* de l'îlot est connue. Le taux d'inversion de diabète chimiquement induit chez des souris nude est significativement plus faible avec des îlots isolés à partir de pancréas de donneurs âgés de plus de 50 ans (Ihm, et al., 2006). La diminution de la fonctionnalité *in vivo* a été confirmée après la transplantation d'îlots dans deux séries indépendantes de patients à 1,6 et 12 mois après transplantation (Ihm, et al., 2006; Niclauss, et al., 2011). Plusieurs études ont examiné les raisons de cette perte de fonctionnalité âge-dépendante. Ainsi, une baisse de la prolifération cellulaire et de la capacité à se régénérer des cellules ß a été signalée chez des souris âgées (Rankin & Kushner, 2009; Tschen, et al., 2009). Une augmentation âge-dépendante du taux d'apoptose, une diminution de la prolifération cellulaire associée à une baisse de l'expression du gène Pdx-1 ont également été relatés pour le pancréas et les îlots humains (Reers, et al., 2009).

2.4.1.1.3.3 Préservation du pancréas

Tout d'abord, il est important d'identifier les facteurs de risque potentiels et les dangers pour la préservation de l'organe et l'optimisation de sa conservation. Parmi ces facteurs sont regroupés les effets de la température, le lavage de l'organe, le temps d'ischémie, les effets des solutions de conservation qu'ils soient physiques, biochimiques ou pharmacologiques (Baertschiger, et al., 2008).

- ***Le stockage à froid***

Depuis les années 1960, les effets du stockage à froid sont connus et appliqués pour la préservation des organes. C'est actuellement la seule méthode de conservation cliniquement utilisée pour le pancréas (Baertschiger, et al., 2008). L'hypothermie (2-4°C) réduit le métabolisme cellulaire, la consommation d'oxygène, l'activité de la pompe Na^+/K^+- ATPase notamment, et par conséquent, réduit également l'utilisation d' « adénosine-5'-triphosphate » (ATP). Avec l'hypothermie, les cellules et les organes sont ainsi préservés de l'ischémie et des

lésions. De plus, au cours du prélèvement, le maintien du pancréas à une température en-dessous de 4°C permet d'améliorer le rendement et la fonctionnalité *in vitro* des îlots (Lakey, et al., 2002).

Néanmoins, le refroidissement peut être potentiellement nocif pour les cellules et le mode d'action précis par lequel il prolonge la durée de conservation des organes n'est pas connu. Bien que le métabolisme soit ralenti, la réduction de la température ne l'arrête pas. Ainsi, les pancréas conservés à froid ont une viabilité limitée d'environ 16-18 heures (Ridgway, et al., 2010). La plupart des enzymes ont une activité diminuée de 1,5 à 2,0 fois pour chaque baisse de 10°C de la température et le refroidissement de 37 à 0°C réduit le métabolisme de 12 à 13 fois. Cependant au cours du refroidissement, les réactions chimiques et enzymatiques continuent. Le changement du métabolisme aérobie vers la glycolyse anaérobie et la glycogénolyse induit l'accumulation de lactate et d'ions hydrogène qui génèrent une acidose responsable de la mort des cellules (Ridgway, et al., 2010).

D'autre part, le rétablissement d'une structure membranaire normale pendant la reperfusion peut prendre du temps et peut expliquer pour partie la perte de viabilité des organes lors de la reperfusion. En outre, la rigidité accrue des globules rouges provoque également le piégeage de ces derniers dans la microcirculation après reperfusion du pancréas (Woeste, et al., 2008). Le refroidissement induit également un gonflement cellulaire en inhibant la pompe Na^+ / K^+-ATPase. Toutefois, ce gonflement cellulaire peut être prévenu ou limité par modification de la composition des solutions de conservation d'organes (Iwanaga, et al., 2008).

Au cours du stockage à froid, la synthèse de l'ATP est limitée par la sensibilité à la température de la translocase adénine nucléosidique, une enzyme liée à la membrane qui transporte l'ADP dans les mitochondries. Cette enzyme requiert plus d'énergie pour son activation en dessous de 18°C, ce qui reflète les changements de fluidité de la membrane induit par le refroidissement des lipides membranaires (Dahout-Gonzalez, et al., 2006). La production d'adénosine, d'inosine et d'hypoxanthine continue pendant le refroidissement des organes. Ces métabolites sont capables de traverser les membranes cellulaires et sont susceptibles d'être éliminés pendant le stockage et la reperfusion (Southard, et al., 1977). Ainsi, l'élimination de ces métabolites limite la capacité des cellules à régénérer de l'ATP. Toutefois, la réparation des dommages induits et la restauration d'un milieu intracellulaire normal exigent un retour rapide à la synthèse d'ATP. Par conséquent pendant la préservation du pancréas, il est avantageux de limiter la perte de ces métabolites et d'optimiser les possibilités de régénérer de l'ATP lors de la reperfusion. Ainsi, la viabilité de l'organe et la réversibilité des lésions de conservation dépendent de la capacité des cellules à régénérer

l’ATP après la reperfusion (Yokota, et al., 1995). De ce fait, la composition de la solution de conservation idéale doit être aussi physiologique que possible, doit empêcher l’atteinte du métabolisme énergétique, le gonflement des cellules, l’acidose et la formation de composés toxiques et de dérivés réactifs de l’oxygène (Baertschiger, et al., 2008).

Toutefois, la perfusion des canaux pancréatiques avant le stockage à froid apparaît comme essentielle à la réussite de l’isolement. De plus, le stockage à froid du pancréas digéré avant purification sur gradient, semble être aussi bénéfique sur l'isolement des îlots. Robertson et al ont démontré des améliorations significatives de la pureté des îlots à partir d’un pancréas digéré stocké à froid une heure avant purification (Robertson, et al., 1992).

- ***Le procédé de préservation à deux couches***

Le procédé de préservation à deux couches (« Two-layered method », TLM) a été introduit pour la préservation de pancréas destinés à l'isolement d’îlots, d'abord dans des modèles animaux (Tanioka, et al., 1997). Depuis, de nombreux centres de transplantation ont adopté cette méthode pour la préservation du pancréas avant l'isolement des îlots. Ce procédé présente des avantages, notamment quand les organes sont expédiés à de longues distances du centre d'isolement.

La TLM utilise le concept de l'oxygénation normobare comprenant une solution de préservation d'organes à froid (solution de l’université du Wisconsin, UW) avec une solution perfluorochimique (PFC) transporteur d'oxygène. Le pancréas est suspendu entre les deux couches non miscibles (**Fig. 1-13**).

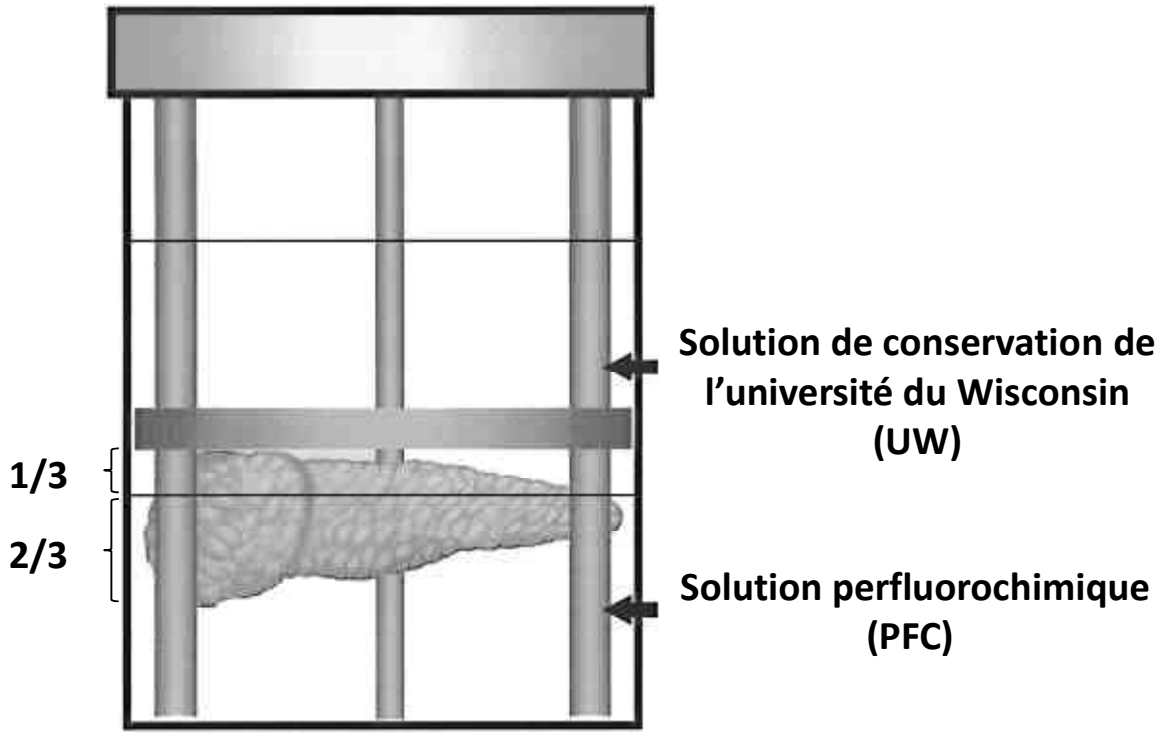


Figure 2-13. La méthode de préservation du pancréas à deux couches

Après avoir dissocié la rate et l'excès de graisse (et le duodénum, si possible) du pancréas, ce dernier est placé dans le sac de transport. Sa position est ajustée afin d'optimiser l'emplacement du pancréas à l'interface de la solution de conservation (UW) et la solution perfluorochimique (PFC). Les deux tiers de l'organe doivent être recouverts avec la solution perfluorochimique (Noguchi, et al., 2009).

Les PFCs sont des hydrocarbures qui ont une très haute capacité à fixer l'oxygène dissous. Cela leur permet de libérer de l'oxygène plus efficacement que l'hémoglobine dans les tissus avec des faibles tensions en oxygène. Ainsi, le pancréas est oxygéné par l'intermédiaire des PFCs tandis que la solution de conservation d'organes empêche un œdème du greffon, en fournissant des substrats pour le métabolisme, en s'opposant à la perte de métabolites puriques (Fujino, et al., 1991) et en empêchant la détérioration de la matrice extracellulaire péri-insulaire (Maillard, et al., 2008).

La TLM permet d'améliorer les rendements, la viabilité, la morphologie, le taux de réussite des isolements, la transplantabilité et la récupération des îlots de donneurs marginaux (Matsumoto, et al., 2002; Zhang, et al., 2006). Des études ont montré de meilleurs profils énergétiques avec un pancréas conservé avec la TLM par rapport à une conservation classique en solution UW. Le ratio ATP/ADP (adénosine trisphosphate / adénosine diphosphate), la charge énergétique, la récupération des îlots et la viabilité étaient significativement plus élevés avec la TLM (Salehi & al, 2006). Cette amélioration liée à la préservation avec la TLM peut être expliquée par une réduction de l'hypoxie qui conduit à une augmentation

significative des gènes anti-apoptotiques et à l'inhibition de gènes pro-apoptotiques (Ramachandran, et al., 2006).

2.4.1.1.3.4 Isolement des îlots pancréatiques

L'extraction d'un grand nombre d'îlots humains viables à partir d'un pancréas est un processus qui exige beaucoup de savoir-faire, l'accès à des réactifs uniques et l'accès à des salles de travail adaptées et conformes aux bonnes pratiques de préparation (current Good Manufacturing Practises, cGMP) (Shapiro, 2011).

- ***La méthode semi-automatisée***

Le progrès le plus fondamental est certainement la mise en place de la méthode semi-automatisée pour la digestion du pancréas. Le système comprend une chambre de digestion associée à un système de recirculation de la solution d'enzyme (Ricordi, et al., 1989). Le pancréas distendu avec la collagénase à l'intérieur d'une chambre de digestion est dissocié mécaniquement par une agitation douce. Le principe de cette approche enzymatique et mécanique combinée est de diminuer le traumatisme physique des îlots en les recueillant à la sortie de la chambre de digestion. Aujourd'hui, la «chambre de Ricordi» est le dispositif universel utilisé pour l'isolement d'îlots humains en clinique.

- ***La collagénase***

La perfusion des canaux avec la solution de collagénase augmente le rendement et la viabilité des îlots en permettant une répartition plus uniforme de la solution (Sawada, et al., 2003). Toutefois, l'optimisation de la distribution de la collagénase est nécessaire afin de préserver l'intégrité des îlots. En effet, au cours de la perfusion, la collagénase peut aussi pénétrer à l'intérieur des îlots et induire une fragmentation des îlots voire une réduction des rendements d'isolement (Cross, et al., 2008).

D'un point de vue technique, l'utilisation de collagénase purifiée seule se traduit par une diminution du rendement des îlots résultant de la digestion insuffisante des tissus (Wolters, et al., 1995). La présence d'impuretés telles qu'une activité protéase semble être nécessaire pour améliorer la dissociation du tissu par la collagénase. Bien que l'utilisation de la protéase ait démontré son efficacité pour accélérer la dissociation des tissus, l'exposition excessive de l'enzyme réduit sensiblement les rendements en îlots par la fragmentation des îlots et leur désintégration (Bucher, et al., 2004) aboutissant à une réduction de leur viabilité (Brandhorst,

et al., 2005). L'effet de la protéolyse conduit également à une diminution de l'activité de la collagénase tout au long du processus d'isolement.

Toutefois, la composition et l'activité des préparations de collagénase sont extrêmement variables et cette variabilité a été reconnue comme l'obstacle majeur à l'isolement des îlots humains (Johnson, et al., 1996). La variabilité de l'activité peut s'expliquer en autres par la structure de l'interface entre l'îlot et le tissu exocrine. Bien que les collagènes soient les principales protéines fibreuses constituant cette interface, leur distribution dans le pancréas humain évolue avec l'âge (Kin, et al., 2007). A l'interface îlots-tissu exocrine, la présence des collagènes de types I, III, IV, V et VI (**Fig. 1-14**) est confirmée avec une prédominance de collagène de type VI (Van Deijnen, et al., 1994; Hughes, et al., 2006). Ce dernier présente des caractéristiques qui diffèrent de celles des autres types de collagène. Les liaisons disulfure intermoléculaires stabilisent ces molécules et leur confère une résistance à la collagénase (Heller-Harrison & Carter, 1984).

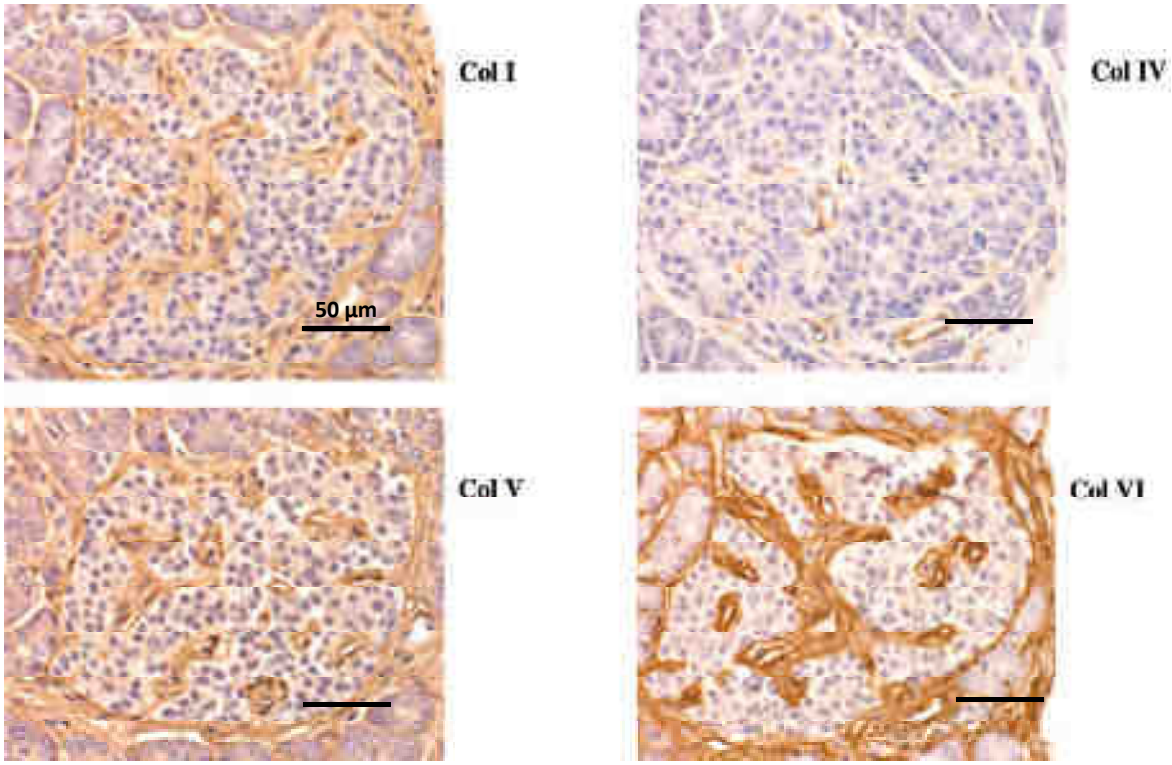


Figure 2-14. Section en série de pancréas humain adulte

Les coupes contiennent un îlot immunomarqué pour les collagènes de type I, IV, V ou VI (Hughes, et al., 2006).

Enfin, une meilleure compréhension des caractéristiques de la matrice extracellulaire du pancréas humain, permettra d'optimiser l'isolement des îlots en utilisant des mélanges d'enzymes "sur mesure" adaptés pour chaque donneur de pancréas (Kin, et al., 2007).

- ***La purification des îlots***

Initialement, l'incapacité de produire des préparations d'îlots humains purifiés a limité le développement de la transplantation d'îlots. En effet, l'une des étapes les plus importantes pour l'isolement des îlots est la purification. Cette étape permet la séparation des îlots et réduit la quantité de tissu à transplanter en séparant les préparations du tissu acineux. Cette procédure est essentielle puisque la transplantation de préparations pancréatiques humaines non purifiées (qui peuvent contenir plus de 90% du tissu exocrine) (**Fig.1-15**) peut générer de graves complications: infarctus splénique, déchirure de la capsule splénique, varices oesophagiennes, coagulation intravasculaire disséminée (CIVD), hypertension artérielle systémique, thrombose de la veine porte, infarctus hépatique, insuffisance hépatique, voire la mort (Lakey, et al., 2003).

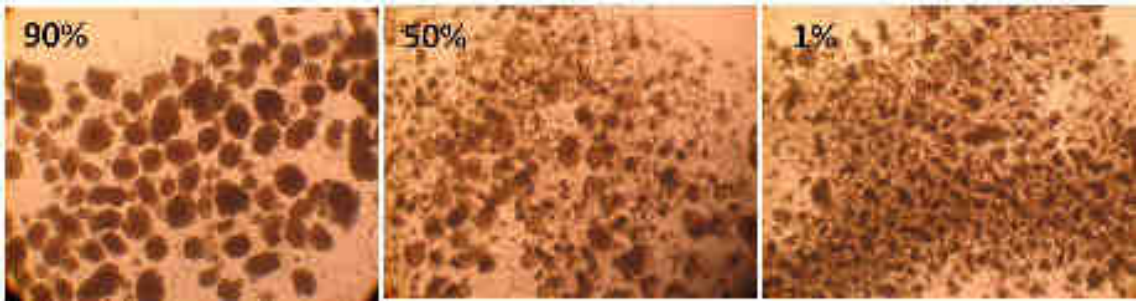


Figure 2-15. Préparations d'îlots pancréatiques de rat.

Le pourcentage représente le degré de pureté de la préparation, c'est-à-dire la quantité d'îlots par rapport à la quantité de tissu exocrine. (Cliché du laboratoire)

La méthode la plus commune de purification des îlots est la centrifugation en gradient de densité de Ficoll. Le remplacement du saccharose initial par le Ficoll, un polymère de saccharose de grand poids moléculaire (40 kD), a permis de récupérer des îlots viables (Scharp, et al., 1973). Lorsque la poudre de Ficoll est dissoute dans une solution Euro-Collins, l'exposition hypertonique du tissu exocrine réduit le gonflement des cellules et augmente la différence de densité entre les îlots et le tissu exocrine, et facilite donc la récupération des îlots (Lakey, et al., 1998). Cependant, la densité des îlots ou du tissu exocrine dépend de plusieurs conditions telles que le temps d'ischémie chaude ou froide, le temps de pré-incubation avant purification, et de l'osmolalité des solutions de pré-incubation et de purification (Eckhard, et al., 2004).

De plus, la purification peut entraîner la diminution du nombre d'îlots récupérés à partir du tissu digéré et peut entraîner des lésions de l'îlot. Ainsi, bien que les quantités d'îlots avant purification peuvent être suffisantes, le rendement d'isolement des îlots après purification

peut parfois être en dessous du nombre minimum nécessaire à transplanter. Dans certains cas, une proportion non négligeable d'îlots peut être trouvée dans les fractions les moins pures. Des données suggèrent que l'utilisation d'une solution de densité plus élevée peut améliorer le taux de récupération des îlots après purification car la densité des îlots serait plus proche ou supérieure à 1,100 g/cm^3 (Ichii, et al., 2005). Plus récemment, une étude menée avec des îlots de souris a démontré que les îlots isolés sur un gradient de Ficoll ont une meilleure fonctionnalité *in vitro* comparé à ceux purifiés sur un gradient d'Histopaque ou de Dextran. Toutefois, quelque soit le type de gradient utilisé, la fonctionnalité *in vivo* est identique (McCall, et al., 2011).

- ***Evaluation de la quantité d'îlots***

Depuis 1989, un consensus détermine les critères pour mesurer la quantité d'îlots (**Tab. 1-3**). Le diamètre de chaque îlot de chaque préparation est catégorisé dans une gamme de taille : 50-100 µm; 101-150 µm; 151-200 µm; 201-250 µm, 251-300 µm, 301-350 µm et au-delà de 350 µm. Le nombre d'îlots de chaque catégorie est compté. Un « îlot équivalent » (IEQ) est défini comme un îlot avec un diamètre de 150 µm. Le nombre d'îlots équivalents dans chaque classe est calculé en multipliant le nombre d'îlots avec un facteur de conversion (Ricordi, et al., 1990).

Diamètre de l'îlots gamme (µm)	Volume moyen (µm³)	Facteur de conversion
50-100	294 525	n / 6
100-150	1 145 373	n / 1.5
150-200	2 977 968	n x 1.7
200-250	6 185 010	n x 3.5
250-300	11 159 198	n x 6.3
300-350	18 293 231	n x 10.4
350-400	27 979 808	n x 15.8
400-450	40 611 628	n x 23
450-500	55 581 390	n x 32

Tableau 2-3. Conversion en îlots équivalent.

Le volume des îlots est déterminé pour chaque intervalle de 50 µm de diamètre. Le facteur de conversion permet de convertir les îlots en îlots équivalent c'est-à-dire en îlots de 150 µm de diamètre. (Ricordi, et al., 1990).

2.4.1.1.3.5 La culture d'îlots pancréatiques

La culture d'îlots a pour but de maintenir leur fonctionnalité jusqu'au moment de la transplantation. Dans son microenvironnement natif, l'îlot est inséré dans une grande quantité

de tissu environnant qui lui fournit un milieu de protection adapté (Daoud, et al., 2010). Après isolement, les îlots sont exposés à une variété de stress cellulaires conduisant à l'apoptose des cellules ß principalement (Paraskevas, et al., 2000). L'hypoxie vasculaire et l'absence de membrane basale péri-insulaire sont les principaux facteurs à l'origine de cette apoptose. Par conséquent, le développement d'une méthode de culture *in vitro* viable pour les îlots humains est limité par la reconstitution de ce microenvironnement et le rétablissement de la membrane basale perdue lors de l'isolement (Daoud, et al., 2010).

- ***Modification des conditions de culture***

Le but de la culture d'îlots en suspension est la préservation de leur structure tridimensionnelle, qui est perdue si la cellule adhère au support. L'approche la plus simple et la plus étudiée pour la préservation des îlots *in vitro* est la modification des conditions de culture c'est-à-dire un changement de température, ou de composition des milieux de culture (Ishii, et al., 2012).Toutefois, cela ne suffit pas à compenser la perte de la membrane basale des îlots et la perte subséquente de fonctionnalité et de viabilité. L'apoptose des îlots pancréatiques apparaît peu de temps après l'isolement et principalement chez les cellules ß (Paraskevas, et al., 2000).

- ***Intégration des îlots dans une matrice***

Pour améliorer la survie des îlots après isolement, plusieurs études ont mis l'accent sur le rétablissement de la matrice extracellulaire et la détermination des relations cellule-matrice. Des études ont permis d'établir que les interactions îlots-matrice ou îlots-matériaux synthétiques de la matrice sont impliquées dans la survie cellulaire, la sécrétion d'insuline, la prolifération cellulaire (Stendahl, et al., 2009). D'autres travaux ont également montré que des îlots incomplètement isolés qui conservent une partie de leur matrice extracellulaire native présentent une amélioration significative de leur viabilité et de leur fonctionnalité *in vitro* par rapport à des îlots complètement isolés et purifiés (Thomas, et al., 1999). L'ensemble de ces travaux a conduit à l'élaboration de matrices solides qui intègrent les îlots et maintiennent leur intégrité structurelle et fonctionnelle. L'usage de matrice de fibrine supplémentée avec une émulsion de perfluorodécaline a fourni un environnement physico-chimique favorable à la fonctionnalité et la viabilité des îlots en culture (Maillard, et al., 2011). Toutefois, l'emprisonnement des îlots dans ce type de matrice solide n'est pas favorable à une mise en

suspension de ces derniers (indispensable avant transplantation) et représente un traumatisme supplémentaire qui est néfaste pour la transplantation.

2.4.1.1.3.6 L'implantation des îlots pancréatiques

Les îlots sont administrés dans le réseau porte du receveur après cathétérisme sous repérage échographique, sous anesthésie locale. Dix milles îlots équivalents/kg de poids corporel sont transplantés à chaque patient, souvent administrés en deux ou parfois trois perfusions de donneurs successives.

Toutefois, le développement clinique de la thérapie cellulaire du diabète se heurte aujourd'hui à trois obstacles majeurs : le rejet immunitaire, la durée limitée de la fonction chez le receveur et la faible implantation initiale des îlots. Plus précisément, la faible implantation peut s'expliquer notamment par la survenue d'une intense réaction inflammatoire responsable de la perte de 50% des îlots transplantés (Bennet, et al., 1999). Il faut également prendre en compte le rôle du site d'implantation, de la vascularisation des îlots, des traitements immunosuppresseurs dans ce processus.

- ***Le site d'implantation***

Actuellement, le site veineux portal intra-hépatique est le seul site de transplantation pour les îlots pancréatiques qui a régulièrement donné lieu à une insulino-indépendance chez le receveur. Bien que le foie comme site de transplantation soit extrêmement bien caractérisé, la discussion sur le site à utiliser reste entière, puisqu'il est aujourd'hui bien établi qu'une quantité importante d'îlots est perdue immédiatement après transplantation (Bennet, et al., 2000).

Le foie présente l'avantage d'une double vascularisation artérielle et veineuse, mais sa tension en oxygène parenchymateuse est bien inférieure à celle du pancréas (Carlsson, et al., 2001). Pourtant, les îlots sont métaboliquement actifs et nécessitent un apport en oxygène, en glucose et autres métabolites pour leur survie. Etant donné que la revascularisation des îlots pancréatiques transplantés n'est pas immédiate, la présence d'un bon apport vasculaire est d'autant plus indispensable. De plus, afin d'exercer leur fonction endocrinienne, les îlots pancréatiques requièrent un accès aux taux de glucose sanguin et à un système de distribution de l'insuline pertinent (Merani, et al., 2008).

Ainsi, l'emplacement idéal serait un site immunoprivilégié accessible aux traitements immunosuppresseurs. Il permettrait également un accès chirurgical aisé pour minimiser la

survenue de complications et faciliter la surveillance d'éventuelles complications (par visualisation radiologique ou biopsie). Enfin, un site de transplantation qui nécessiterait une quantité réduite d'îlots présenterait l'avantage de réduire le nombre de donneurs et de perfusions multiples.

De nombreux sites d'implantation expérimentaux ont été proposés (rate, rein, omentum, etc) chez le petit animal où le succès des transplantations a été clairement lié à l'emplacement de la transplantation (Merani, et al., 2008) (**Tab.1-4**). Toutefois, l'expérience relativement limitée chez le gros animal et l'humain confère une applicabilité limitée dans le milieu clinique. Par conséquent, la transplantation d'îlots intra-portale reste la méthode de choix.

	Site	Souris	Rat	Chien	Porc	Primate	Humain
Vasculaire	Foie (veine porte)	300, 500-800	550, 1500, > 3500	> 4500 / kg, 3000 IEQ/kg (110% de [illegible]), 12 500 IEQ/kg	3000-5000 IEQ/kg non purifiée	> 7227 IEQ/kg	Intolérance intraportale 7227 IEQ/kg, 10 000 IEQ/kg (pancréatite d'[illegible])
	Artère mésentérique					> 12 500 IEQ / kg insuffisant	
	Rate	300	600-800	7224 IEQ/kg, > 5050 /kg, 7500 IEQ/kg non purifiée			expérimentale
	Poumon (intravasculaire)		Expérimentale				
Organe	Capsule Rénale	300, 750, 800	1500, 1500, > 2500, 5000	5500/kg insuffisant	3000 IEQ/kg non purifiée dans pelloïne-alginate		expérimentale
	Poumon		> 500, 800				
	Intramusculaire	300, 500					9450 IEQ/kg (fonction marginale), abandonné
	Omentum	1500 (intramusculaire)	1500 2000	5950 IEQ/kg non purifié, 6200 IEQ/kg			
	Tissu de Sertoli	350, 500	770 insuffisant, 1500	10 000 IEQ/kg non purifiée			
	Sous cutané	500 et 750 insuffisant, 600, 800 insuffisant	830 insuffisant				
Immuno-privilégié	Angle trabéculaire		110				
	Testicules hétérotopiques	400	1500 2600, 2100 2500				
	Thymus		2 2010	6010 IEQ/kg (90% de succès)			sous recherche

Tableau 2-4. Quantité d'îlots requise pour inverser l'hyperglycémie dans divers sites de trasnplantation (Merani, et al., 2008)

- ***La vascularisation***

Afin d'assurer leur survie et leur fonction après transplantation, les îlots ont besoin d'être correctement revascularisés. Pourtant, des études expérimentales montrent que des îlots

humains transplantés en intra portal dans un modèle de souris nude sont mal revascularisés (Lau & Carlsson, 2009). En effet, les premiers des dérivés néovasculaires issus des cellules endothéliales du receveur (Vajkoczy, et al., 1995) forment un réseau vasculaire dans le voisinage immédiat des îlots dès sept jours après transplantation, et s'établissent après seulement 10 à 14 jours (Vajkoczy, et al., 1995; Merchant, et al., 1997). Toutefois, le retard de la reperfusion artérielle et hypoxique cause la mort inévitable des cellules des îlots et le dysfonctionnement du greffon (Davalli, et al., 1996). De plus, les cellules ß situées au centre de l'îlot sont les cibles privilégiées de l'hypoxie en raison de la diffusion limitée de l'oxygène et des nutriments (Hughes, et al., 2003). Avec le temps, la maturation du système vasculaire continue et le taux d'apoptose des îlots transplantés 3 mois après transplantation devient semblable à celui des îlots natifs.

- ***L'immunosuppression***

L'auto-transplantation d'îlots est pratiquée depuis plusieurs décennies chez des patients souffrant de pancréatite chronique qui nécessitent une pancréatectomie totale ou quasi-totale (Farney, et al., 1991). Approximativement 70% de ces patients maintiennent une insulino-indépendance et dans certains cas pendant plus de 21 ans. Bien que la transplantation d'îlots peut facilement contrôler le diabète chez les patients pancréatectomisés, l'échec de l'allo-transplantation d'îlots chez les patients diabétiques de type 1 est probablement due à la toxicité diabétogène du traitement immunosuppresseur et à la destruction auto-immune des îlots transplantés.

L'immunosuppression commence avant la transplantation avec cinq doses bi-hebdomadaires d'un anticorps humanisé anti-IL-2Rα appelé daclizumab (Zenapax®; Roche). Elle est maintenue pendant plusieurs mois par l'administration continue de faibles doses de rapamycine (sirolimus), qui inhibe la réponse à l'IL-2, et le FK506 (tacrolimus), un inhibiteur de la calcineurine bloquant la production d'IL-2.

- La toxicité des immunosuppresseurs

La perte de fonctionnalité et le retard de revascularisation des îlots induit par les traitements immunosuppresseurs sont délétères pour le maintien à moyen et long terme des îlots transplantés. En effet, le tacrolimus est capable d'inhiber la transcription des ARN messagers de l'insuline dans les îlots de rat *in situ* (Tamura, et al., 1995) et de diminuer la fonctionnalité des îlots humains transplantés dans des souris nude (Ricordi, et al., 1991).

La rapamycine, à une concentration généralement utilisée pour empêcher le rejet de greffe d'îlots (10 ng/ml), est capable de réduire le taux de prolifération des cellules β des îlots de Langerhans de rat transplantés, mais aussi dans les îlots natifs murins. (Niclauss, et al., 2011). De plus, d'autres travaux ont suggéré que la rapamycine a des propriétés anti-angiogéniques (Cantaluppi, et al., 2006). Ces données suggèrent que le dysfonctionnement progressif des îlots peut être dû au traitement immunosuppresseur qui peut résulter en partie d'une altération de la régénération des cellules β. Ainsi, les effets du sirolimus et du tacrolimus sont d'autant plus délétères qu'ils surviennent durant la phase précoce post-transplantation lorsque les îlots sont encore en phase de « récupération » de l'isolement et de prise de greffe (Desai, et al., 2003).

- La récurrence de l'auto-immunité

La thérapie immunosuppressive utilisée par le protocole d'Edmonton chez les diabétiques de type 1 induit une lymphopénie, associée à des niveaux élevés de cytokines homéostatiques (IL-7 et IL-15) et une expansion de la population des lymphocytes T $CD8^+$ autoréactifs (Monti, et al., 2008). Ces derniers sont incapables de produire de l'interféron-γ, qui est connu pour favoriser l'inflammation et la destruction des îlots de DT1. Les patients, traités par l'association de sirolimus et de tacrolimus, ont une augmentation des lymphocytes T autoréactifs GAD65, dont 30% prolifèrent *in vivo* et expriment le marqueur mémoire CD45RO. Cette expansion homéostatique des lymphocytes T autoréactifs peut ainsi expliquer le succès limité du protocole d'Edmonton au fil du temps. Dans ce contexte, des études ont montré que les patients avec une auto-immunité cellulaire pour GAD préexistante perdent la fonctionnalité des îlots plus rapidement que les patients sans auto-immunité cellulaire préexistante pour GAD en dépit de l'immunosuppression avec le protocole d'Edmonton (King, et al., 2004).

De plus, l'expansion des cellules T régulatrices (Tregs) semble être un élément important afin de limiter la réactivité auto-immune au cours de la lymphopénie (Krupica, et al., 2006). Par conséquent, les données sur la perte ou l'expansion homéostatique des Tregs suivant l'immunosuppression systémique avec le protocole d'Edmonton sont très intéressantes. La prolifération des Tregs dépend de l'IL-2 (Malek & Bayer, 2004), ainsi un blocage de la signalisation et de la production de IL-2 au cours de l'immunosuppression par le protocole d'Edmonton réduit la prolifération non seulement de cellules effectrices mais aussi des Tregs.

Un traitement immunosuppresseur idéal aurait donc pour objectif de minimiser la déplétion en lymphocytes et de préserver la fonction des lymphocytes T régulateurs. Ce traitement éviterait de cibler les cytokines nécessaires à l'expansion et à la fonction de Tregs et/ou induirait

directement des Tregs spécifiques pour des antigènes d'îlots de Langerhans (Van Belle & von Herrath, 2008).

2.5 Inflammation et transplantation d'îlots pancréatiques

2.5.1 L'inflammation

L'inflammation est la réponse immédiate de l'organisme aux dommages causés à ses tissus et aux cellules par des agents pathogènes, des stimuli nocifs tels que des produits chimiques ou des blessures physiques. L'inflammation aiguë est une réponse à court terme qui se traduit généralement par la guérison: les leucocytes infiltrent la région endommagée, enlèvent le stimulus et réparent le tissu. L'inflammation chronique, au contraire, est une réponse prolongée, dérégulée et inadaptée qui implique une inflammation active, la destruction des tissus et la réparation des tissus en vain. Une telle inflammation persistante est associée à de nombreuses conditions et maladies chroniques humaines, y compris l'allergie, l'athérosclérose, le cancer, l'arthrite et les maladies auto-immunes (Weiss, 2008).

La faible implantation initiale des îlots peut s'expliquer par une réaction inflammatoire aiguë non spécifique appelée « Instant Blood Mediated Inflammatory Reaction » (IBMIR). C'est une réaction thrombotique/inflammatoire qui se caractérise par une activation rapide des systèmes de la coagulation et du complément, par l'activation et la liaison des plaquettes à la surface des îlots, suivi par l'infiltration par les leucocytes des îlots. Après15 minutes, les îlots sont encapsulés dans des caillots et après une heure, la plupart des îlots sont infiltrés par de nombreux leucocytes. Le résultat est une perte de l'intégrité des îlots et la destruction de l'îlot (Bennet, et al., 2000; Moberg, et al., 2005). La perte rapide des îlots est associée à un pic de peptide C sérique indiquant que les îlots ont été endommagés (Moberg, et al., 2002).

2.5.2 La réponse inflammatoire aiguë

2.5.2.1 Les voies de signalisation

L'invasion de l'organisme par des agents pathogènes infectieux ou la détection d'une lésion tissulaire déclenche une batterie de réponses immunitaires à travers des interactions entre un large éventail de stimuli et les mécanismes de surveillance immunitaire de l'hôte. Les interactions hôte-pathogène sont généralement initiées par la reconnaissance de structures moléculaires conservées connues sous le nom de « pathogen-associated molecular patterns » (PAMPs) (Janeway & Medzhitov, 2002) qui sont essentielles pour le cycle de vie de l'agent pathogène. Toutefois, ces PAMPs sont soit absents, soit compartimentés à l'intérieur de la

cellule hôte. Ils sont détectés par des récepteurs appelés « pattern recognition receptors » (PRRs), qui sont exprimés notamment sur les cellules immunitaires innées telles que les cellules dendritiques, les macrophages et les polynucléaires neutrophiles (Kawai & Akira, 2010). La détection de PAMPs induit rapidement une réponse immunitaire de l'hôte via l'activation de voies de signalisation complexes. Elle aboutit à l'induction d'une réponse inflammatoire médiée par diverses cytokines (IL-6, TNF…etc) et chimiokines (CCL2, CXCL1…etc), qui par la suite facilite l'éradication de l'agent pathogène (Kawai & Akira, 2010).

Plusieurs classes de PRRs, tels que les Toll-like récepteurs (TLRs), les récepteurs « RIG-I-like » (RLRs), les récepteurs « NOD-like » (NLRs) et les récepteurs à l'ADN (« sensor » cytosoliques pour l'ADN), ont été découverts et caractérisés. Ces PRRs sont au premier plan de la reconnaissance des agents pathogènes intracellulaires et extracellulaires mais détectent aussi diverses classes de molécules comprenant des protéines, des lipides, des glucides et des acides nucléiques d'origine endogènes (Kumar, et al., 2011) (**Fig. 1-16**).

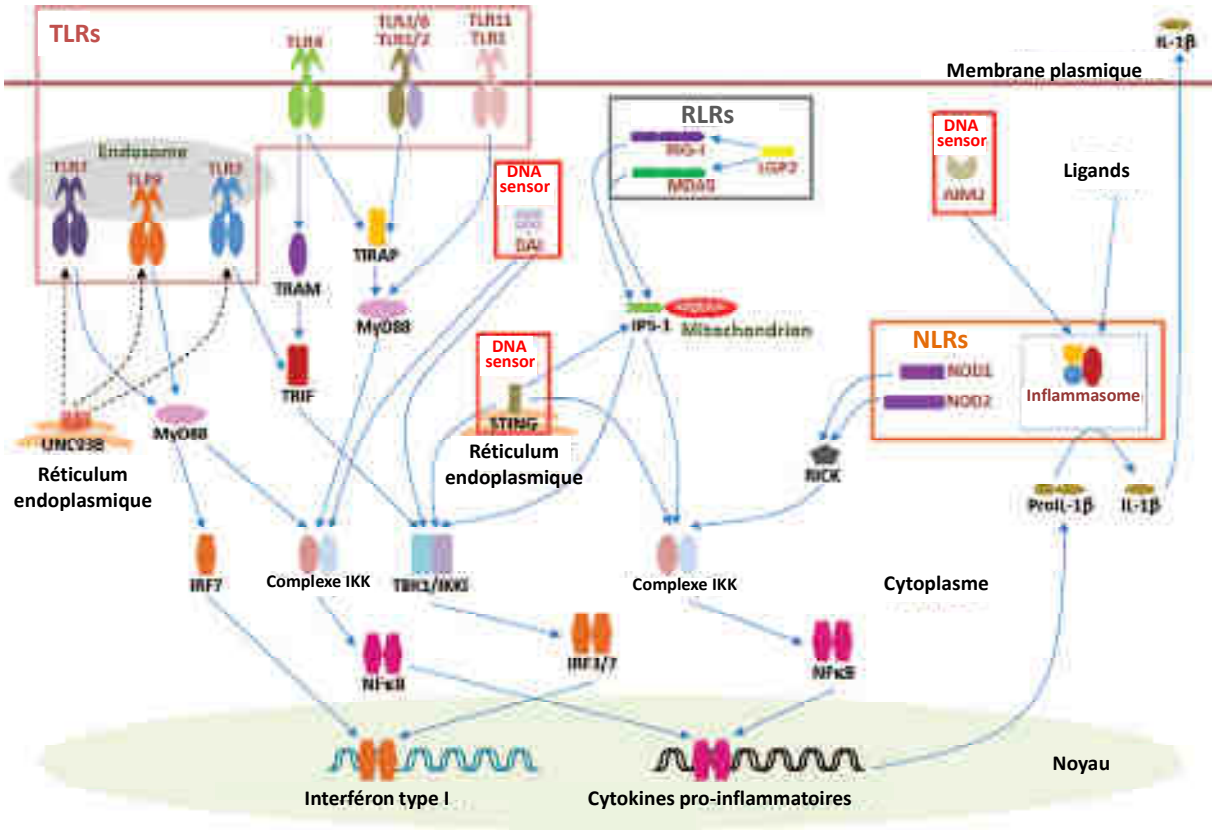


Figure 2-16. Voies de signalisation médiées par les différentes classes de PRRs

La voie de signalisation des Toll-like receptors (TLRs) permet la reconnaissance des PAMPs par les TLRs localisés sur la membrane plasmique, tels que TLR4, TLR5, TLR11, et TLR2 (TLR2 forme un hétérodimère avec TLR1 ou TLR6 pour former un complexe récepteur fonctionnel) et les TLRs localisés sur l'endosome, tels que TLR3, TLR7 et TLR9. Tous les TLRs, à l'exception de TLR3, recrutent MyD88 et activent la voie de signalisation MyD88 dépendante. La voie de signalisation MyD88 dépendante est initiée par le recrutement et l'activation de diverses molécules de signalisation pour initier la transcription des gènes codant pour les cytokines inflammatoires.
La voie de signalisation des RIG-I-like recepteurs (RLRs) permet la reconnaissance de PAMPs par des « sensors » cytosoliques, comme RIG-I et MDA5 qui entraîne par une cascade de signalisation la production de cytokines inflammatoires et d'interférons de type I.
Les voies de signalisation dépendantes des « sensors » cytosolique d'ADN permettent la détection de PAMPs dans le cytoplasme des cellules par « sensors » cytosolique d'ADN.
La voie de signalisation des Nod-like recepteurs (NLRs) permet la reconnaissance des PAMPs par Nod1 et Nod2 qui initient le recrutement de Rick, qui active NF-κB. (Kumar, et al., 2011).

En effet, l'objectif premier du système immunitaire n'est pas de discriminer le soi et le non-soi, mais plutôt de détecter et de se protéger contre le danger (Matzinger, 1994). Les PAMPs et les molécules endogènes générées par une lésion tissulaire (« Damage-Associated Molecular Patterns », DAMPs), signalent la menace d'une infection ou d'une lésion à l'organisme, indépendamment de leur identité endogène ou exogène (Beutler, 2007). Parmi les récepteurs cellulaires qui détectent ces signaux de danger, les TLRs représentent un lien

moléculaire entre la lésion tissulaire, l'infection, et l'inflammation. (Piccinini & Midwood, 2010)

2.5.2.1.1 Les récepteurs de l'inflammation

Chez l'Homme, 10 membres de la famille des TLRs ont été identifiés, tandis que chez la souris 12. Les TLRs 1 à 9 sont conservés chez l'Humain et la Souris. TLR10 est exprimé chez l'homme, mais pas chez la Souris, tandis que TLR11 est exprimé chez la Souris, mais pas chez l'Homme (Beutler, 2007). Les TLRs sont des glycoprotéines membranaires de type I et se composent d'un domaine extracellulaire riche en répétitions leucine nécessaires pour la reconnaissance des ligands et un domaine cytoplasmique Toll/interleukin-1(TIR), nécessaire pour la signalisation en aval (Kumar, et al., 2011).

Un certain nombre de ligands endogènes des TLRs, spécifiquement générés lors d'une lésion tissulaire ont été identifiés. Certains sont des molécules intracellulaires (protéine de choc thermique…) normalement inaccessibles au système immunitaire qui sont libérées dans le milieu extracellulaire en raison de la nécrose des cellules ou d'une activation suite à une lésion. D'autres sont des fragments de molécules de la matrice extracellulaire (MEC) qui sont libérés suite à un dommage tissulaire ou des molécules de la MEC dont la présence est spécifiquement augmentée en réponse à une lésion tissulaire (Kono & Rock, 2008).

La « Heat shock protein » 60 (HSP60) est le premier activateur endogène putatif des TLRs découvert (Ohashi, et al., 2000). La liste des activateurs endogènes de TLR2 et 4 s'est agrandie rapidement et inclut d'autres molécules intracellulaires telles que les protéines de choc thermique HSP70, Gp96, HSP22, et HSP72 et la protéine « high-mobility group box-1 » (HMGB1) ainsi que des molécules de la MEC telles que le biglycane, la tenascine-C, le versicane, et des fragments de molécule de la MEC, y compris les oligosaccharides de l'acide hyaluronique et le sulfate d'héparane (Piccinini & Midwood, 2010). Une liste plus exhaustive de DAMPs associés à leurs TLRs apparentés est décrite dans le **tableau 1-5**.

PROTEINES,PEPTIDES		ACIDES GRAS, LIPOPROTEINES	
TLR-1	*β*-défensine-3	**TLR-2**	Sérum amyloïde A
TLR-2	HSP60, 70, Gp96 HMGB1 Complexe HMGB1-nucleosome *β*-défensine-3 Protéine du surfactant A, D Neurotoxine derivée de l'éosinophile Anticorps anti-phospholipide	**TLR-4**	Sérum amyloïde A LDL oxydée Acide gras saturé
		PROTEOGLYCANES, GLYCOSAMINOGLYCANES	
		TLR-2	Biglycane Versicane Fragments d'acide hyaluronique
TLR-4	HMGB1 Fibronectine EDA Fibrinogène Ténascine-C (FBG) Protéine du surfactant A, D *β*-défensine-2 HSP60, 70, 72, 22, Gp96 S100A8 (MRP8) S100A9 (MRP14) Elastase des neutrophiles Anticorps anti-phospholipide Lactoferrine	**TLR-4**	Biglycane Fragments de sulfate héparane Fragments d'acide hyaluronic
		ACIDES NUCLEIQUES, COMPLEXES ACIDE NUCLEIQUE - PROTEINE	
		TLR-3	ARNm
		TLR-7	ARN simple brin
TLR-7	Anticorps anti-phospholipide	**TLR-8**	ARN simple brin
TLR-8	Anticorps anti-phospholipide	**TLR-9**	complexes IgG-chromatine

Tableau 2-5. Activateurs endogènes des TLR.
(Piccinini & Midwood, 2010)

Les TLRs sont capables de reconnaître leurs ligands exogènes de trois manières différentes. Cette reconnaissance implique l'homo- et hétéro-dimérisation des TLRs ainsi que l'interaction directe entre les TLRs et leurs ligands ou l'utilisation de co-récepteurs et de molécules accessoires. Un certain nombre de molécules accessoires est identifié comme facilitant la reconnaissance microbienne par les TLRs, telles que CD14, MD-2. Ces co-récepteurs et ces molécules accessoires nécessaires à la reconnaissance des ligands par les TLR sont partagés par les DAMPs et les PAMPs.

Malgré la diversité des mécanismes d'interaction ligand-TLR, des similitudes dans l'organisation des complexes ligand-TLR peuvent s'appliquer à tous les TLRs. La

signalisation en aval s'exécute grâce au recrutement de molécules adaptatrices spécifiques. Cinq adaptateurs ont été décrits jusqu'à présent: « myeloid differentiation factor 88 » (MyD88), « MyD88-adaptor like » (Mal), « TIR domain containing adaptor inducing IFN-beta » (TRIF), « TRIF-related adaptor molecule » (TRAM), et « sterile alpha and HEAT Armadillo motifs » (SARM) (Kenny & O'Neill, 2008). Selon les adaptateurs recrutés par les TLRs, deux voies principales de signalisation intracellulaires peuvent être activées (**Fig. 1-17**)

- La première, la voie MyD88-dépendante, qui est activée par tous les TLRs, sauf TLR3. Elle met en jeu les « IL-1R-associated kinases » (IRAK), IRAK-1 et IRAK-4, le TNF receptor-associated factor (TRAF-6), et les mitogen-activated kinases (MAPK) et culmine dans l'activation du facteur de transcription NF-κB via le complexe IκB kinase (IKK). À son tour, NFkB induit la transcription de gènes codant des cytokines pro-inflammatoires.
- La seconde voie, connue comme la voie TRIF, est indépendante de MyD88 et peut être activée lors de la stimulation du TLR3 ou 4. Elle conduit à l'activation de la famille des facteurs de transcription « interferon regulated factors » (IRF) par le recrutement de TRIF en résulte la synthèse d'interféron (IFN).

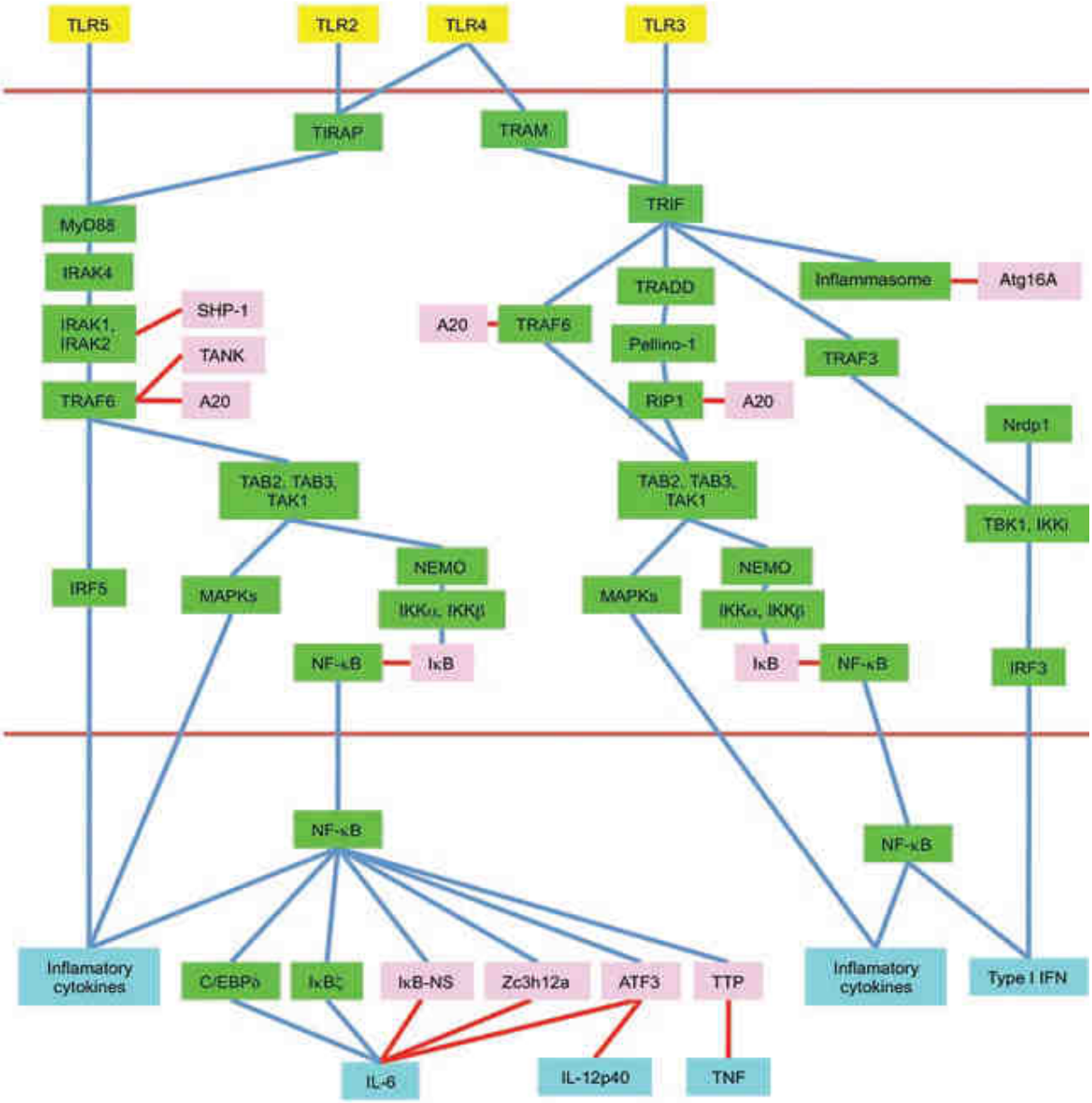


Figure 2-17. Vue d'ensemble de la signalisation des TLR-2 ;-3 ;-4 ;-5.

(Kawai & Akira, 2010)

Les voies de signalisation induites par les molécules endogènes dans différents types cellulaires sont peu étudiées, mais des études récentes relatent l'utilisation de molécules adaptatrices distinctes et l'induction des voies de signalisation distinctes lorsque le TLR est stimulé avec ses ligands exogènes ou endogènes (Piccinini & Midwood, 2010).

2.5.2.1.2 Les médiateurs de l'inflammation

2.5.2.1.2.1 Les protéines de la phase aiguë de l'inflammation

Chez les mammifères, l'inflammation aiguë est associée à une augmentation transitoire d'un groupe de protéines circulantes qui sont collectivement connues sous le nom de protéines de la phase aiguë. Ce groupe de protéines comprend notamment la protéine amyloïde A sérique (« serum amyloid A protein » ; SAA), le fibrinogène, la protéine réactive-C (« C-reactive protein » ; CRP), l'haptoglobine, les facteurs du complément C3 et C9, l'hémopexine, la céruloplasmine, l'α2-macroglobuline (α2-M), le CD14, l'α1-antichymotrypsine (ACT), la protéinase α1-cystéine inhibitrice (« *α*1-cysteine proteinase inhibitor » ; α1CPI), et l'α1-antitrypsine (AAT) (Parker & . Picut, 2005). Les protéines de la phase aiguë sont responsables d'un bon nombre d'effets systémiques de l'inflammation, visant essentiellement à préparer le corps à résister à l'invasion systémique et à faciliter la résistance locale aux agents pathogènes. Les inhibiteurs de protéases de la phase aiguë (AAT, ACT, α1CPI,et α2M) diminuent les dommages tissulaires des protéases libérées par les cellules mortes ou mourantes. L'hémopexine et l'haptoglobine se lient à l'hème et la globine, respectivement, qui peuvent être libérées par l'érythrolyse lors de lésions inflammatoires. La SAA et la CRP ont des fonctions qui suggèrent un rôle de « scavenger », mais aucune fonction ne justifie l'expression accrue de ces protéines (jusqu'à 1000 ×) dans une réaction en phase aiguë. (Parker & . Picut, 2005)

La CRP est un membre de l'ancienne famille hautement conservée des protéines pentraxines, elle est agencée en un homopentamère cyclique. La CRP agit comme un agent opsonisant, elle active le complément, se lie aux récepteurs des Immunoglobulines G (IgG) sur les cellules des mammifères et aux phosphocholines dans les membranes bactériennes. Elle reconnaît ensuite les constituants nucléaires dans les cellules endommagées. La CRP est un indicateur fiable de l'inflammation associée à l'athérosclérose chez l'homme (Dupuy, et al., 2003). Toutefois, la CRP n'est pas un système indicateur fiable de l'inflammation chez toutes les espèces. L'haptoglobine sérique est un meilleur indicateur du niveau d'inflammation systémique chez le porc. Le dosage de l'α2-macroglobuline sérique (**Fig. 1-18**), haptoglobine ou le fibrinogène est plus précis que le taux de CRP comme indicateur de l'inflammation chez les rats de laboratoire (Giffen, et al., 2003).

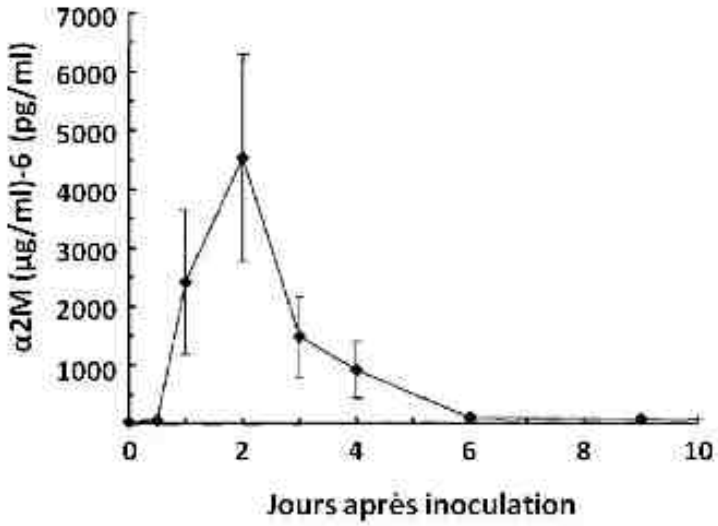


Figure 2-18. Evolution de la concentration en α2-Macroglobuline (α2-M) après injection d'huile de térébenthine chez le rat

(Jinbo, et al., 2002)

La réponse de phase aiguë est générée lorsque des blessures à un endroit extrahépatique activent les macrophages locaux pour libérer une première vague de cytokines qui comprend l'IL-1, le « Tumor Necrosis Factor », et une petite quantité d'IL-6. L'absorption de la première salve de cytokines dans les cellules environnantes est suivie par la libération d'une deuxième vague de cytokines, comprenant une grande quantité d'IL-6 qui favorise la production massive de protéines de phase aiguë par les hépatocytes (Parker & . Picut, 2005). IL-6 est la molécule de signalisation prototype dans l'induction de la réponse de phase aiguë (**Fig. 1-19**). Mais, l'IL-22 qui est produite par les cellules T activées, a également la capacité de réguler la production des protéines de phase aiguë (Wolk, et al., 2010).

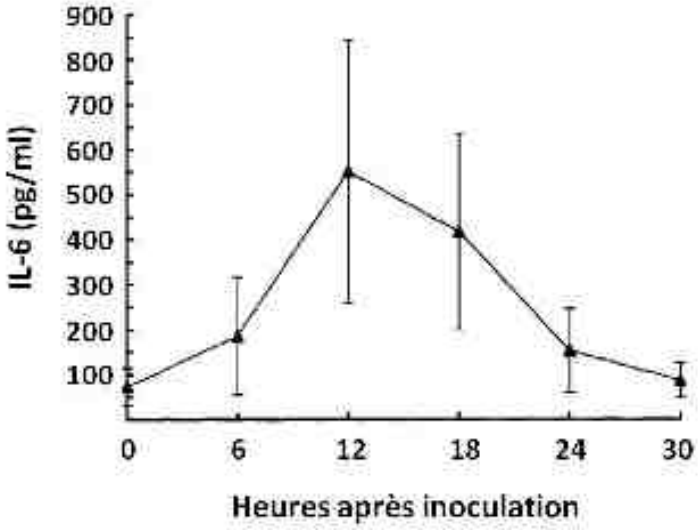


Figure 2-19. Evolution de la concentration en interleukine-6 (IL-6) après injection d'huile de térébenthine chez le rat

(Jinbo, et al., 2002)

2.5.2.1.2.2 Cytokines

Le mot « cytokine » vient du grec « cyto » et « kinine » qui signifient respectivement cellule et hormones. Les cytokines sont des protéines solubles « hormone-like » qui permettent la communication entre les cellules et l'environnement. « Cytokine » est un terme générique qui regroupe les lymphokines, les monokines, les interleukines, les facteurs de stimulation des colonies (CSFs), les interférons, le facteur de nécrose tumorale et les chimiokines (Tayal & Kalra, 2008) (**Tab. 1-6**).

Famille	Membres
Hématopoïétique	
Chaîne γ commune	IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21
Chaîne β partagée (CD131)	IL-3, IL-5, GM-CSF
Chaîne Il-2β (CD122) partagée	IL-2, IL-15
Autres hématopoïétiques	IFN-γ, IL-7, IL-13, IL-21, IL-31, TSLP
Famille de l'IL-1	IL-1α, IL-1β, IL-1ra, IL-18, IL-33
Utilisant gp130	IL-6, IL-11, IL-27, IL-31, Facteur Neutrophique Ciliaire (CNTF), Cardiotrophine 1 (CT-1), Facteur inhibiteur de la leucémie (LIF), Oncostatine M (OSM), Ostéopontine
IL-12	IL-12, IL-23, IL-35
Superfamille de l'IL-10	IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, IL-29
IL-17	IL-17A-F, IL-25, (IL-17E)
Interférons	
Interférons de type I	IFN-α, IFN-β, IFN-ω
Interférons de type II	IFN-γ (aussi un cytokine hématopoïétique)
Interférons de type III	IFN-λ1 (IL-29), IFN-λ2 (IL-28A), IFN-λ3 (IL-28B)
Superfamille du TNF	TNF-α, TNF-β, BAFF (Facteur activateur des cellules B), APRIL (Ligand induisant l'apoptose)

Tableau 2-6. Les différentes familles de cytokines
(Commins, et al., 2010)

Les cytokines sont des protéines sécrétées impliquées dans de nombreux aspects de la croissance, de la différenciation et de l'activation cellulaire. Une caractéristique majeure de ces molécules est leur effet sur le système immunitaire à l'égard du trafic cellulaire et du développement des tissus, et des organes immunitaires. La nature de la réponse immunitaire

détermine quelles sont les cytokines produites et en dernier ressort si la réponse est cytotoxique, humorale, à médiation cellulaire, ou allergique (Commins, et al., 2010).

- Les cytokines produites par les cellules présentatrices d'antigènes (CPAs) :

Les cytokines principalement dérivées de cellules dendritiques (DCs), de phagocytes mononucléaires, et d'autres cellules présentatrices d'antigènes (CPAs) sont particulièrement efficaces à la fois dans la génération d'une réponse immunitaire innée et dans la signalisation contribuant à l'initiation et l'orientation de la réponse immunitaire adaptative. Le traitement des antigènes, la façon dont ils sont absorbés par les CPAs, métabolisés, et présentés aux lymphocytes Th fournit les informations nécessaires pour la catégorie de cytokines à produire. Alternativement, les CPAs sont puissamment activées par leur PRRs pour produire des cytokines. Les cytokines produites par les CPAs comprennent principalement le TNF, l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8 et d'autres membres de la famille des chimiokines, ainsi que l'IL-12, l'IL-15, l'IL-18, l'IL-23, l'IL-27 et l'IL-32 (Commins, et al., 2010).

Plus précisément, la famille du TNF représente 2 protéines homologues qui proviennent principalement des phagocytes mononucléaires (TNF-α) et des lymphocytes (TNF-ß) (Beutler & Cerami, 1989). Le TNF-α est également produit par les neutrophiles, les lymphocytes, les cellules NK, l'endothélium, et les mastocytes. Il est traité comme une protéine liée à la membrane à partir de laquelle le facteur actif soluble est clivé en utilisant l'enzyme de conversion du TNF-α (Perez, et al., 1990). Le TNF-α et le TNF-ß se lient aux mêmes récepteurs de surface cellulaire, le récepteur TNF I (p75) et le récepteur TNFII (p55), avec des affinités similaires et produisent des effets semblables, bien que non identiques (Tartaglia & Goeddel, 1992). Les TNFs induisent une immunité anti-tumorale par des effets directs cytotoxiques sur les cellules cancéreuses en stimulant les réponses immunitaires anti-tumorales. Les TNFs interagissent avec les cellules endothéliales pour induire la « intercellular adhesion molecule-1 » (ICAM-1), la « vascular cell adhesion molecule-1 » (VCAM-1), et l'E-sélectine, permettant ainsi le regroupement des granulocytes aux sites de l'inflammation. Les TNFs sont de puissants activateurs des neutrophiles, induisant l'adhésion, le chimiotactisme, la dégranulation, et le « burst oxydatif ». Enfin, les TNFs induisent une fuite vasculaire, des effets inotropes négatifs et sont le principal médiateur de choc septique (Tracey, et al., 1987).

D'autres part, l'interleukine-6 (IL-6) est produite principalement par les cellules mononucléaires phagocytaires (Akira, et al., 1993), mais elle est également produite par les

lymphocytes T et B, les fibroblastes, les cellules endothéliales, les kératinocytes, les hépatocytes, et les cellules de la moelle osseuse. Pour délivrer son signal, l'IL-6 se lie à la chaîne α du récepteur (IL-6R, CD126), la transduction du signal passe pargp130 (CD130). CD130 est exprimé de manière ubiquitaire, c'est le transducteur de signal commun pour plusieurs cytokines de la famille de l'IL-6. En revanche, l'expression de l'IL-6Rα est limitée. En plus du récepteur lié à la membrane, une forme soluble de IL-6R peut capturer l'IL-6 circulant et le rendre disponible pour se lier et activer gp130 (Müller-Newen, et al., 1998). La forme soluble de gp130 agit comme un récepteur anti-inflammatoire « leurre ».
Sous l'influence de l'IL-6, les lymphocytes B se différencient en plasmocytes matures et sécrètent des immunoglobulines. L'IL-6 induit l'activation, la croissance et la différenciation des cellules T. En plus de l'activation des lymphocytes, l'IL-6 partage plusieurs activités avec l'IL-1, comprenant l'induction de la fièvre et la production de protéines de la phase aiguë. L'IL-6 est l'inducteur la plus importante des protéines de la phase aiguë.

- Les cytokines anti-inflammatoires

En plus des cytokines qui induisent des réponses inflammatoires cytotoxiques, cellulaires, humorales ou allergiques, plusieurs cytokines ont principalement des effets anti-inflammatoires. Ces cytokines anti-inflammatoires comprennent notamment, le récepteur antagoniste de IL-1 (IL-1ra), mais aussi le « Transforming growth factor » (TGF-ß) et les membres de la famille de l'IL-10.
L'IL-10 est une cytokine immunorégulatrice importante avec de multiples effets biologiques sur différents types de cellules. Les principales sources d'IL-10 sont les monocytes, les cellules B et les lymphocytes T régulateurs chez l'homme (Del Prete, et al., 1993). L'IL-10 humaine forme un homodimère qui exerce ses fonctions biologiques par la formation du complexe IL-10 -IL-10R1 ou IL10-IL-10R2.
Pour induire ses effets anti-inflammatoires, l'IL-10 agit à différents stades de la réponse immunitaire et à différentes localisations anatomiques. L'IL-10 est initialement décrite comme une cytokine des cellules T_H2 (Fiorentino, et al., 1989). Toutefois l'expression de l'IL-10 n'est pas spécifique aux cellules T_H2 ou aux cellules Tregs, c'est une cytokine beaucoup plus largement exprimée (Saraiva & O'Garra, 2010). IL-10 est exprimée par de nombreuses cellules du système immunitaire adaptatif, comprenant les cellules T_H1, T_H2 etT_H17, les cellules Tregs, les cellules T $CD8^+$et les cellules B (Saraiva & O'Garra, 2010). IL-10 est également exprimée par les cellules du système immunitaire inné, y compris les cellules

dendritiques (DCs), les macrophages, les mastocytes, les cellules NK, les éosinophiles et les neutrophiles (Moore, et al., 2001). Ainsi, la production d'IL-10 semble être associée à de nombreuses cellules immunitaires, affirmant son rôle fondamental en tant que régulateur du système immunitaire, non seulement des réponses cellulaires T_H1 (Trinchieri, 2007) mais aussi des réponses T_H2 aux allergènes entre autres (Hawrylowicz & O'Garra, 2005).

- Les chimiokines

Les chimiokines sont un groupe de petites protéines (8-12kDa) avec 20 à 70 % d'homologie de séquences d'acides aminés. Elles sont divisées en familles sur la base de la position relative de leurs résidus de cystéine (Baggiolini, et al., 1997). Il y a au moins quatre familles de chimiokines, mais deux seulement ont été largement caractérisées. Les chimiokines α et ß qui contiennent quatre cystéines, semblent représenter les plus grandes familles. Chez les α-chimiokines, un acide aminé sépare les deux premiers résidus cystéine (cystéine – X -acide aminé - cystéine, ou CXC), alors que chez les ß-chimiokines, les deux premiers résidus cystéine sont contigus les uns aux autres (cystéine-cystéine, ou CC) (**Fig. 1-20**).

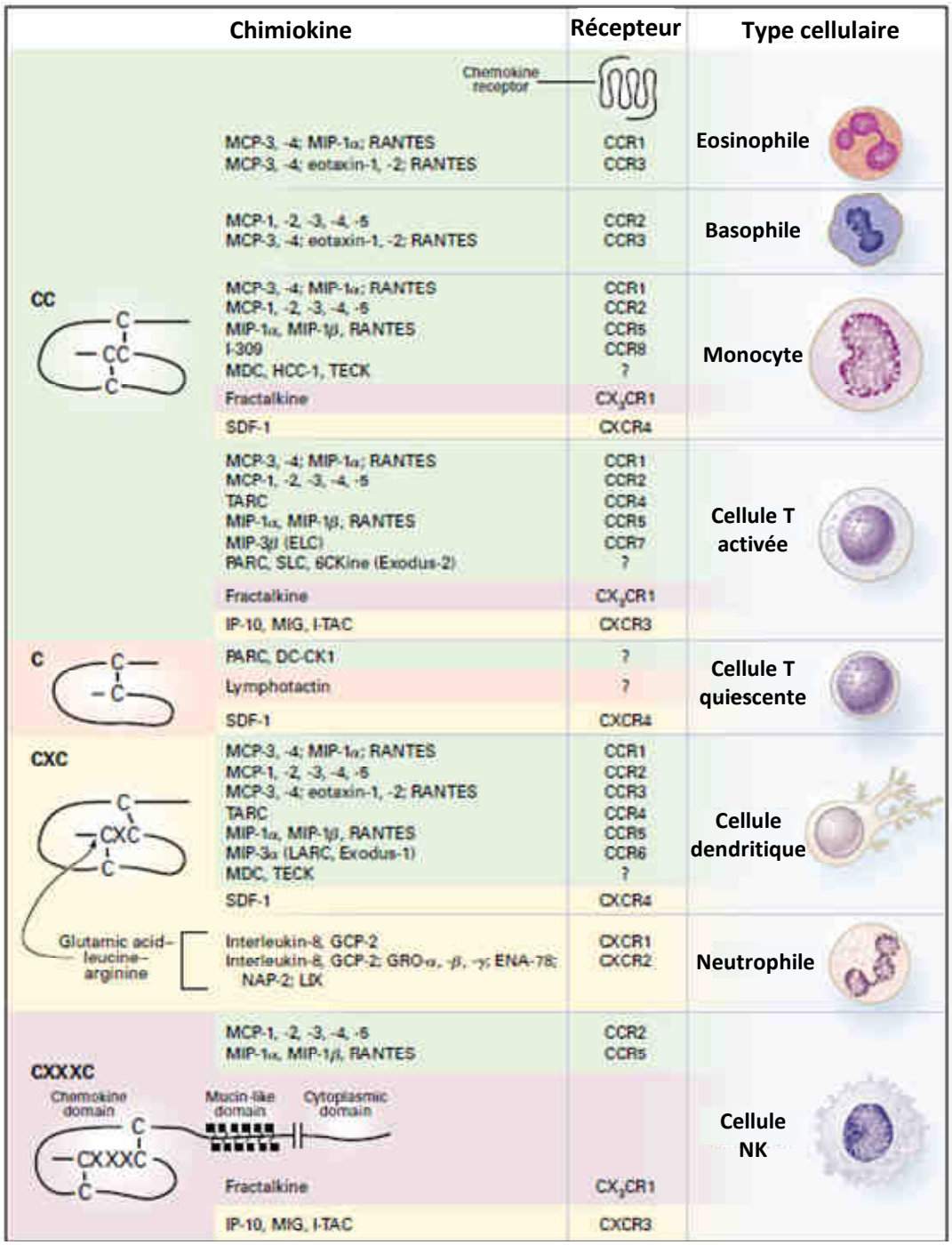


Figure 2-20. Les différentes classes de chimiokines et leurs récepteurs

(Luster, 1998)

Les chimiokines possèdent la capacité d'induire la migration cellulaire ou le chimiotactisme de nombreux types de cellules, y compris les neutrophiles, les monocytes, les lymphocytes, les éosinophiles, les fibroblastes et les kératinocytes. L'activité est régulée en se liant à des membres de la superfamille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires, couplés aux protéines G. Actuellement, 52 chimiokines et 20 récepteurs de chimiokine ont été décrits (Zlotnik & Yoshie, 2000) avec leur emplacement chromosomique et leurs propriétés

physiologiques. Bon nombre de récepteurs aux chimiokines peuvent lier plus d'un ligand, ce qui permet le chevauchement et la redondance de la fonction des chimiokines.

A l'origine, les chimiokines ont été décrites comme médiatrice de l'inflammation produites sur les sites d'infection ou de lésion en réponse à des stimuli pro-inflammatoires. Les chimiokines inflammatoires recrutent et activent les leucocytes afin d'organiser la réponse immunitaire et d'initier la cicatrisation. Bien que le chimiotactisme se présente comme la principale fonction des chimiokines, leur rôle physiologique est plus complexe. Ces fonctions vont du trafic des lymphocytes au cours de l'hématopoïèse, de l'échantillonnage de l'antigène dans les tissus lymphoïdes secondaires, de la surveillance immunitaire, au développement des organes (Zlotnik & Yoshie, 2000). En général, les chimiokines liées à l'homéostasie sont exprimées dans les tissus ou organes spécifiques, tandis que les chimiokines inflammatoires sont produites par de nombreux types cellulaires.

2.5.2.1.3 Inflammation et stress oxydant

2.5.2.1.3.1 Rôle particulier de l'Hème Oxygénase-1

L'Hème Oxygénase-1 (HO-1) est une enzyme impliquée dans le catabolisme de l'hème. La dégradation de l'hème permet la libération de quantités équimolaires de biliverdine, de fer et de monoxyde de carbone (Maines, 1997). La biliverdine réductase convertit par la suite la biliverdine en bilirubine. Parmi les deux isoformes de l'hème oxygénase, l'HO-1 est une enzyme hautement inductible par l'hème et par divers autres stimuli tels que le stress oxydant, tandis que l'HO-2 est l'isoforme exprimée de façon constitutive (Deshane, et al., 2005).

Les effets protecteurs résultant de l'activité HO-1 sont dus à son inductibilité par une variété de stimuli dont l'hème, l'oxyde nitrique (NO), le cadmium, les facteurs de croissance, l'hyperoxie et d'autres facteurs résultant de la libération de ses produits de réaction, qui exercent plusieurs effets biologiques, y compris des propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires et anti-apoptotiques (Deshane, et al., 2005) (**Fig 1-21**).

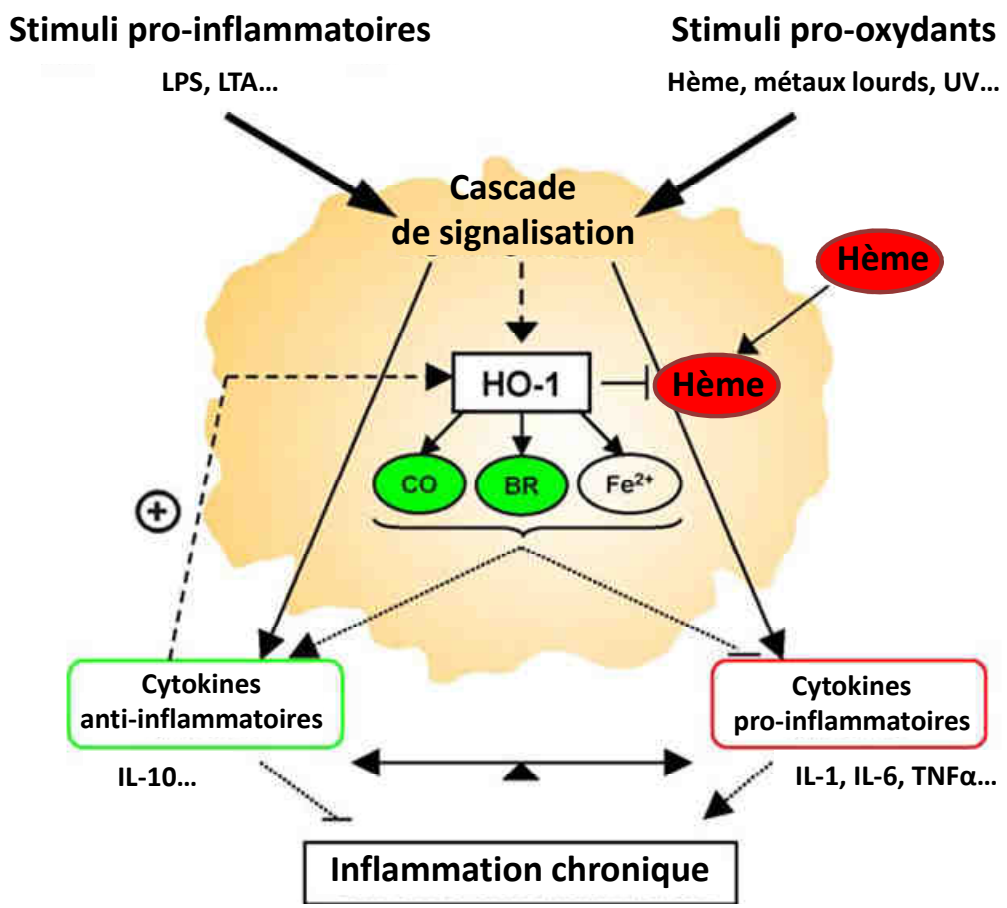


Figure 2-21. Rôle régulateur de l'Hème Oxygénase-1 dans la réponse inflammatoire macrophagique

(Paine, et al., 2010)

L'Hème Oxygénase-1 joue un rôle important dans la réponse inflammatoire (Kapturczak, et al., 2004). Elle est impliquée dans plusieurs états pathologiques, dont l'athérosclérose, l'hypertension, le rejet de greffe, les lésions rénales aiguës, les lésions pulmonaires et le cancer entre autres. (Jarmi & Agarwal, 2009; Raval & Lee, 2010; Ferrando, et al., 2011).

L'effet bénéfique de HO-1 sur l'inflammation est rapporté par Willis et al dans un modèle d'inflammation pleurale (Willis, et al., 1996). L'inhibition de l'HO-1 à l'aide de protoporphyrine d'étain augmente de façon significative l'infiltrat inflammatoire, tandis que l'induction préalable avec l'hémine entraîne une réduction significative de l'inflammation. Ceci suggère que l'activité de HO-1 module la réponse inflammatoire. Des résultats similaires ont été signalés dans d'autres modèles d'inflammation. L'importance de HO-1 dans l'inflammation est étayée par les résultats de souris knock-out pour l'HO-1 et des enfants déficients pour le gène de l'HO-1, présentant un phénotype pro-inflammatoire (Kapturczak, et al., 2004; Yachie, et al., 1999). En outre, plusieurs médiateurs pro-inflammatoires sont activés par carence en HO-1 et la surexpression de HO-1 (ou de ses sous-produits) est anti-

inflammatoire. De plus, l'effet anti-inflammatoire des médiateurs tels que l'IL-10 confère une protection par la surexpression de HO-1 dans un modèle murin de septicémie (Lee & Chau, 2002). Bien que l'induction préalable de HO-1 inhibe l'inflammation, des médiateurs pro-inflammatoires comme le TNF-α, l'IL-1, le lipopolysaccharide (LPS) et les lipides oxydés sont de puissants inducteurs de l'HO-1 dans les cellules endothéliales et les macrophages (Wagener, et al., 2003; Terry, et al., 1999).

2.5.2.1.3.2 ROS & Inflammation

La mitochondrie joue un rôle crucial dans la survie cellulaire, notamment par l'approvisionnement en ATP de la cellule, mais aussi en influençant l'apoptose, le cycle cellulaire et le métabolisme. Les mitochondries produisent de l'ATP par la respiration aérobie, l'oxydation du glucose, du pyruvate et du nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADH) conduisent à la génération d'espèces réactives de l'oxygène (« Reactive Oxygen Species », ROS). Dans des circonstances normales, les effets délétères causés par la nature hautement réactive des ROS sont contrebalancés par la présence d'antioxydants, y compris le glutathion, les caroténoïdes et les enzymes antioxydantes telles que la peroxydase catalase, le glutathion et l'HO-1. Toutefois, plusieurs maladies chroniques associées à l'inflammation (le diabète de type 2 par exemple) sont également caractérisées par la production excessive de ROS (Patti & Corvera, 2010).

Les réactions inflammatoires induisent la production de ROS et inversement la production de ROS peut également induire une réponse inflammatoire. En effet, il existe une véritable relation entre la production de ROS et l'activation des cytokines pro-inflammatoires (Nakahira, et al., 2011). Le fait que différentes cytokines soient soumises à des événements distincts de régulation suggère que la généralité de tout mécanisme donné est susceptible d'être limitée. La régulation temporelle distincte de l'IL-1ß (réponse rapide) et de TNF et d'IL-6 (réponse tardive) suggère également que l'expression des différentes cytokines est influencée de manière distincte par la production de ROS (Naik & Dixit, 2011). Par exemple, les« mitogen-activated protein kinases » (MAPK) sont seulement inhibées en présence de niveaux très élevés de ROS qui, vraisemblablement, s'accumulent à un stade ultérieur d'une réponse inflammatoire. La source cellulaire des ROS est également stimulus-dépendante. En effet, la signalisation inflammatoire en aval des TLRs dépend des ROS, tandis que les particules cristallines telles que l'amiante et la silice exigent à la fois de la NADPH oxydase et des ROS (Nakahira, et al., 2011; Dostert, et al., 2008). La source et la quantité de ROS produites semblent être spécifiques de chaque stimulus.

2.5.2.2 Les différentes étapes de IBMIR : Instant Blood Mediated Inflammatory Reaction

Il existe une véritable interaction entre l'inflammation et le système de la coagulation. Cette interaction est réciproque puisque l'inflammation conduit non seulement à l'activation de la coagulation, mais la coagulation affecte aussi considérablement la réponse inflammatoire. L'activation de la coagulation et le dépôt de fibrine subséquent à l'inflammation sont connus et peuvent être considérés comme une part essentielle de la défense de l'organisme contre, par exemple, des agents pathogènes ou des cellules non identiques. Le but ultime de cette activation est de contenir l'invasion et de limiter la réponse inflammatoire à une zone limitée. A l'inverse, la coagulation peut aussi sensiblement moduler l'activité inflammatoire. Les facteurs de coagulation (tels que la thrombine) ou les protéines anticoagulantes (comme la protéine C activée) peuvent activer des récepteurs cellulaires spécifiques sur les cellules mononucléaires ou les cellules endothéliales. Cette activation conduit, par exemple, à la production de cytokines ou l'apoptose des cellules inflammatoires (Levi, et al., 2004).

L'initiateur central de l'inflammation induite par la génération de thrombine est le facteur tissulaire (TF). Le blocage de l'activité du facteur tissulaire abroge complètement l'inflammation induite par activation de la coagulation dans un modèle d'endotoxémie expérimentale (Levi, et al., 2004). Le facteur tissulaire est une protéine transmembranaire de 45 kDa qui est constitutivement exprimée sur un grand nombre de cellules qui ne sont pas, pour la majorité, en contact direct avec le sang (Ruf & Edgington, 1994). Toutefois, TF est au contact du sang suite à la perturbation de l'intégrité des cellules vasculaires ou si les cellules présentes dans la circulation expriment TF. La source de facteur tissulaire peut être différente dans diverses situations inflammatoires. En effet, TF est exprimé par les cellules des îlots pancréatiques et il est considéré comme un facteur clé dans le déclenchement d'IBMIR (**Fig.1-22**). Son implication est étayée par le fait que le blocage de l'activité TF avec des anticorps monoclonaux ou iFVIIa peut abroger IBMIR *in vitro* (Moberg, et al., 2002).

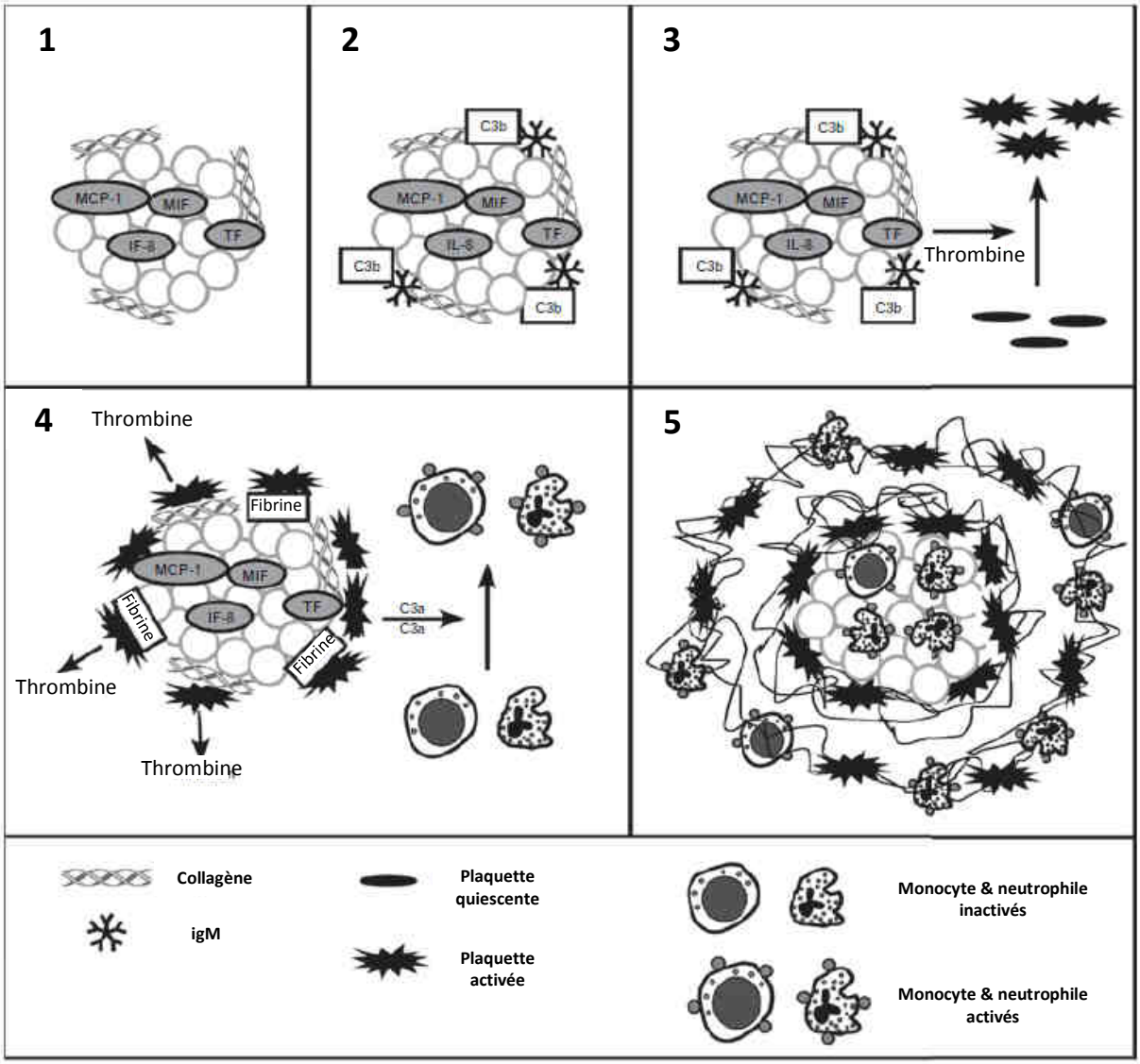


Figure 2-22.« Instant Blood Mediated Inflammatory Reaction » selon le modèle développé par Nilsson et al.(2011)

1-2 : Lorsque les îlots de Langerhans sont exposés au sang, des Immunoglobulines –G et –M se fixent à la surface des îlots et induisent l'activation du complément et le dépôt de fragments C3-fragments (C3b/iC3b). 3 : Le facteur tissulaire (« Tissue Factor » ; TF) libéré par les îlots induit l'activation du système de la coagulation. La thrombine générée active les plaquettes et initie la formation de fibrine. 4 : L'activation des plaquettes augmente l'affinité des intégrines (GPIIb-IIa et α2ß1) pour la fibrine et le collagène respectivement, et favorise la promotion de la liaison des plaquettes activées à la surface des îlots. En outre, l'activation plaquettaire induit une activation du complément et conduit à la génération des anaphylatoxines C3a et C5a, qui recrutent et activent les monocytes et les granulocytes au voisinage des îlots. 5 : L'activation des plaquettes induit la libération de thrombine générant de la fibrine qui finit par former une capsule autour des îlots piégés par les plaquettes, les granulocytes et les monocytes. Grâce à l'action de facteurs chimiotactiques, libérés directement par les îlots (par exemple l'IL-8, MIF, MCP-1) ou générés par l'activation du complément (C5a), les granulocytes et les monocytes infiltrent les îlots et conduisent à la destruction des îlots. (Nilsson, et al., 2011)

2.5.2.2.1 Activation de la coagulation

2.5.2.2.1.1 Le système de la coagulation

A l'origine, le concept de la cascade de coagulation est décrit comme une série de conversions enzymatiques (MacFarlane, 1964) (**Fig. 1-23**). L'activation progressive des précurseurs inactifs, ou zymogènes, est nécessaire pour la formation du produit final : la fibrine. Ce processus est décrit selon deux voies d'activation, la voie intrinsèque qui dépend de l'activation par contact avec une surface chargée négativement, et impliquant les facteurs de coagulation XII, XI, IX, VIII et V ; la voie extrinsèque qui dépend du facteur tissulaire exposé à la circulation, et implique le TF et le facteur VII. Ces voies convergent vers un processus commun pour activer le facteur X, et conduire à la conversion de la prothrombine (facteur II) en thrombine (facteur IIa) et aboutir à la conversion du fibrinogène en fibrine. Dans ce modèle en cascade, la contribution de l'hémostase primaire, avec le recrutement initial de plaquettes, a été considéré comme un mécanisme indépendant (Adams & Bird, 2009).

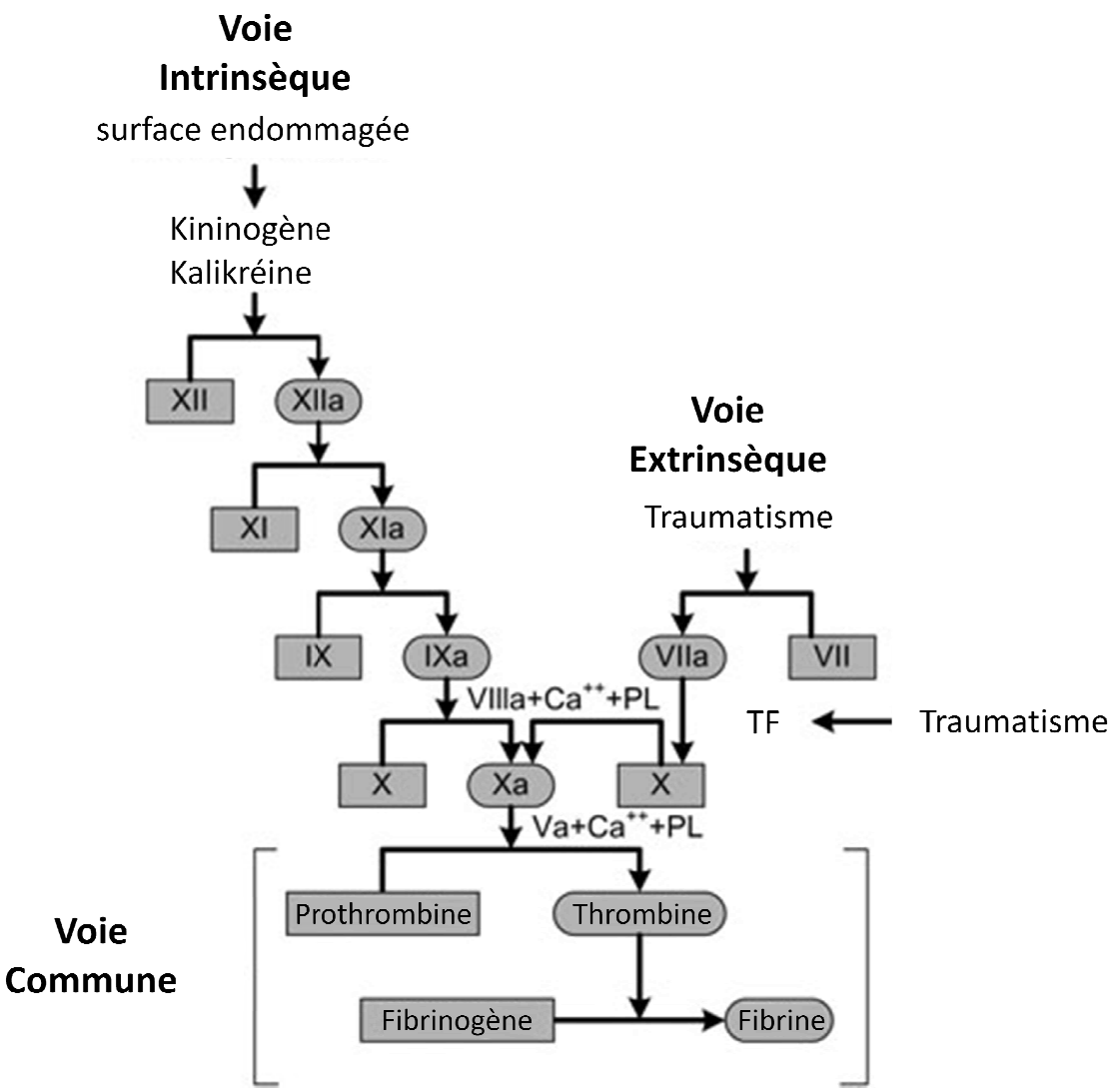


Figure 2-23. La cascade de la coagulation.

(Adams & Bird, 2009)

Le modèle de la coagulation *in vivo* actuellement accepté souligne le rôle central du TF comme principal instigateur de la coagulation. Il met en évidence également l'amplification rapide de la thrombine comme une étape essentielle dans le développement d'un caillot stable (Bungay, 2008) et met l'accent sur l'interdépendance des facteurs de coagulation et des éléments cellulaires. Il s'appuie sur le modèle classique de plusieurs façons : (i) l'activation des deux facteurs X et IX par le facteur tissulaire: le complexe du facteur VIIa (TF: FVIIa), reliant ainsi les voies extrinsèques et intrinsèques; (ii) une activation séquentielle, avec une phase d'initation, une phase d'amplification et une phase de propagation (Hoffman & Monroe, 2007) et (iii) la participation active et nécessaire des éléments cellulaires, à savoir, les plaquettes activées, dans les deux dernières phases, fournissant à la fois une surface

phospholipidique chargée négativement sur laquelle peut se produire des réactions à proximité immédiate de la zone de dommage (Furie & Furie, 2007)(**Fig. 1-24**).

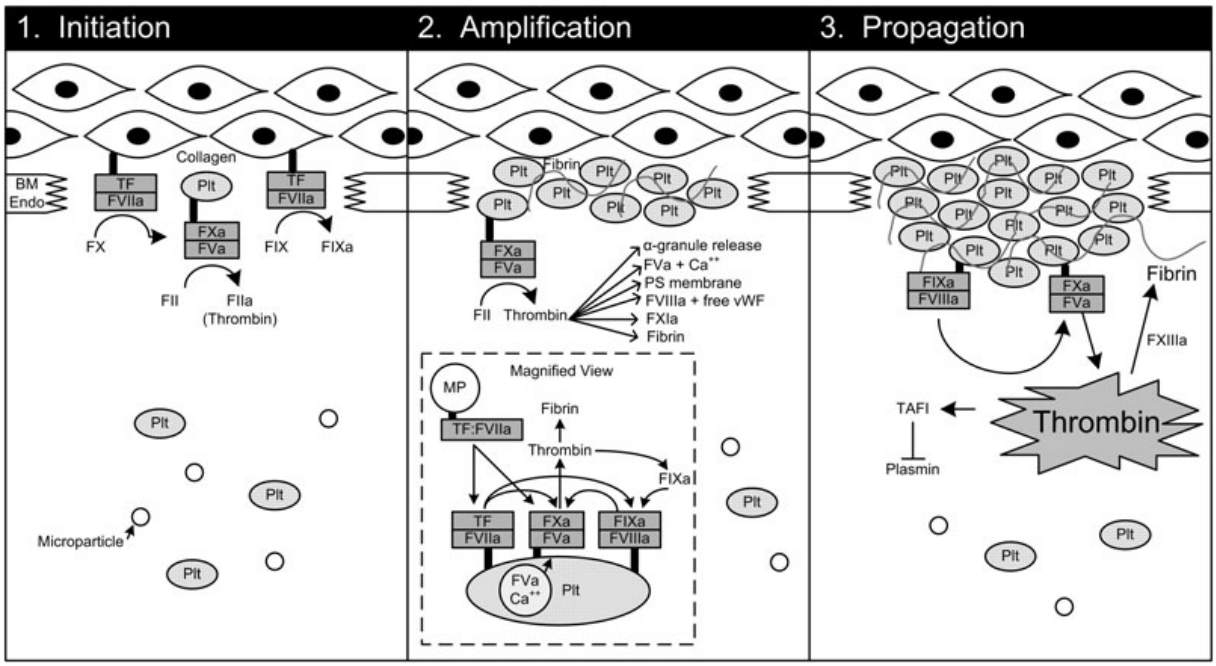


Figure 2-24. Les trois étapes de la coagulation.

(Adams & Bird, 2009)

2.5.2.2.1.2 IBMIR & coagulation

IBMIR est étudiée *in vitro* dans le modèle « tubing loops » (Bennet, et al., 2000). Ce modèle d'étude est un système composé de tubes héparinés mimant les vaisseaux sanguins. Les tubes sont remplis de sang et les îlots sont injectés à l'intérieur des tubes. Immédiatement après le contact entre le sang et les îlots, ces derniers sont pris au piège dans des caillots (**Fig. 1-.25**).

Figure 2-25. Le modèle « tubing loops »

(Moberg, 2005)

Ce modèle a permis de mettre en évidence le rôle dominant du système de la coagulation et des plaquettes dans ce phénomène. Lorsque le sérum seul ou le sérum avec des neutrophiles est utilisé dans ce système, IBMIR ne survient pas (Titus, et al., 2003). Ces données suggèrent donc que le sang total, y compris ses facteurs de coagulation, est un pré-requis pour la survenue de IBMIR dans la veine porte.

Dans le cas de la transplantation intraportale d'îlots pancréatiques, le collagène et d'autres molécules chargées négativement à la surface des îlots pourraient participer à l'activation de la coagulation (Bennet, et al., 2000). D'autre part, les cellules α et δ des îlots isolés expriment et sécrètent du TF (Moberg, et al., 2002). Le TF a également été détecté dans le tissu exocrine qui contamine les préparations d'îlots (Beuneu, et al., 2004). Les résultats cliniques de la transplantation d'îlots sont directement liés à la mesure d'expression de TF (Johansson, et al., 2005).

Toutefois, l'activation plaquettaire autour des îlots peut avoir un effet bénéfique sur la prise de greffe et la revascularisation par la production de plusieurs facteurs de croissance qui stimulent la néogenèse vasculaire, tel que le « vascular endothelial growth factor » (VEGF) (Brissova, et al., 2006).

2.5.2.2.2 Activation du système du complément

2.5.2.2.2.1 Le système du complément

Le système du complément est une composante centrale de l'immunité innée comprenant un réseau de plus de 30 protéines sériques et de surface cellulaire, dont les fonctions principales sont la reconnaissance et l'élimination des microorganismes (Walport, 2001), l'élimination des complexes immuns et des cellules apoptotiques (Manderson, et al., 2004) et la médiation de l'inflammation (Guo & Ward, 2005). Le complément est également impliqué dans la régulation des réponses immunitaires innée et adaptative (Caroll, 2004).

L'activation du complément peut se produire à travers trois voies principales d'amplification : la voie classique ; la voie alternative et la voie des lectines (**Fig. 1-26**). L'initiation de ces voies se fait par la liaison et l'activation de l'unité de reconnaissance de chaque voie avec des ligands spécifiques pour chaque voie (Walport, 2001)

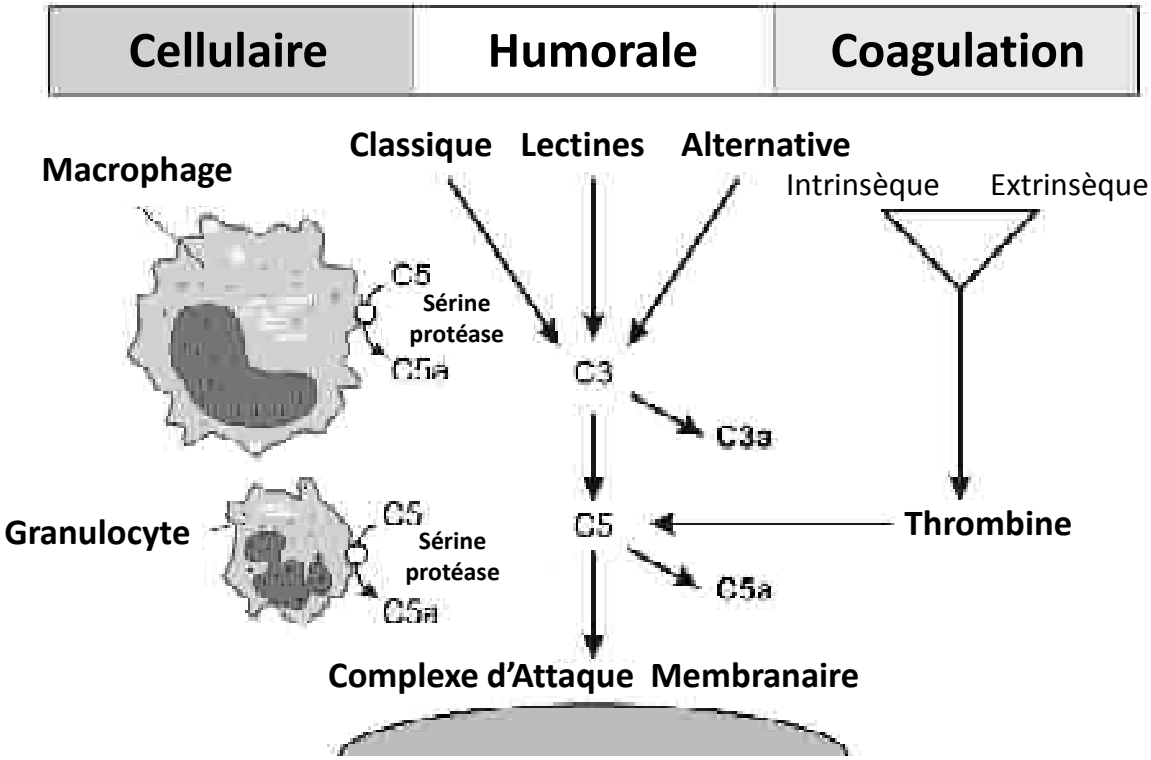


Figure 2-26. Schéma des voies d'activation du complément et de l'interaction entre les cellules et la cascade de coagulation avec le système du complément
(Ehrnthaller, et al., 2011)

- La voie classique

La voie classique est anticorps-dépendante et se produit lorsque les anticorps circulants se lient à des agents pathogènes spécifiques. En plus de l'activation induite par les anticorps, une activation anticorps-indépendante de la voie classique est possible (Ehrnthaller, et al., 2011). Il a été montré que des signaux de danger tels que la protéine C réactive, des protéines virales, les protéines β-amyloïdes, des polyanions (lipopolysaccharides bactériens, l'ADN et de l'ARN), des fragments mitochondriaux, des cellules nécrotiques / apoptotiques et amyloïdes P étaient capables d'induire la voie classique (Thurman & Holers, 2006).

- La voie alternative

L'activation de la voie alternative du complément est indépendante de la liaison des anticorps à des signaux de danger (Gasque, 2004; Ganter, et al., 2007). L'activation constante de la voie alternative est due à l'hydrolyse spontanée de C3 qui est fortement réactif. Un contrôle par les régulateurs du complément est donc nécessaire (Liszewski, et al., 1996). Les cellules saines

sont capables par différents mécanismes de contrôle d'empêcher l'activation spontanée du C3 et de protéger l'hôte d'une activation indésirable du complément.

- La voie des lectines

L'activation des lectines a été moins étudiée. L'activation s'effectue lorsque le mannose fixant les lectines (« Mannose Binding Lectin », MBL) se lie à des protéines de surface contenant du mannose à la surface des pathogènes. En plus de l'activation établie de la voie des lectines par MBL et les « MBL associated serine proteases » (MASPs), il a été démontré que les ficolines étaient également capables d'initier cette voie en formant des complexes actifs avec les MASPs. Les ficolines sont solubles comme les protéines de collagène qui se lient à des structures glucidiques présentes sur les microorganismes et les cellules qui meurent activent par conséquent le système immunitaire inné (Matsushita & Fujita, 2001). L'impact de la voie MBL doit être complètement élucidé. Il est suggéré que son rôle majeur a lieu pendant la petite enfance et en particulier pendant la période de transition de l'immunité passive fournie par les anticorps maternels jusqu'au développement de l'immunité propre (Walport, 2001).

- Autres voies d'activations

En plus des voies établies, de nouvelles voies d'activation du complément ont été récemment découvertes. En effet, de plus en plus d'interactions entre le système de la coagulation et la cascade du complément, ont été trouvées. La thrombine, les facteurs de coagulation Xa, XIa et la plasmine sont capables d'induire l'activation du complément (Huber-Lang, et al., 2006; Amara, et al., 2008). En outre, le facteur de coagulation XIIa active la voie classique du complément. L'interaction entre la voie des lectines et la cascade de la coagulation existe par l'intermédiaire du complexe entre le facteur de coagulation VIII et le facteur von Willebrand qui possède une activité lectine (Santizo, et al., 2009). Vice versa, les facteurs du complément peuvent aussi interagir avec le système de la coagulation.

L'activation du complément peut également exister par l'intermédiaire d'une interaction cellulaire directe. En effet, les cellules phagocytaires (macrophages, granulocytes) sont capables de cliver l'anaphylatoxine C5 en C5a. Ce clivage est effectué par une sérine protéase liée à la cellule qui est inductible chez les macrophages alvéolaires, mais constitutivement active chez les granulocytes (Huber-Lang, et al., 2002).

- Le complexe d’attaque membranaire

L'étape finale de toutes les voies d'activation est la formation du complexe d’attaque membranaire (CAM). Contrairement aux trois voies de signalisations différentes conduisant à la formation de la convertase C5, seul le clivage de C5 en anaphylatoxine C5a etC5b représente une étape enzymatique. Le reste de la cascade représente seulement une accumulation de protéines stables (Ehrnthaller, et al., 2011). La dernière étape est la formation d'un pore transmembranaire stable d'un diamètre de 10 angströms et la liaison de protéines de 10 à 15 protéines C9, qui génère une structure cylindrique (**Fig. 1-27**).

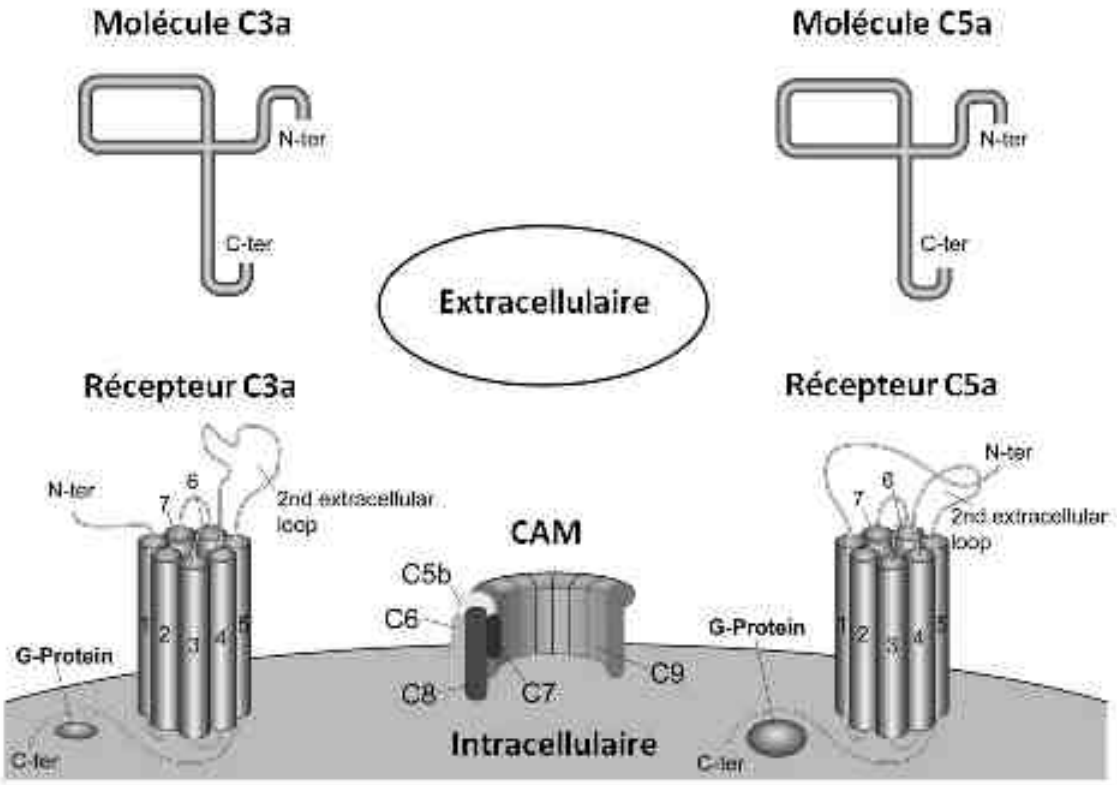


Figure 2-27. Schéma du complexe d’attaque membranaire

Le complexe d’attaque membranaire (CAM) avec ses subdivisions, et les deux récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines- G (C3aRetC5aR) (Ehrnthaller, et al., 2011).

L’assemblage des pores peut conduire à un déséquilibre osmotique du flux constant d'ions, de petites molécules et d’eau le long de leur gradient de concentration, produisant ainsi la lyse de la cellule cible (Dalmasso, et al., 1989). Il est à noter que l'importance de ces pores transmembranaires ne devrait pas être surestimée, puisque le blocage du CAM ne conduit qu'à une légère augmentation de l’infection bactérienne par Neisseria (Walport, 2001). Les effets en amont du système du complément, tels que la réaction anaphylactique et l'opsonisation, semblent jouer un rôle plus important (Gasque, 2004).

- Les effets du complément

Le complément est capable d'induire tous les signes classiques de l'inflammation, la douleur, le gonflement des tissus, la rougeur, l'hyperthermie et l'altération de la fonction.

Le principal effet du système du complément est l'induction de la modulation de la cascade enzymatique associée à un agent pathogène. Une fois activée, la cascade du complément se termine par la lyse de la cellule cible afin de protéger l'hôte de l'infection. De plus, le système du complément joue également des rôles supplémentaires et essentiels tels que l'opsonisation de l'agent pathogène.

Vraisemblablement, la fonction la plus importante est l'induction d'une réaction anaphylactique. Les produits d'activation C3a, C4a et en particulier C5a sont de puissants anaphylatoxines, capables d'induire la migration des phagocytes, la relaxation des muscles lisses, la dégranulation des mastocytes et des granulocytes basophiles et par conséquent induisent la libération de substances vaso-actives telles que l'histamine, les prostaglandines, les kinines et la sérotonine (Ehrnthaller, et al., 2011). Tous peuvent provoquer une vasodilatation et la fuite capillaire et induire la libération d'éicosanoïdes, de radicaux d'oxygène et d'enzymes lysosomales par les cellules qui ont migré, et causent des dommages aux pathogènes (Ehrnthaller, et al., 2011). Il est à noter que le complément agit bien au-delà de l' « inflammation », comme indiqué par son interaction étroite avec la cascade de la coagulation (Markiewski, et al., 2007), son implication dans la régulation de l'apoptose (Guo, et al., 2000) et la croissance cellulaire (Markiewski, et al., 2008).

La présence de niveaux significatifs d'immunoglobulines -G, -M, et des fractions du complément C4, C3, et C9 sur la surface des îlots suggère que l'activation du complément est médiée par les immunoglobulines. Elle se produit via la voie classique pour la formation de complexe d'attaque membranaire (Tjernberg, et al., 2008). L'activation est également provoquée par le processus de coagulation et peut être inhibée par des inhibiteurs de la thrombine (Ozmen, et al., 2002). Cette activation est provoquée par la libération de chondroïtine sulfate par les plaquettes activées (Hamad, et al., 2008).

D'autre part, les résultats cliniques de l'allotransplantation d'îlots sont inversement corrélés avec la présence d'anticorps préformés, tels que des anticorps dirigés contre un système d'histocompatibilité étranger (Mohanakumar, et al., 2006). En outre, les auto-anticorps chez les patients diabétiques de type 1 peuvent se lier aux cellules ß des îlots et fixer le complément (Radillo, et al., 1996). D'ailleurs, les patients présentant des quantités élevées d'auto-anticorps avant transplantation n'atteignent pas une normoglycémie post-

transplantation (Noguchi, et al., 2006). Par conséquent, le rôle des anticorps circulants dans ce processus inflammatoire ne peut être exclu. Les îlots du donneur et le receveur sont toujours compatibles pour le groupe sanguin ABO, mais la compatibilité pour le système d'histocompatibilité est difficile, en particulier quand les donneurs sont multiples. L'absence de tels anticorps pourrait permettre de minimiser la perte initiale des îlots dans les premières heures après transplantation.

2.5.2.2.3 Recrutement des cellules inflammatoires

2.5.2.2.3.1 Les cellules de l'inflammation

Le système immunitaire inné de l'homme est composé de diverses cellules du système immunitaire : les neutrophiles, les monocytes et les macrophages, les mastocytes, les cellules NK et les cellules dendritiques (**Fig. 1-32**). Différents médiateurs solubles sont sécrétés par ces cellules et le système du complément. Ainsi, ces cellules et les médiateurs ensemble forment un système de défense efficace.

Figure 2-28. Les principaux types de cellules inflammatoires.

(Barnes, 2004; Raulet & Vance, 2006; Banchereau & Palucka, 2005)

Par soucis de clarté, seuls les neutrophiles et les macrophages seront abordés dans cette partie. Le choix de la description de ces deux types cellulaires porte sur la participation active de ces cellules dans la réaction inflammatoire étudiée. Toutefois malgré leur prédominance, les granulocytes et les macrophages ne sont pas les seules cellules impliquées dans ce processus. En effet, les cellules NK, par leur abondance dans le foie des rongeurs et des humains, contribuent à l'inflammation précoce post-transplantation (Ishiyama, et al., 2011).

- ***Les neutrophiles***

Les neutrophiles sont la première ligne de défense immunitaire innée contre les maladies infectieuses. Cependant, depuis leur découverte par Elie Metchnikoff, ils ont toujours été considérés comme responsables de la destruction des tissus et donc à l'origine des dommages générés par l'inflammation survenant au cours d'infections aiguës. Toutefois, leur rôle faussé

dans la réponse immunitaire pour diverses infections ou troubles inflammatoires a révélé leur importance dans la régulation de la réponse immunitaire (Kumar & Sharma, 2010).

Les neutrophiles ont une durée de vie plus courte que les macrophages, et contrairement à ces derniers, les neutrophiles sont libérés dans le sang sous forme de cellules matures ou presque dépourvues de potentiel prolifératif. Une estimation de la production des neutrophiles dans la moelle osseuse fait état d'un taux d'environ 1×10^9 cellules par kilogramme de poids corporel par jour produits en temps normal (Mary, 1985). Les granules cytoplasmiques des neutrophiles sont produites séquentiellement au cours de la maturation dans la moelle osseuse, ce qui entraîne une population hétérogène de granules allant des granules azurophiles produites à l'étape de promyélocytes aux granules de gélatinase produites à l'étape métamyélocyte et l'étape non segmentée (« Band Cell »). Le taux de granules, la production et le temps alloué à la maturation, et donc à la charge des granules, peuvent être influencés par les cytokines et les facteurs de croissance en réponse à l'infection et inflammation (Chen, et al., 2011).

Les polynucléaires neutrophiles circulants peuvent être considérés comme des cellules qui ont temporairement arrêté leur développement, car ils ne sont pas attachés à une matrice et restent fonctionnellement quiescents afin de ne pas obstruer la microcirculation (Grommes & Soehnlein, 2011). Les neutrophiles sont activés quand ils sont « attrapés » par les cellules endothéliales activées au site d'inflammation et/ou d'infection. Leur activation se poursuit au cours de leur passage dans les tissus, où ils peuvent commencer un nouveau cycle de transcription de gènes codant pour des modulateurs de la réponse inflammatoire, tels qu'IL-8, MIP-1α (CCL3) GRO-ß (CXCL2), « Vascular Endothelial Growth Factor » VEGF et IL-1ß (Theilgaard-Mönch, et al., 2004).

La tension en oxygène dans les tissus enflammés est diminuée par l'œdème et la consommation d'oxygène due à l'activité de la NADPH oxydase des phagocytes qui s'accumulent. La NADPH oxydase transfère des électrons à partir de la NADPH intracellulaire à l'oxygène moléculaire pour produire des radicaux libres superoxyde. Ces derniers peuvent être produits dans les phagosomes ou à l'extérieur de la cellule et peuvent former spontanément du peroxyde d'hydrogène qui subit d'autres réactions pour générer d'autres dérivés réactifs de l'oxygène. L'hypoxie induit et stabilise des facteurs comme HIF-1α qui est essentiel dans les phagocytes (Imtiyaz & Simon, 2010). Le facteur de transcription NF-κB est un important activateur de HIF-1α et vice-versa. Dans les neutrophiles, l'activation de NF-κB entraîne la production d'oxyde nitrique par l'activation de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) et la synthèse et la libération de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-

8, TNF, IL-6 et IL-1ß (Li & al, 2002). Au site d'infection, l'activation de NF-κB peut être induite chez les neutrophiles par les Toll-Like récepteurs, les récepteurs du « Tumor Necrosis Factor » (TNF-R) et de l'Interleukine-1ß (IL-1R) (Verstrepen, et al., 2008).

- Les macrophages

Le système phagocytaire mononucléaire est produit dans la moelle osseuse à partir d'un progéniteur commun (Doulatov, et al., 2010). Les cellules majoritaires de cette lignée sont les macrophages et les cellules dendritiques, qui partagent de nombreux récepteurs de surface cellulaire communs, mais qui ont des activités fonctionnelles spécifiques. Contrairement aux neutrophiles, qui ont une courte durée de vie, celle des macrophages est très complexe. Elle varie de quelques heures à quelques années en fonction de la nature de la réponse immunitaire (Geissmann, et al., 2010). Les macrophages tissulaires différenciés à partir de monocytes circulants, se distinguent des cellules dendritiques par l'expression de F4/80, CD11b et du récepteur Fc. Les macrophages ont une activité protéolytique et catabolique, sont capables d'ingérer des pathogènes par phagocytose, d'éliminer les cellules mortes et les débris cellulaires, et de remodeler les tissus après lésions (Gordon & Taylor, 2005).
Les macrophages peuvent être regroupés en sous-populations selon leur emplacement anatomique et de leur phénotype fonctionnel (Galli, et al., 2011). Les macrophages résidents ou tissulaires comprennent les ostéoclastes (os), la microglie (cerveau), les macrophages alvéolaires (poumons), les histiocytes (tissu conjonctif interstitiel) et les cellules de Kupffer (foie) (**Fig. 1-29**).

Les différentes populations de macrophages **Phénotypes d'activation des macrophages**

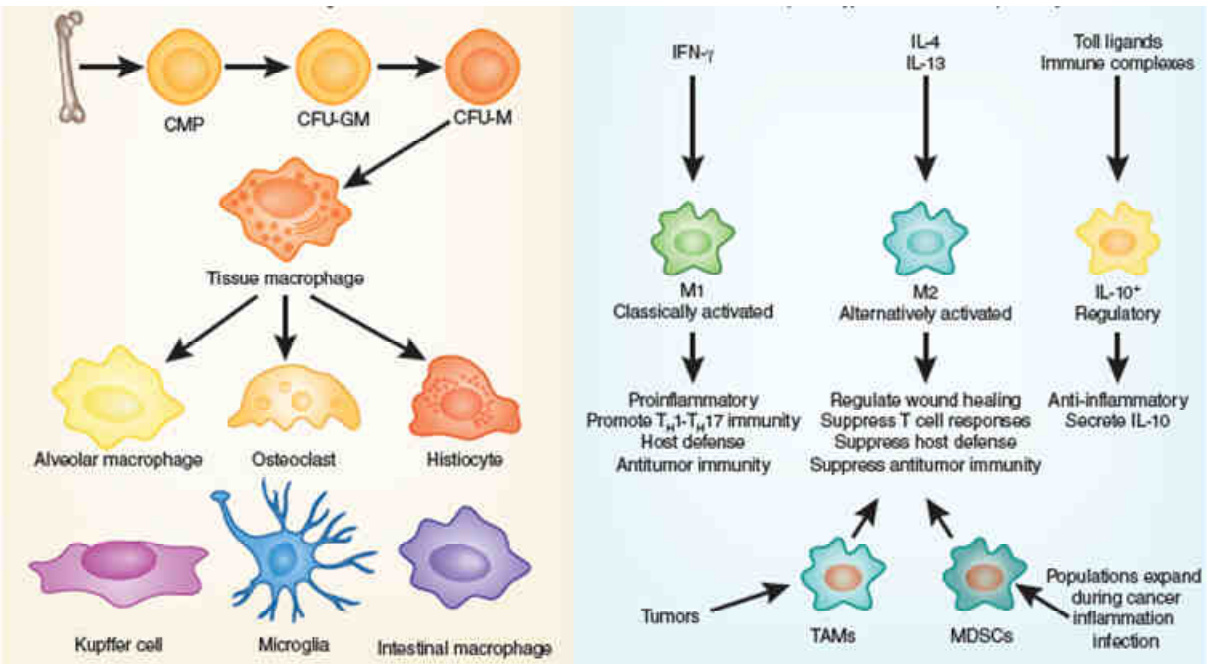


Figure 2-29. Les différentes populations de macrophages et leurs phénotypes fonctionnels (Galli, et al., 2011)

Il y a aussi beaucoup de sous-populations mononucléaires phagocytaires dans la circulation sanguine et dans la rate qui peuvent se différencier en macrophages (Gordon & Taylor, 2005). Bien que leurs phénotypes et leurs noms varient selon leur localisation anatomique, ils agissent tous comme des macrophages et acquièrent des capacités fonctionnelles similaires lorsqu'ils sont stimulés de façon appropriée (Krutzik, et al., 2005).

Etant donné que les marqueurs phénotypiques n'ont pas été particulièrement utiles pour distinguer les nombreuses sous-populations de macrophages, une approche plus utile a consisté à définir les macrophages selon leurs activités fonctionnelles propres. Ainsi, une classification des macrophages selon leurs phénotypes fonctionnels a été décrite. On y retrouve entre autres les cellules activées classiquement (macrophages M1, qui interviennent dans la défense de l'hôte et l'immunité anti-tumorale), les cellules activées alternativement (macrophages M2; qui sont des suppresseurs et régulent la cicatrisation des plaies), les macrophages régulateurs (qui sécrètent de l'Interleukine-10), les macrophages associés à des tumeurs (qui suppriment l'immunité de la tumeur) et le groupe des cellules myéloïdes suppressives (Myeloid-derived Suppressor cells ou MdSC; qui sont fonctionnellement similaires aux macrophages associés aux tumeurs) (Mosser & Edwards, 2008). Bien qu'il existe des différences parmi les différents types de macrophages M2 régulateurs, associés aux

tumeurs et MdSC, chacune de ces populations a une activité essentiellement immunosuppressive (Murray & Wynn, 2011). Par conséquent, les macrophages sont soit capable d'induire la défense de l'hôte, l'immunité anti-tumorale et les réponses inflammatoires ; soit de supprimer ces fonctions. Par conséquent, les macrophages peuvent avoir un rôle actif à la fois dans l'induction et la résolution des réponses immunitaires.

Les macrophages expriment une grande variété de récepteurs à reconnaissance de motifs y compris les TLRs, les récepteurs lectines de type C, les récepteurs hélicases RLRs et les récepteurs NLRs. Tous ces récepteurs reconnaissent des signaux de danger liés à des agents pathogènes, des substances étrangères (par exemple, la silice et l'amiante), et des cellules mortes ou mourantes (Gordon & Taylor, 2005). Ces récepteurs ont tous un rôle important dans l'activation de la réponse immunitaire innée. Ils sont le signal déclencheur de la phagocytose et de la destruction de particules étrangères et des bactéries par la génération d'un « Burst respiratoire », favorisant ainsi un phénotype M1-like. Ils activent également la signalisation par l'adaptateur MyD88 et régulent la formation de l'inflammasome (Mosser & Edwards, 2008) qui peut améliorer l'activité antimicrobienne des cellules M1 en stimulant la production de cytokines telles que le TNF et l'IL-1ß.

En plus de leur activité phagocytaire innée et leur rôle dans l'immunité antimicrobienne, les macrophages sont aussi intimement impliqués dans la réparation des tissus (Wynn, 2010). Les macrophages sont rapidement recrutés sur le site de la lésion après la dégranulation des plaquettes, ce qui peut refléter en partie la réponse des macrophages au facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) (Uutela, et al., 2004). Les macrophages sont également capables de sécréter une grande variété de cytokines et de chimiokines, de métalloprotéases matricielles et leurs inhibiteurs tissulaires, qui régulent le recrutement des cellules et les dépôts des composants de la matrice extracellulaire aux sites de la lésion (Wynn, 2004). Les macrophages avec le phénotype M2-like régulent des fonctions métaboliques importantes (Odegaard & Chawla, 2011). Ces macrophages sont induits par la signalisation via les récepteurs PPAR-δ et maintiennent la fonction des adipocytes, la sensibilité à l'insuline et la tolérance au glucose, ce qui empêche le développement de obésité induite par l'alimentation (Odegaard, et al., 2007; Lumeng, et al., 2007). Ainsi, l'obésité progresse, par le passage des macrophages associés au tissu adipeux d'un phénotype M2-like à un phénotype classique M1-like avec une puissante activité pro-inflammatoire (Odegaard & Chawla, 2011).

2.5.2.2.3.2 IBMIR et cellules inflammatoires

Durant la première heure suivant la transplantation d'îlots pancréatiques, l'utilisation de plaquettes, l'activation de la coagulation et du complément sont suivies par l'infiltration des îlots par les granulocytes neutrophiles $CD11b^+$ et les macrophages (Moberg, et al., 2005). L'infiltration est une véritable composante d'IBMIR qui est le résultat de multiples interactions entre la coagulation, le complément, et les cellules inflammatoires. En effet, les plaquettes activées surexpriment à leur surface la P-sélectine, qui est le récepteur primaire pour l'interaction avec les neutrophiles et des monocytes (Contreras, et al., 2004). La thrombine stimule les récepteurs activés par les protéases qui sont présents à la surface des granulocytes et les monocytes, et leurs voies de signalisation conduisant à la production accrue de cytokines renforcées (Coughlin, 2000). D'autre part, le TF, la fibrine et le fibrinogène ont aussi une action directe sur les macrophages (Szaba & Smiley, 2002). En outre, les cellules endothéliales portales activées produisent le facteur d'activation plaquettaire, qui est un facteur chimiotactique puissant des neutrophiles (Biancone, et al., 2006). De plus, les produits d'activation du complément, C3a et C5a, sont de puissants chimio-attractants pour les neutrophiles et les macrophages (Bennet, et al., 1999). Dans un modèle *in vitro*, l'anti-coagulation prévient l'infiltration cellulaire des îlots (Ozmen, et al., 2002).

Les procédures d'isolement exposent les îlots à un stress oxydant et mécanique, qui confère aux îlots un état pro-inflammatoire. Ils expriment une grande variété de médiateurs inflammatoires, y compris la chimiokine CCL2, l'IL-1ß, le TNF-α, IFN-δ, l'IL-6, et IL-8 (van der Windt, et al., 2007). La production de CCL-2 est en corrélation avec la survie du greffon clinique (Piemonti, et al., 2002).

Les cytokines inflammatoires entraînent l'apoptose des cellules de l'îlot, essentiellement par les voies de signalisation du TNF-α (Pileggi, et al., 2001) et la surexpression de Fas (Cattan, et al., 2001). Ces voies sont capables d'induire l'apoptose par l'intermédiaire de l'activation de gènes pro-apoptotiques régulés par NF-κB et l'activation des caspases (Cattan, et al., 2001 ; Contreras, et al., 2003). L'apoptose représente une partie substantielle de la perte initiale du greffon (Emamaullee & Shapiro, 2006).

Enfin, les neutrophiles et les macrophages sont des cellules présentatrices d'antigène. Par conséquent, le recrutement des cellules inflammatoires favorise l'induction ou l'augmentation de la réponse immunitaire adaptative.

2.5.2.3 Stratégies développées pour limiter IBMIR

Les stratégies thérapeutiques développées pour limiter IBMIR sont basées soit sur le pré-traitement des îlots avant transplantation, soit sur le traitement systémique du receveur.

2.5.2.3.1 Le prétraitement des îlots

L'expression accrue du TF dans les îlots en culture par rapport à des îlots fraîchement isolés, souligne l'avantage que procurent les conditions de culture sur les niveaux de TF (Takahashi, et al., 2009). Afin de réduire leur phénotype inflammatoire, des îlots humains ont été cultivés en présence de nicotinamide qui a un effet favorable sur l'expression intracellulaire TF et CCL-2 (Moberg, et al., 2003).

L'α1-antitrypsine est un anti-inflammatoire naturel, un inhibiteur de protéase majeure qui inhibe l'activité enzymatique de l'élastase des neutrophiles et de la thrombine. *In vitro*, la présence d'α1-antitrypsine protège les îlots de souris contre les effets des cytokines, IL-1ß et l'IFN-δ, en conférant aux îlots une protection contre l'apoptose, une réduction de 40% de la production d'oxyde nitrique, et une diminution de la production de TNF-α (Lewis, et al., 2005). De plus, l'administration α1-antitrypsine améliore la survie des îlots, et induit la tolérance immunitaire du greffon chez la souris (Lewis, et al., 2008; Zhang, et al., 2007).

L'ajout de molécules anti-oxydantes dans le milieu de culture permet de limiter la production des radicaux oxygénés et réduit le statut inflammatoire des îlots (Bottino, et al., 2004; Marzorati, et al., 2006). La transplantation d'îlots préalablement traités avec des antioxydants chez la souris, permet de restaurer la normoglycémie avec une masse réduite d'îlots (Bottino, et al., 2002). Les effets bénéfiques de l'hème oxygénase-1 peuvent être obtenus en traitant les îlots avec des protoporphyrines ou du monoxyde de carbone. L'induction de l'hème oxygénase-1 permet de prolonger la survie du greffon (> 100 jours) lorsque les îlots sont transplantés dans la capsule rénale de souris (Wang, et al., 2005; Pileggi, et al., 2001). L'hème oxygénase-1 réduit la production de cytokines et l'infiltration des macrophages durant la période péri-transplantatoire (Wang, et al., 2006).

D'autres stratégies ciblant l'amélioration de la compatibilité sang-îlots visent à recouvrir les îlots avec des macromolécules. La conjugaison de complexes macromoléculaires d'héparine à la surface cellulaire est une de ces stratégies. Le procédé est basé sur de la double affinité de l'avidine à la fois pour la biotine et l'héparine (Cabric, et al., 2008). La couche d'héparine offre une véritable protection contre IBMIR, à la fois *in vitro* et dans un modèle porcin

allogénique de transplantation d'îlots (Cabric, et al., 2007). Le revêtement peut également être utilisé pour lier des facteurs de croissance ayant une forte affinité pour l'héparine avant la transplantation dans le but d'améliorer l'angiogenèse et l'implantation du greffon (Cabric, et al., 2010).

Une autre méthode avancée pour l'ingénierie de surface des îlots a été mise au point, à savoir le recouvrement des îlots avec du polyéthylène glycol (PEG) (Xie, et al., 2005). Cette technique permet d'améliorer la survie du greffon immédiatement après la transplantation intraportale chez des souris avec un diabète induit par streptozotocine (Teramura & Iwata, 2009). La survie du greffon est significativement prolongée dans le foie des souris diabétiques. Cette technique est également utilisée pour conjuguer des protéines et des cellules à la surface des îlots. Par exemple, l'urokinase, la thrombomoduline, et le récepteur 1 soluble du complément (« soluble complement receptor 1 » ; SCR1) ont été liés à la surface des îlots en utilisant soit le greffage de maléimide /-SH soit l'hybridation de l'ADN (Teramura & Iwata, 2011; Luan, et al., 2011; Chen, et al., 2011; Teramura, et al., 2010). Le PEG a également été conjugué avec sCR1 suivie par l'héparine, qui a une affinité pour sCR1. Le traitement de surface sCR1/heparine a été répété pour générer une multicouche (Luan, et al., 2011). Néanmoins, bien que cette approche soit très intéressante, il est difficile de prévoir comment le polyéthylène glycol peut protéger les îlots des molécules proinflammatoires telles que des cytokines et des radicaux d'oxygène.

2.5.2.3.2 Le traitement du receveur

En pratique courante, les îlots sont transplantés avec un milieu hépariné pour empêcher la coagulation. Dans des études *in vitro,* la substitution *in vitro* de l'héparine par du sulfate de dextran de bas poids moléculaire bloque IBMIR (Johansson, et al., 2006). La substitution de l'héparine par du pentosan a également démontré un bénéfice en défavorisant le recrutement des macrophages *in vitro* par piégage des chimiokines secrétées par les îlots (Sigrist, et al., 2004). Des études *in vivo* ont montré que le sulfate de dextran de bas poids moléculaire est bien toléré par les humains et induit l'augmentation de la sécrétion d' « hepatocyte growth factor » qui est protecteur pour l'îlot (Schmidt, et al., 2008).

Un autre anticoagulant, le N-acystelyne, un dérivé de la N-acétylcystéine, empêche la coagulation induite par l'îlot *in vitro* (Beuneu, et al., 2007). De plus, il possède des propriétés anti-inflammatoires et anti-oxydantes qui peuvent être utiles pour l'inhibition d'IBMIR.

Une autre cible stratégique est le TF. La fonction du TF est inhibée par des anticorps monoclonaux et le facteur VIIa inactivé (Moberg, et al., 2002) par des petits inhibiteurs

moléculaires du site actif (Johansson, et al., 2005), et des siRNA (Ji, et al., 2011). Le résultat est une atténuation d'IBMIR *in vitro*. D'autres études ont montré qu'un anticorps monoclonal anti-TF (CNTO859) diminue les marqueurs de la coagulation après transplantation et prolonge la fonction du greffon chez un modèle primate (Berman, et al., 2007). Malheureusement, la quantité d'anticorps n'était pas suffisante pour supprimer totalement la génération d'IBMIR lors de la transplantation comme l'indique les niveaux élevés de TAT (Berman, et al., 2007).

En plus de l'inhibition directe de TF, l'inhibition du système de la coagulation avec le mélagatran (inhibiteur de la thrombine) (Ozmen, et al., 2002) inhibe IBMIR *in vitro*. La protéine C activée (« Activated protein C », APC) est une enzyme anticoagulante qui a également des propriétés anti-inflammatoires et anti-apoptotiques. L'administration d'APC réduit la perte des îlots après transplantation intraportale chez des souris diabétiques. Elle induit aussi une réduction significative de la libération de cytokines pro-inflammatoires après exposition des cellules hépatiques endothéliales à des îlots (Contreras, et al., 2004). D'autres études ont démontré qu'un inhibiteur plaquettaire (anti-GPIIb / IIIa) peut agir en synergie avec APC pour inhiber IBMIR dans un modèle *in vitro* (Akima, et al., 2009).

La thrombomoduline joue un rôle important dans la limitation de la coagulation et des événements inflammatoires à travers une variété d'effets, y compris comme un cofacteur de la thrombine pour cliver la protéine C de APC. Sa reconstitution sous forme liposomale a permis d'améliorer la prise de greffe d'îlots syngéniques en atténuant ou en abrogeant IBMIR. L'administration de thrombomoduline améliore significativement la prise de greffe allogénique et syngénique après la transplantation intraportale d'îlots chez des souris diabétiques. Le dépôt de fibrine, l'infiltration de neutrophiles, l'expression des ARNm du TNFα et de l'IL-ß, et de l'activité de NF-κB ont tous été significativement réduits dans le foie des receveurs d'îlots de Langerhans qui avaient été traités avec la thrombomoduline liposomale (Cui, et al., 2010; Cui, et al., 2009).

3 OBJECTIFS

Comme évoqué précédemment, IBMIR est une réaction thrombotique / inflammatoire à l'origine de la faible implantation des îlots transplantés. Actuellement, l'aspect thrombotique de cette réaction est le plus investigué au détriment de l'aspect inflammatoire.
En effet, le principal modèle d'étude *in vitro* d'IBMIR est le « tubing loops model ». Bien que ce modèle d'étude soit largement reconnu comme mimant avec précision IBMIR, il fait l'impasse sur de nombreuses composantes d'IBMIR. En effet, l'endothélium vasculaire et l'environnement hépatique sont totalement exclus de ce système. De plus, ce modèle allogénique devrait être syngénique afin de s'affranchir des réactions de rejet. De toute évidence, il paraît impossible de conclure sur l'impact d'IBMIR sans la mise en place d'un modèle *in vivo* faisant la démonstration d'une perte importante du greffon.

D'autre part, le greffon est soumis à un stress considérable au cours des procédures de prélèvement et de transport auxquelles s'ajoutent les procédures d'isolement et la culture des îlots qui génèrent une hypoxie. Toutefois, l'impact de ces procédures préimplantatoires sur les processus inflammatoires précoces après transplantation doit être précisé.

Ainsi, l'objectif général de ce travail de thèse est d'identifier précisément les mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine de la perte précoce des îlots et de déterminer des cibles thérapeutiques pour limiter ces réactions inflammatoires. Les objectifs spécifiques sont : 1) tout d'abord de comprendre le rôle de l'îlot pancréatique dans ce processus inflammatoire *in vitro* 2) de préciser ces réactions inflammatoires dans un modèle animal de transplantation *in situ* par l'étude de marqueurs tissulaires et systémiques; 3) de développer des outils thérapeutiques pour prévenir ces réactions inflammatoires.
Une meilleure compréhension d'IBMIR permettra de développer de nouveaux traitements pour prévenir et/ou limiter cette réaction inflammatoire, en vue d'améliorer la transplantation d'îlots pancréatiques.

4 MATERIELS ET METHODES

4.1 Modèles d'étude

4.1.1 La lignée cellulaire RINm5F

La lignée cellulaire RINm5F (**Fig. 3-1**) (LGC promochem, Molsheim, France) est un clone obtenu à partir de cellules d'insulinome de rat. Les cellules sont cultivées en présence de milieu RPMI-1640 supplémenté avec 10 % de Sérum de Veau Fœtal (SVF ; Lonza, Verviers, Belgique) et 1% de solution d'antibiotique/antimycotique (AB/AM ; Gibco®, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Les cellules ont été utilisées pour réaliser une gamme de concentration afin de déterminer la concentration de protoporphyrine à utiliser

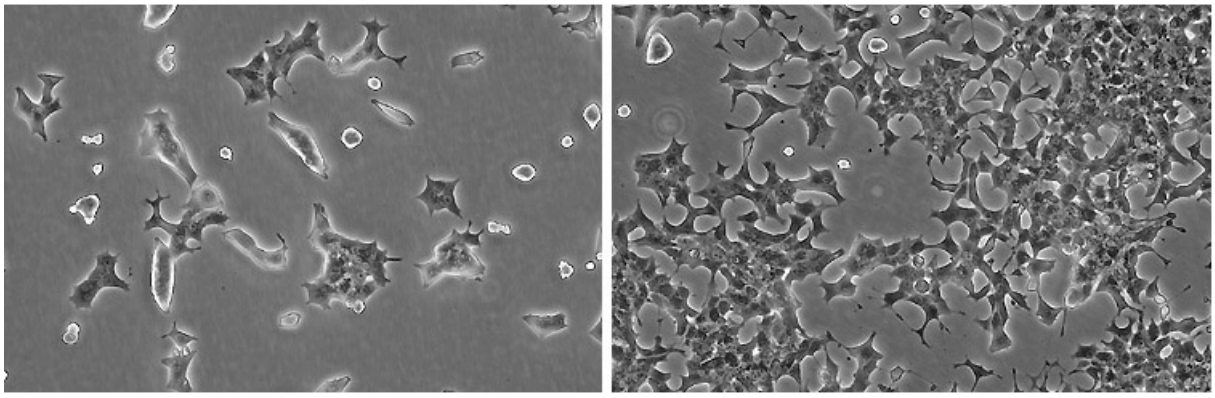


Figure 4-1. Photographie en microscopie en contraste de phase de la lignée cellulaire RINm5F (x 400).

4.1.2 Les macrophages péritonéaux

Les macrophages sont activés et isolés chez des rats Wistar mâles d'environ 300 g (Elevage Depré, St Doulchar, France). Pour cela, une péritonite chimique est induite par injection intra-péritonéale de 10 ml d'une solution de thioglycolate (Sigma-Aldrich) à 3%. Le prélèvement est réalisé 72 heures après l'injection. L'animal est anesthésié par l'injection intrapéritonéale d'un mélange Kétamine (Imalgène®, Merial, Lyon, France) / Xylazine 2% (Rompun®, Bayer, Puteaux, France) à raison de 100 µl/100 g de poids corporel puis décapité pour une exsanguination totale. Les cellules péritonéales sont ensuite prélevées, après laparotomie, par des lavages péritonéaux successifs avec 50 ml de « Phosphate Buffered Saline » (PBS ; Sigma-Aldrich) contenant 1% d'AB/AM.

Après recueil des cellules péritonéales, ces dernières sont centrifugées 5 minutes à 400 x g et reprises dans le volume requis de milieu M199 supplémenté (Sigma-Aldrich) avec 10% de SVF et 1% d'AB/AM. Puis, après 4H d'adhésion, les cellules non adhérentes sont éliminées

par remplacement du milieu de culture. Ainsi la majorité (90%) des cellules adhérentes résiduelles sont des macrophages (Zhang, et al., 2008).

4.1.3 Les îlots pancréatiques de Rat

Les rats utilisés ont un poids corporel variant entre 200 et 250 g. Pour les études *in vitro*, les rats utilisés pour les isolements d'îlots pancréatiques sont des rats Wistar. Pour les études *in vivo* les îlots pancréatiques sont isolés à partir de rats Lewis syngéniques (Elevage Janvier, Le Genest Saint Isle, France).

Les rats sont anesthésiés par l'injection intrapéritonéale d'un mélange Kétamine / Xylazine 2% à raison de 100 µl/100 g de poids corporel. Après laparotomie, le pancréas est dégagé, le canal cholédoque est ligaturé à l'embouchure duodénale et cathétérisé à l'embouchure hépatique. Dix ml de collagénase de Clostridium histolyticum (type XI, Sigma-Aldrich) sont injectés dans le pancréas et l'animal est sacrifié par exsanguination pour le prélèvement de l'organe (**Fig. 3-2**). Les pancréas (soit 2 par tube) sont conservés à 4°C dans 7,5 ml de solution de perfusion (0,035% de bicarbonate de sodium (Sigma-Aldrich), 2,35 $mmol.l^{-1}$ de chlorure de calcium (Sigma-Aldrich), 0,025 $mmol.l^{-1}$ d'HEPES (Fisher, Illkirch, France) dilués dans de l'HBSS).

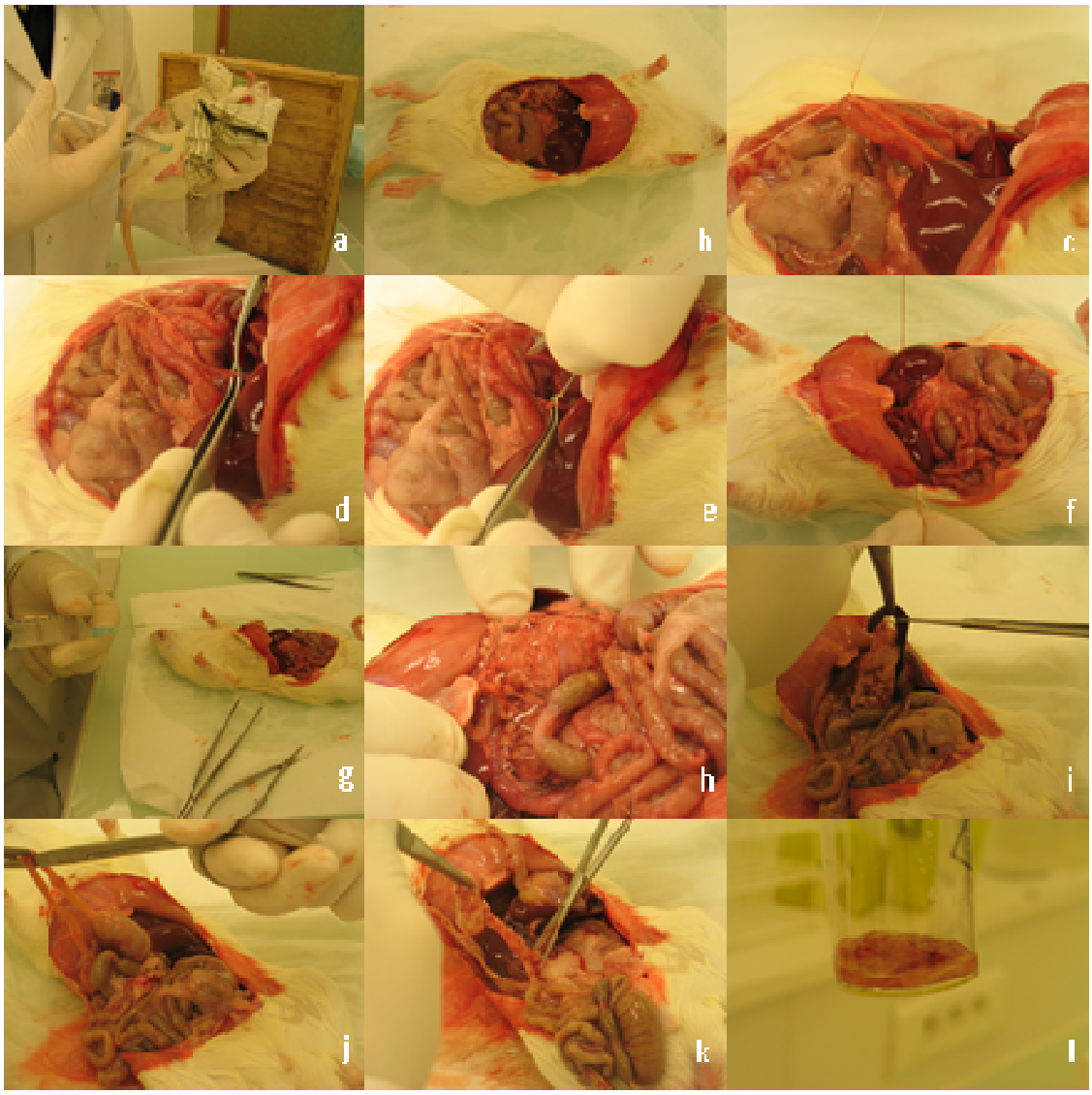


Figure 4-2. Prélèvement d'un pancréas de Rat.

a- Anesthésie du rat, b- Laparotomie, c- Ligature du canal cholédoque à l'embouchure duodénale, d- Incision du canal cholédoque, e- Insertion du cathéter dans le canal cholédoque, f- Fixation du cathéter dans le canal cholédoque à l'embouchure hépatique, g- Injection de la collagénase, h- Pancréas dilaté, i- Libération du pancréas au niveau de la rate, j- Libération du pancréas au niveau du duodénum, k- Libération du pancréas au niveau de l'intestin, l- Pancréas prélevé (Clichés du laboratoire).

Les pancréas sont ensuite digérés sous agitation à 37°C au bain marie pendant 10 minutes. La digestion est stoppée avec 40 ml de milieu de rinçage à 4°C (milieu M199 supplémenté avec 10% de SVF décomplémenté et 1% AB/AM). Le digestat obtenu est filtré à travers un tamis (porosité de 500 µm, Sigma-Aldrich), rincé avec le milieu de rinçage puis transféré dans des tubes de 200 ml (Dutscher, Brumath, France). Le filtrat est centrifugé à 4°C pendant 1 minute à 300 x g. Les culots sont suspendus dans du milieu de rinçage, transférés dans un tube à centrifuger de 50 ml et centrifugés à 4°C pendant 1 minute à 300 x g.

Le surnageant est éliminé et les îlots sont séparés du tissu exocrine à l'aide d'un gradient discontinu de ficoll (Ficoll®PM 400, Dutscher), préparé au laboratoire et constitué de 3 densités (1,110 - 1,096 - 1,069) auxquelles se superpose 5 ml de PBS. Ce gradient est centrifugé pendant 4 minutes à 30 x g sans accélération ni frein et 12 minutes à 800 x g. Le gradient est alors constitué de 4 phases : la majorité des îlots se concentre dans les phases 1 et 2, la 3ème phase a une pureté en îlots estimée à 20%, la 4ème phase et le culot contiennent essentiellement du tissu exocrine. Enfin, les phases 1 et 2 sont lavées 3 fois avec du milieu de rinçage par centrifugation (1 minute à 300 x g) afin d'éliminer le ficoll. Les îlots sont ensuite mis en culture dans la quantité nécessaire de milieu M199 supplémenté avec 10% de SVF et 5% d'AB/AM.

4.1.4 Les traitements chimiques et pharmacologiques

Afin de comprendre et d'analyser les mécanismes cellulaires intervenant dans le développement du processus inflammatoire étudié, diverses molécules agissant sur les voies impliquées ou potentiellement impliquées ont été utilisées.

4.1.4.1 Inhibiteur de la voie PI3K/Akt

La rapamycine ou Sirolimus ($C_{51}H_{79}NO_{13}$) est un lactone macrocyclique lipophilique. Son principe actif est isolé à partir du mycélium d'une souche de Streptomyces hygroscopicus (**Fig. 3-3**)

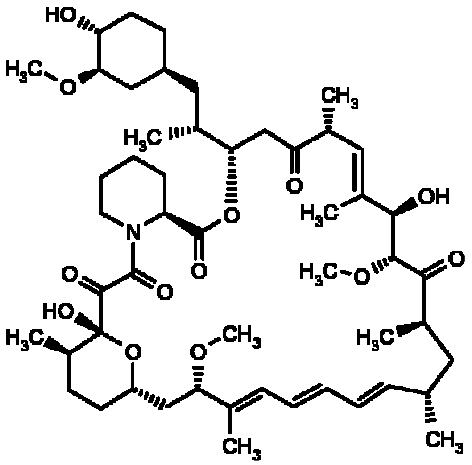


Figure 4-3. Formule structurale de la molécule de la rapamycine (Sirolimus).
Source : http : http://www.pfizer.com

Elle inhibe la voie de signalisation mitogénique « Phosphatidylinositol 3-kinases /Akt » (PI3K/Akt), commune à une grande variété de types cellulaires, en interagissant avec la protéine mTOR. Elle agit sous forme complexée avec une immunophiline : FK binding protein-12 (FKBP12). Le complexe Rapamycine-FKBP12 se fixe directement sur sa cible

moléculaire, mTOR, et bloque ses fonctions. En rendant mTOR non fonctionnel, la rapamycine induit l'inhibition de la voie de transduction médiée par mTOR, conduisant entre autres à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 dans de nombreux types cellulaires. Bien que la rapamycine ne cible qu'un seul acteur cellulaire, mTOR, son spectre d'action est large. Tous les traitements effectués avec de la Rapamycine sont réalisés à partir d'une solution buvable de rapamycine à 1 mg/ml (Rapamune®, Weyth Pharmaceutical, Blois, France). Les dilutions sont réalisées directement dans le milieu de culture.

4.1.4.2 Activateur de HO-1

La protoporphyrine IX de cobalt ($C_{34}H_{32}CoN_4O_4Cl$; CoPP ; Sigma-Aldrich) est une métalloporphyrine (**Fig. 3-4**) qui agit comme activateur de l'HO-1. La molécule est dissoute dans du NaOH 0,1 mol.l^{-1}, et diluée au ½ dans du PBS sans Ca^{2+}ni Mg^{2+}. Le pH de la solution finale est ajusté à 7,4 et la solution est stérilisée par filtration. Les dilutions (100 µmol.l^{-1}) sont réalisées directement dans le milieu de culture.

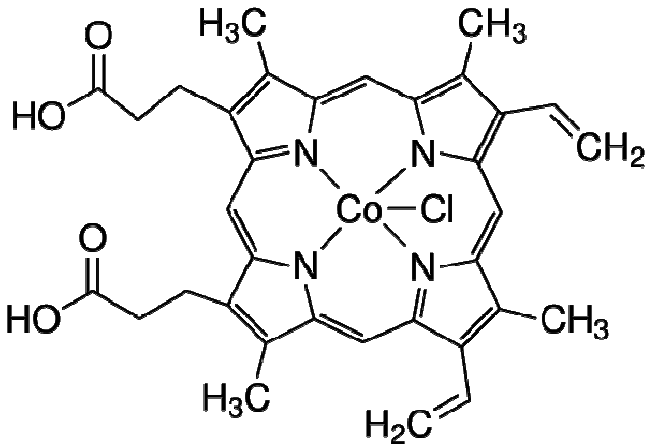


Figure 4-4. Formule structurale de la protoporphyrine IX de cobalt.

Source : http://www.sigmaaldrich.com

4.1.4.3 Inhibiteurs de la voie TLRs

- Inhibiteur de TLR-4

CLI-095 ($C_{15}H_{17}ClFNO_4S$; InvivoGen, Toulouse, France), aussi connu sous le nom TAK-242, est un dérivé du cyclohexène qui supprime spécifiquement la signalisation cellulaire TLR4 dépendante et inhibe la production de monoxyde d'azote et de cytokines pro-inflammatoires (Ii, et al., 2006) (**Fig.3-5**). Il agit en bloquant les voies de signalisation par le domaine intracellulaire de TLR4, mais pas le domaine extracellulaire. Il supprime donc potentiellement l'activation de TLR4 ligand-dépendante et indépendante (Kawamoto & al, 2008).

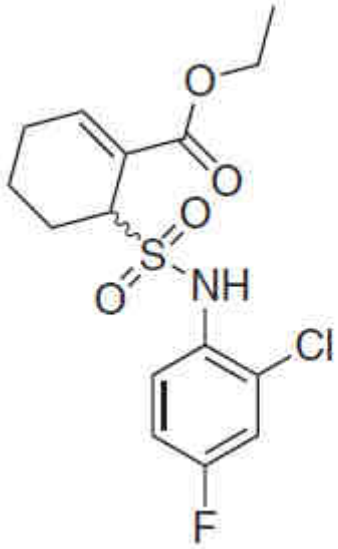


Figure 4-5. Formule structurale de CLI-095.

Source : http://www.invivogen.com/

CLI-095 est dilué (1 mg/ml) dans du « diméthylsulfoxyde » (DMSO, Sigma-Aldrich) et les cellules sont traitées avec 1 µmole.l^{-1} de CLI-095 dilué dans le milieu de culture (Guerra, et al., 2011).

- Inhibiteur TLR-2 et TLR-4

OxPAPC est généré par l'oxydation de la 1-palmitoyl-2-arachidonyl-sn-glycéro-3-phosphorylcholine (PAPC), qui aboutit à un mélange de phospholipides oxydés contenant soit la longueur complète ou fragmentée oxygénée sn-2 des résidus (**Fig. 3-6**). OxPAPC inhibe la signalisation induite par lipopeptide bactérienne et le LPS. Il agit en bloquant ainsi la signalisation de TLR2 et TLR4 par compétition avec CD14, LBP et MD2, les protéines accessoires qui interagissent avec les lipides bactériens (von Schlieffen, et al., 2009; Erridge,

et al., 2008). OxPAPc est dilué dans le milieu de culture (1mg/ml) et les cellules sont traitées avec 30 µg/ml d'OxPAPc dilué dans le milieu de culture (Guerra, et al., 2011).

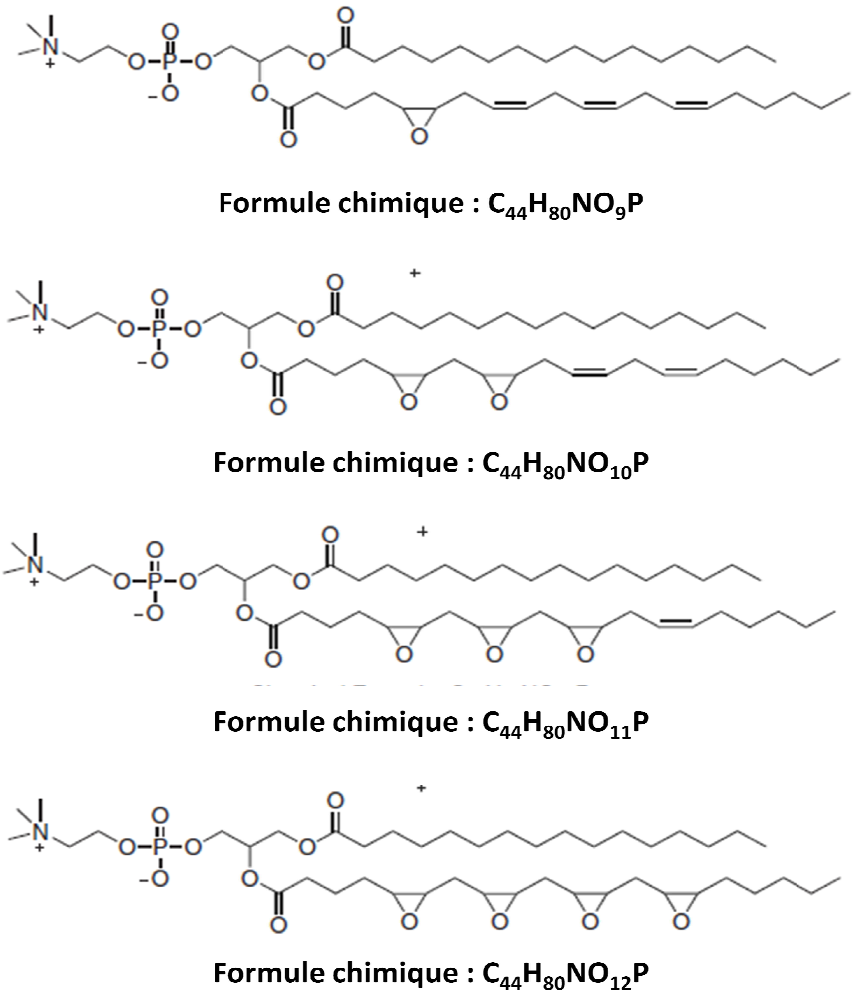


Figure 4-6. Formules structurales des différents phospholipides composant la molécule OxPAPc.

Source : http://www.invivogen.com

4.2 Etude *in vitro* de l'activité cellulaire

4.2.1 Test aux sels de Tétrazolium (MTS)

L'étude de l'activité mitochondriale cellulaire est réalisée en présence de CellTiter 96® AQueous one (Promega, Charbonnières les Bains, France). Il s'agit d'un test colorimétrique dont le principe repose sur la réduction des sels de tétrazolium en formazan par la succinate tétrazolium réductase cellulaire témoin de l'activité cellulaire. La réduction se traduit par une réaction colorimétrique proportionnelle au pourcentage d'activité mitochondriale par rapport à un contrôle de cellules non traitées. La lecture de la densité optique se fait à une longueur d'onde de 450 nm. Le pourcentage d'activité mitochondriale, en fonction des traitements, est

déterminé par le ratio entre la densité optique des cellules traitées et la densité optique des cellules contrôle. Brièvement, 30 000 (RINm5f) ou 100 000 (macrophages) cellules diluées dans 200 µl de milieu de culture sont réparties dans les puits d'une plaque 96 puits traitée (Dutscher). Elles sont incubées à 37°C en atmosphère humide et enrichie de 5% de CO_2 pendant toute la nuit afin de les laisser adhérer. Chaque puits est ensuite lavé avec du PBS et les cellules sont incubées avec 100 µl de milieu de culture + 20 µl de Cell Titer® pendant 2 heures. La réduction des sels de tétrazolium est stoppée et induit un changement de couleur mesuré avec un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 490 nm. La quantité de sels réduits varie directement en fonction de l'activité mitochondriale des cellules testées. Ainsi, l'absorbance à 490 nm est une mesure indirecte de l'activité mitochondriale. L'activité mitochondriale est testée selon différents temps d'incubation et avec différentes concentrations de molécules à tester. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité mitochondriale par rapport aux conditions contrôles sans traitement.

4.2.2 L'apoptose cellulaire

Lors de la mort cellulaire programmée (apoptose naturelle ou induite par traitement pharmacologique), les cellules compactent leur matériel intracellulaire en formant des corps apoptotiques qui conservent l'intégrité de ce qu'ils contiennent. Une des caractéristiques moléculaires de ce type de mort est le passage d'un phospholipide membranaire de la surface interne de la cellule à sa surface externe, il s'agit du flip-flop phospholipidique réalisé par la phosphatidyl sérine. Il est ainsi possible d'identifier ce type de mort cellulaire en ciblant ce phospholipide qui est désormais disponible à la surface cellulaire.

La cytométrie en flux est une méthode permettant de visualiser l'apoptose : elle est basée sur la détection de cellules marquées grâce à des lasers. Elle permet également une quantification des cellules ayant subi différents marquages par rapport au nombre de cellules totales. Ces expériences ont été réalisées à la faculté de pharmacie d'Illkirch sur un FACScan (EasyCyte, Millipore, Molsheim, France) avec l'aide du Dr. CD. Muller. Un double marquage Annexine V / iodure de propidium permet de distinguer l'apoptose de la nécrose et de quantifier ces deux phénomènes. L'annexine V marque la phosphatidylsérine qui se transloque sur le feuillet externe de la membrane lors de l'apoptose. L'iodure de propidium est, quant à lui, un intercalant de l'ADN et permet de visualiser l'ADN des cellules nécrotiques dont les membranes plasmiques se sont rompues.

D'un point de vue méthodologique, les cellules (macrophages) sont ensemencées en plaque 96 puits à raison de 150 000 cellules par puits et incubées avec ou sans traitement durant

24H. Les macrophages sont ensuite récupérés, lavés et marqués avec de l'annexine V-FITC (BD Pharmingen™, Le Pont de Claix, France) associée avec de l'iodure de propidium (PI; Sigma). L'analyse est réalisée à l'aide du logiciel Guava Express Pro Software (Millipore). Les cellules apoptotiques sont exprimées selon le pourcentage de cellules annexine V positives. Les cellules vivantes sont exprimées comme le pourcentage de cellules annexine V négatives dans la population de cellules non marquée à l'iodure de propidium.

4.2.3 La viabilité des îlots pancréatiques

Le marquage à la Fluorescéine Diacétate (FDA, Sigma-Aldrich) couplée avec de l'Iodure de Propidium (PI, Sigma-Aldrich) est une méthode de fluorimétrie rapide pour évaluer l'intégrité des îlots pancréatiques. Après avoir diffusé à travers la membrane plasmique, la FDA (ester non polaire) est hydrolysée par les estérases intracellulaires. L'hydrolyse de la FDA conduit à la synthèse de fluorescéine polaire qui reste confinée à l'intérieur des cellules avec une membrane plasmique intacte. Ainsi, les cellules vivantes apparaissent avec une fluorescence verte détectable par microscopie à fluorescence. L'iodure de propidium, quant à lui, traverse uniquement les membranes des cellules mortes ou mourantes. A l'intérieur de la cellule, le PI se fixe aux acides nucléiques qui apparaissent ensuite avec une fluorescence rouge. Ainsi, la FDA (0,67µmol.l^{-1}) utilisée simultanément avec le PI (4 µmol.l^{-1}) rend possible la différenciation entre les cellules viables et les cellules non-viables. La viabilité des îlots pancréatiques est estimée de façon empirique en estimant visuellement le pourcentage de cellules viables au pourtour de l'îlot par rapport à l'ensemble des cellules visibles de ce même îlot. Cette estimation, subjective, ne donne aucun renseignement sur la viabilité des cellules au centre de l'îlot. L'estimation est reproduite sur une dizaine d'îlots pour chaque condition.

4.3 Etude *in vitro* de la fonctionnalité des îlots

La fonctionnalité des îlots pancréatiques est évaluée à l'aide d'un test de stimulation au glucose. Ce test permet d'évaluer la quantité d'insuline secrétée par les îlots pancréatiques après leur stimulation avec une solution riche en glucose. En pratique, 10 îlots pancréatiques sont prélevés et placés dans 4 ml de solution basale (Kreb's Ringer avec 2,5 mmol.l^{-1} de glucose) pendant 1 heure à 37°C. Les cellules sont ensuite incubées dans 4 ml de solution basale pendant 1 heure 30 minutes à 37°C. Le surnageant est alors prélevé et les îlots sont incubés dans 4 ml de solution stimulée (Kreb's Ringer avec 25 mmol.l^{-1} de glucose). Après 1 heure 30 minutes d'incubation à 37°C, le surnageant est prélevé. L'insuline présente dans les surnageants prélevés est ensuite dosée afin de comparer la quantité d'insuline secrétée par les

îlots en condition basale et stimulée. Le dosage de l'insuline se fait à l'aide d'un test immunoenzymatique (Voir chapitre 3.9.1.6). (Dosage "Enzyme Linked Immunosorbent Assay" (ELISA)): Mercodia Rat insulin Elisa (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, Mercodia, Uppsala, Suède) suivant les recommandations du fournisseur. La fonctionnalité des îlots est exprimée en index de stimulation :

$$Index\ de\ stimulation = \frac{\text{Quantité d'insuline sécrétée en condition stimulée}}{\text{Quantité d'Insuline sécrétée en condition basale}}$$

4.4 Etude *in vitro* de la migration cellulaire

L'étude du chimiotactisme est réalisée à l'aide d'une chambre de Boyden modifiée dont le principe repose sur la migration cellulaire induite par la présence d'un gradient chimiotactique entre deux compartiments. La chambre de Boyden est composée de deux chambres séparées par un filtre à travers lequel les cellules migrent.

Un insert (Dutscher) avec une membrane de polycarbonate d'une porosité de 8 µm est placé dans chaque puits d'une plaque 24 puits (Dutsher). Les macrophages sont ensuite placés dans le compartiment du haut à raison de 500 000 macrophages par insert dilués dans 250 µl de milieu M199 en présence d'un traitement ou pas. Le compartiment du bas contient 900 µl de solution chimiotactique à testér. Le formyl-Met-Leu-Phe (fMLP ; Sigma), reconnu pour son fort pouvoir chimioattractant, est utilisé comme contrôle positif de migration. Le fMLP est un tripeptide de synthèse, analogue de produits du métabolisme bactérien. Le milieu M199 est utilisé comme contrôle négatif de la migration macrophagique.

Après 4 heures d'incubation à 37°C en atmosphère humide enrichie de 5% de CO_2, le chimiotactisme est évalué après fixation et coloration (Diff-Quick®, Dade Behring, Courbevoie, France) des macrophages accolés à la membrane du côté extérieur de l'insert. Après séchage à température ambiante, s'ensuit une décoloration à l'acide chlorhydrique (VWR, Strasbourg, France) à 0,1 mol.l^{-1}. La lecture se fait par spectrophotométrie à 605 nm. Le chimiotactisme est évalué par le calcul de l'index de migration :

$$Index\ de\ migration = \frac{DO\ macrophages\ attirés\ par\ le\ surnageant\ \pm\ traitement}{DO\ macrophages\ attirés\ par\ le\ milieu\ de\ culture\ seul}$$

4.5 Dosage de la capacité antioxydante totale

La méthode « 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid » (ABTS) utilisée joue sur le transfert l'électron singulet utilisé par les antioxydants pour réduire les radicaux primaires (anion superoxyde (O_2^-)…etc). Ainsi, ce test est basé sur la capacité d'un

antioxydant à stabiliser le radical cationique $ABTS^+$ de coloration bleue-verte en le transformant en $ABTS^+$ incolore, par piégeage d'un proton par l'antioxydant. Une comparaison est faite avec la capacité de l'« acide hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carboxylique » (Trolox, analogue structural hydrosoluble de la vitamine E) à capturer $ABTS^+$. La décroissance de l'absorbance induite par l'antioxydant reflète la capacité de capture du radical libre. La capacité antioxydante, exprimée en équivalent Trolox (TEAC), correspond donc à la concentration de Trolox ayant la même activité que la substance à tester. Cette méthode permet de fournir une évaluation indépendante et simultanée des molécules de bas poids moléculaire et des protéines antioxydantes présentes dans des échantillons biologiques (Romay, et al., 1996; Lewinska, et al., 2007).

En pratique, la solution d'ABTS (7 $mmol.l^{-1}$ d'ABTS (VWR), 2,5 $mmol.l^{-1}$ de Persulfate de Potassium dilué dans de l'eau bidistillée) est préparée afin d'avoir une DO à 734 nm égale à 0,7. Puis 2 µl d'échantillon dilué au ½ avec du PBS sont testés en présence de 200 µl d'ATBS le plus rapidement possible. La capacité antioxydante est évaluée par la lecture de la DO à 734 nm après 4 min d'incubation et par comparaison à la gamme de Trolox (Sigma-Aldich). Le résultat est donné en $mmol.l^{-1}$ d'équivalent Trolox.

4.6 Dosage des endotoxines

Le principe de ce test repose sur l'utilisation de lysat d'Amœbocytes de Limule (LAL). La détection des endotoxines via le lysat d'Amœbocytes de Limule vient d'une observation faite par Bang en 1956 (Bang, 1956). Les endotoxines bactériennes catalysent l'activation d'une pro-enzyme présente dans le LAL. Le taux initial d'activation est déterminé par la concentration d'endotoxine présente. L'enzyme activée catalyse la scission de la p-nitroaniline (pNA) à partir du substrat incolore. La pNA libérée est mesurée par spectrophotométrie à 405-410 nm et la réaction est arrêtée avec une solution stop. La corrélation entre l'absorbance et la concentration d'endotoxine est linéaire dans une gamme s'étalant de 0,1 à 1,0 UE / ml. La concentration d'endotoxine dans un échantillon est calculée à partir des valeurs d'absorbance de solutions contenant des quantités connues d'endotoxine.

En pratique, 50 µl d'échantillon à tester sont mélangés avec 50 µl LAL et incubés à 37°C pendant 10 min. Cent µl de substrat chromogénique sont ensuite ajoutés au mélange échantillon-LAL. Après 6 minutes d'incubation supplémentaires à 37°C (± 1°C), la réaction est arrêtée avec 100 µl d'acide acétique à 25%. Une couleur jaune se développe si l'échantillon présente des endotoxines. La DO proportionnelle à la quantité d'endotoxines

présentes est déterminée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 405-410 nm. La concentration d'endotoxine peut être calculée à partir d'une courbe standard en UE / ml.

4.7 Etude de l'expression des ARNs

4.7.1 Extraction des ARNs

L'ARN total est extrait des cellules en culture à l'aide du Kit RNeasy Plus Mini (Qiagen, Courtaboeuf, France) selon le protocole défini par le fournisseur. Le tampon RLT plus est une solution mono-phasique de phénol et d'isothiocyanate de guanidine qui permet de lyser les cellules et de dissoudre les composants cellulaires tout en préservant l'intégrité des ARNs. Brièvement, les cellules sont lysées dans 350 µl de tampon RLT plus. Le lysat est ensuite homogénéisé à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille 20-gauge (Terumo®, Dutscher) afin de réduire la viscosité et donc de favoriser la fixation de l'ARN dans la colonne d'extraction. Le lysat est transféré dans une première colonne et centrifugé à 8000 x g pendant 30 secondes afin d'éliminer l'ADN génomique. Puis, les ARNs contenus dans le filtrat sont précipités par addition de 350 µl d'éthanol 70%. Le mélange est transféré dans une deuxième colonne qui retient l'ARN puis centrifugé à 8000 x g pendant 15 secondes. Puis la colonne est lavée avec 700 µl de tampon RW1 et centrifugée à 8000 x g pendant 15 secondes. La colonne est de nouveau lavée deux fois avec 500 µl de tampon RPE puis centrifugée à 8000 x g pendant 15 secondes et pendant 2 minutes pour le dernier lavage. Afin de s'assurer de l'élimination de tous les tampons de lavage utilisés, la colonne est centrifugée seule à 20 000 x g pendant 1 minute. Enfin, l'ARN est élué avec 30 µl d'eau ARNase free. Les concentrations sont déterminées par densité optique à 260 nm et la pureté des échantillons d'ARN est calculée par le rapport des densités optiques à 260 et 280 nm. Un rapport égal ou supérieur à 1,8 indique l'absence de contamination de la préparation d'ARN par les protéines.

4.7.2 Transcription inverse des ARNs

L'obtention d'ADNc totaux est réalisée par transcription inverse (RT) sur 1 µg ou 500 ng d'ARN total à l'aide du kit « RT^2 First Strand Kit » (SABiosciences™, Qiagen) suivant les instructions du fabricant. Une double précaution est prise afin d'éliminer l'ADN génomique, les ARNs son incubés pendant 5 min à 42°C avec 2 µl de tampon d'élimination d'ADN génomique dans un volume final de 10 µl. Le mélange réactionnel est ensuite constitué de 4 µl de tampon BC3, 1 µl d'amorces non spécifiques P2, de 2 µl de transcriptase inverse RE3 et complété de 3 µl d'eau ARNase free pour un volume final de 20 µl. Les échantillons sont

incubés à 42°C pendant 15 min et la réaction est stoppée en chauffant les échantillons à 95°C pendant 5 min.

4.7.3 Quantification des ARNs

Les ADNc spécifiques des ARNm étudiés sont amplifiés en utilisant le kit « QuantiTect® SYBR® Green PCR » (Qiagen). Des courbes de standardisation sont obtenues pour chaque gène étudié, par dilutions en cascade d'un pool d'échantillons contrôle d'ADNc. Le milieu réactionnel (25 µl) contient 12,5 µl de « 2x Quantitect SYBR Green PCR Master Mix », 0,3 $\mu mol.l^{-1}$ de chaque couple d'amorces sens-antisens spécifiques de chaque gène étudié, 10 µl d'ADNc (dilué au 1/20ème pour 1 µg d'ARN rétrotranscrit ou au 1/10ème pour 500 ng), selon les recommandations du fournisseur. Après une première dénaturation à 95°C pendant 15 min, la PCR est réalisée en 40 cycles de dénaturation (15 sec à 94°C), d'hybridation (30 sec à 55°C) et de polymérisation (30 sec à 72°C). L'établissement d'une courbe des points de fusion est systématiquement réalisée suivant les instructions proposées par le fournisseur du logiciel du thermocycleur (IQ™5, Bio-Rad). Cette courbe permet de vérifier la spécificité des produits de PCR. Un contrôle négatif est systématiquement réalisé en remplaçant l'ADNc par de l'eau stérile de qualité PCR. Chaque échantillon est analysé en doublet et quantifié avec le logiciel d'analyse du thermocycleur. L'expression relative des différents gènes est calculée en rapportant les taux d'ARNm à ceux de 3 gènes d'intérêts différents.

4.7.4 La transplantation d'îlots pancréatiques

Les rats transplantés sont des rats Lewis syngéniques avec un poids corporel variant entre 200 et 250 g. L'expérimentation animale est réalisée dans le respect des règles de bioéthique et de la législation française.

4.7.4.1 Induction du diabète par la Streptozotocine (STZ) chez le rat

L'induction du diabète est réalisée par injection intra-péritonéale d'une solution de STZ (Sigma-Aldrich) à raison de 75 mg/kg de masse corporelle. La STZ [2-deoxy-2(3-méthyl-3-nitrosourée) 1-D-glucopyranose] est un antibiotique à large spectre produit par Streptomyces achromogenes. Du fait de sa faible stabilité, la STZ est préparée extemporanément dans un tampon citrate 0,1 $mol.l^{-1}$ pH 4,5 composé d'acide citrique monohydrate 0,1 M (Sigma-Aldrich), d'acide citrique trisodique 0,1 $mol.l^{-1}$ (Sigma-Aldrich), d'eau ultrapure et d'hydroxyde de sodium (Sigma-Aldrich). Cette solution est conservée dans la glace le temps de procéder aux injections de STZ. La glycémie des rats est alors vérifiée 2 jours après

injection à l'aide d'un lecteur de glycémie (AccuChek, Roche, Meylan, France) par prise d'une goutte de sang à la queue du rat.

4.7.4.2 Protocole de transplantation in situ

Les îlots pancréatiques sont cultivés dans du milieu M199 supplémenté avec 10% de SVF et 1% AB/AM durant 24 heures avant transplantation. Cinq cents îlots pancréatiques sont suspendus dans 1 ml de milieu CMRL1066 (Sigma-Aldrich) avant d'être transplantés.

Des billes de dextran (Sigma-Aldrich) avec une taille moyenne de 150 µm sont utilisées comme contrôle chirurgical (SHAM). Les billes sont préparées suivant les instructions données par le fournisseur et stérilisées avant d'être transplantées. Cinq cents billes sont suspendues dans 1 ml de milieu CMRL1066 avant d'être transplantées.

De plus, afin de limiter la glucotoxicité provoquée par l'hyperglycémie diabétique (Maedler, et al., 2002), les rats sont traités quotidiennement avec 4 UI d'insuline (Umuline® NPH, Lilly, Fergersheim, France) une semaine avant transplantation. Ce traitement permet de limiter les autres sources d'inflammation en minimisant l'hyperglycémie.

Les rats sont anesthésiés par inhalation d'isoflurane (CSP, Cournon d'Auvergne, France) et une incision verticale d'environ 1cm partant de la base du sternum est pratiquée. Le duodénum est dégagé de la cavité péritonéale afin d'exposer le trajet de la veine porte. Les veines assurant la vascularisation des lobes droits et gauches du foie sont clampées. Cinq cents îlots pancréatiques sont transplantés par voie intraportale et viennent se loger dans les lobes caudés non clampés (**Fig. 3-7**). Ce site d'implantation a été choisi afin de permettre une étude histologique plus précise. Une fois l'injection terminée, les lobes hépatiques droits et gauches sont irrigués par déclampage et une compression au site d'injection permet d'arrêter les saignements. Enfin, les animaux sont suturés et placés sous surveillance jusqu'à leur réveil.

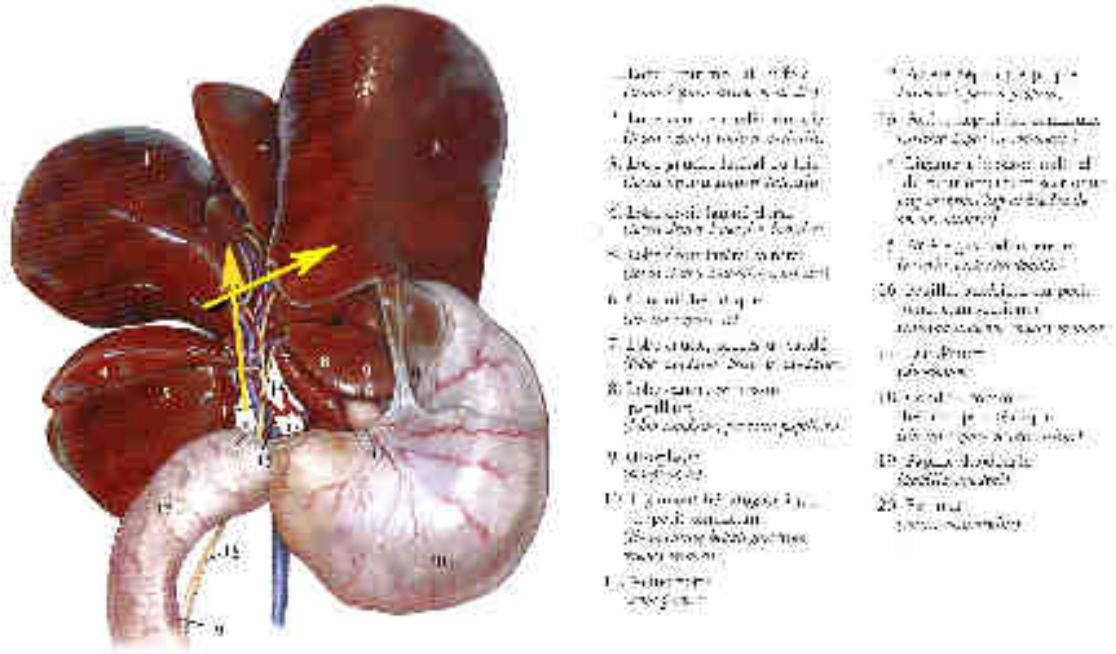


Figure 4-7. Face caudale du foie de Rat.

Le clampage permettant l'injection spécifique dans le lobe caudé est schématisé par les flèches jaunes.
Source : (Aprhamian & Freund, 2004)

4.7.4.3 Prélèvements post transplantation

Après transplantation, les rats sont de nouveau anesthésiés par inhalation d'isoflurane et après laparotomie le sang total des animaux ainsi que les organes transplantés sont prélevés 2, 4, 8, 12, 24 heures post transplantation. Pour les prélèvements réalisés immédiatement après transplantation, les animaux sont maintenus sous anesthésie après suture et le prélèvement commence dès la fin de la suture.

Dans un premier temps, les animaux sont exsanguinés et le sang total est récupéré. Le sang total est transféré dans un tube hépariné (tube BD Vacutainer®, BD Medical, Le Pont de Claix, France) et placé immédiatement dans la glace. Les tubes sont ensuite centrifugés pendant 10 minutes à 10 000 x g et le plasma est récupéré.

Les lobes caudés transplantés et prélevés sont découpés en 3 parties pour permettre différentes analyses (**Fig. 3-8**). Le lobe caudé, processus papillaire, est inclus dans du milieu d'enrobage (OCT, Labonord, Templemars, France) et congelé instantanément dans l'azote liquide. Ce lobe est utilisé pour les études histologiques. Le lobe caudé, processus caudé, est sectionné en 2 parties. La partie apicale est utilisée pour les études d'électrophorèse 2D et la partie caudale pour les études de Résonnance Magnétique Nucléaire (RMN) dont les résultats ne seront pas présentés dans ce mémoire.

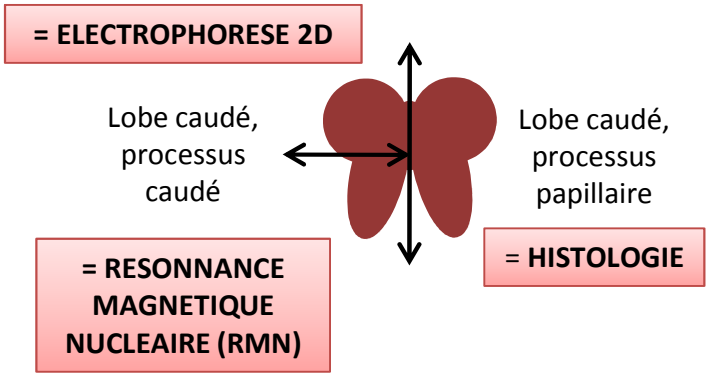


Figure 4-8. Schéma des différentes sections du lobe caudé total transplanté et prélevé.

4.8 Etudes histologiques

4.8.1 Préparation des blocs d'inclusion

Tous les tissus ou cellules utilisés pour les études d'histologie sont inclus dans du milieu d'enrobage OCT à l'intérieur d'un moule d'inclusion (Leica, Nanterre, France) et congelés rapidement dans de l'azote liquide. Les blocs d'inclusion sont stockés à -80°C.

Les coupes sont réalisées à l'aide d'un cryostat (Leica CM3050S, Leica, Nanterre, France) à 4 µm d'épaisseur pour les coupes de cellules et 7 µm pour celles de tissus. Les coupes sont récupérées sur des lames SuperFrost® Plus (Labonord) et stockées à -80°C.

4.8.2 Coloration

4.8.2.1 Coloration Hématoxyline / Eosine

La coloration Hématoxyline / Eosine est une coloration histologique topographique, associant une coloration nucléaire par l'hématoxyline de Harris à une coloration des cytoplasmes et du collagène par l'éosine. L'hématoxyline colore les noyaux cellulaires en bleu, et l'éosine quant à elle colore les cytoplasmes en rose et les fibres dans une gamme de roses plus ou moins vifs. En pratique, les coupes sont colorées 30 secondes dans un bain d'hématoxyline de Harris (Labonord) et rincées deux fois à l'eau. Après un bain rapide d'acide-alcool (2 % d'acide chlorydrique dilué dans de l'éthanol 70%), les coupes sont de nouveaux rincées à l'eau. Les lames sont ensuite passées dans un bain d'eau ammoniacale (2 ml d'hydroxyde d'ammonium (Sigma-Aldrich) diluée dans de l'eau distillée), rincées rapidement à l'eau du robinet et colorées 10 secondes avec de l'éosine (Labonord). Les coupes sont rincées à l'eau et déshydratées avec trois bains d'alcool 100% et un passage rapide dans le toluène (Labonord). Enfin les coupes sont montées entre lame et lamelle.

4.8.2.2 Coloration selon la méthode « Alcoholic Periodic Acid-Aqueous Schiff's » adaptée pour le dextran

Traditionnellement, la coloration avec l'acide périodique de Schiff (PAS) met en évidence les glucides, qu'ils soient neutres ou à fonction acide. Pour ce faire, un agent oxydant, l'acide périodique, rompt les liaisons covalentes entre deux fonctions -OH d'un glucopyranose. Les aldéhydes insolubles créés sont ainsi colorés en rouge par le réactif de Schiff.

Toutefois, dans notre cas, nous cherchons par cette coloration à mettre en évidence les billes de dextran transplantées. Etant donné que le dextran est soluble dans l'eau et que la coloration PAS est effectuée ordinairement avec des réactifs aqueux, nous avons utilisé la méthode « Alcoholic Periodic Acid-Aqueous Schiff's » adaptée par Mowry et Millican pour le dextran (Mowry & al, 1953).

Pour ce faire, les coupes sont passées dans un bain de xylène (Labonord) et d'alcool à 95%. Les coupes sont ensuite traitées 2 heures avec une solution d'acide périodique 1% fraîchement préparée (1g d'acide périodique (Fisher) + 100 ml d'éthanol 90%). Les coupes sont rincées dans un bain d'alcool à 80% et un bain d'eau distillée. Ensuite, les coupes sont traitées pendant 10 min avec le réactif de Schiff aqueux (Sigma-Aldrich) puis rincées trois fois dans une solution de Sodium métabisulfite (Solution mère de sodium métabisulfite (Sigma-Aldrich) à 19% diluée au 20^{ème}pendant 60, 120 et 120 secondes. Les coupes sont lavées dans l'eau distillée pendant 5 min et contre-colorées dans l'hématoxyline pendant 90 secondes. Enfin, les coupes sont rincées à l'eau distillée, à l'alcool 100 % et au xylène avant d'être montées sous lame et lamelle.

4.8.3 Marquage immunohistochimique

4.8.3.1 Révélation à la diaminobenzidine (DAB)

Les coupes sont décongelées à température ambiante et fixées avec une solution de paraformaldéhyde 4% (Sigma-Aldrich) pendant 10 minutes. Les coupes sont ensuite rincées dans une solution de «Tris Buffered Saline » (TBS, Bio-rad, Marnes-la-coquette, France). Afin d'inhiber les peroxydases endogènes, les coupes sont incubées dans un bain de peroxyde d'hydrogène 3% (Sigma-Aldrich) pendant 10 minutes. Les sites aspécifiques sont bloqués pendant 1 heure à température ambiante avec du tampon de blocage contenant une solution de TBS supplémentée avec 0,5 % de triton-X 100 (Sigma-Aldrich) et 5 % de sérum normal de chèvre (Thermo Fisher, Fisher). Les coupes sont ensuite incubées pendant la nuit à 4°C en chambre humide avec l'anticorps primaire (Anticorps monoclonal anti-insuline, dilution 1/1000ème, Sigma-Aldrich) dilué dans la solution de blocage. Les sections sont rincées et

incubées 1h à température ambiante en chambre humide avec l'anticorps secondaire biotinylé (Sigma-Aldrich) dilué au 1/200ème dans la solution de blocage. Les coupes sont de nouveau lavées et incubées pendant 30 minutes dans une solution d'extradivine peroxydase (Sigma-Aldrich) diluée au 1/20ème dans la solution de blocage. Après un rinçage, les coupes sont incubées 2 minutes dans une solution de révélation contenant 200 µl de 3-Amino-9-ethylcarbazole (AEC ; Sigma-Aldrich), 3,8 ml de tampon acétate (Sigma-Aldrich) et 20 µl d'H_2O_2 (Sigma-Aldrich). La révélation est stoppée dans un bain d'eau distillée et les coupes sont contre-colorées dans un bain d'hématoxyline (Labonord) pendant 15 secondes. Les lames sont enfin rincées et montées sous lamelles en milieu aqueux (Labonord).

4.8.3.2 Révélation avec des anticorps secondaires fluorescents

Les coupes sont décongelées à température ambiante et fixées avec de l'acétone froid (Fisher) pendant 3 minutes. Les sites aspécifiques sont bloqués pendant 1 heure à température ambiante avec du tampon de blocage contenant une solution de PBS 1x supplémentée avec 0,5 % de triton-X 100 et 5 % de sérum normal de chèvre. Les coupes sont ensuite incubées pendant la nuit à 4°C en chambre humide avec l'anticorps primaire dilué dans la solution de blocage suivant la dilution préalablement déterminée (**Fig. 3-10**). Les coupes sont lavées avec une solution de lavage (PBS 1x). Elles sont ensuite incubées pendant 1 heure à température ambiante en chambre humide avec l'anticorps secondaire couplé à un composé fluorescent et dilué dans la solution de blocage suivant la dilution préalablement déterminée (**Tab. 3-1**). Les coupes sont rincées et montées sous lamelles en milieux aqueux (Flurosave™, Merck-Millipore, Molsheim, France). L'utilisation d'un intercalant de l'ADN tel que le 4'-6' diamino-2-phenylindole (DAPI ; Sigma-Adrich) à 0.5 µg / ml est éventuellement effectué avant le montage de la lamelle par une incubation d'1 minute.

ANTICORPS PRIMAIRES				
Antigènes	**Anticorps**	**Références**	**Fournisseurs**	**Dilutions**
Rat - Insuline	Monoclonal - lapin	3014	Cell Signaling Technology®, Ozyme, Saint-Quentin-en-Yvelines, France	1/100ème
Rat - Insuline	Monoclonal - souris	8138		1/100ème
Rat – Monocytes / Macrophages / Granulocytes (OX42)	Monoclonal – souris	ab1211	Abcam®, Paris, France	1/100ème
Rat - Monocytes / Macrophages (ED1)	Monoclonal - souris	ab31630		1/100ème
Rat - Thrombine	Polyclonal - lapin	ab92621		1/200ème
Rat - Macrophages (ED2)	Monoclonal – souris	MCA342GA	AbD serotec, Colmar, France	1/50ème
Rat – Granulocytes (HIS48)	Monoclonal– souris	MCA967		1/20ème
Rat – Cellules NK (CD161)	Monoclonale - souris	MCA1427		1/50ème
ANTICORPS SECONDAIRES COUPLES A UN AGENT FLUORESCENT				
Couplage	**Anticorps**	**Références**	**Fournisseurs**	**Dilutions**
Alexa 488	Chèvre anti-souris	A-11001	Molecular probes®, Fisher	1/200ème
	Chèvre anti-lapin	A-11034		1/200ème
Cy3	Chèvre anti-souris	A-10521		1/1000ème
	Chèvre anti-lapin	A-10520		1/1000ème

Tableau 4-1. .Récapitulatif des anticorps utilisés pour les études d'immunohistochimie

4.8.4 Marquage des espèces réactives de l'oxygène avec la sonde dihydroéthidium

4.8.4.1 Principe du marquage avec la sonde dihydroéthidium

L'anion superoxyde (O_2^-) intracellulaire et d'autres radicaux oxygénés peuvent être détectés par la dihydroéthidine (DHE). La DHE est un composé non fluorescent pouvant diffuser à travers la membrane cytoplasmique et qui, sous l'action d'anions superoxyde, s'oxyde rapidement en éthidium fluorescent (excitation= 488 nm; émission = 575nm). L'éthidium va

ensuite s'intercaler au niveau des bases azotées de l'ADN nucléaire. Ceci permet sa rétention dans la cellule, et donc la détection par microscopie est réalisable (Saiki & al, 1986).

Afin de caractériser la nature des ROS, l'usage d'inhibiteurs est nécessaire. Le manganese(III) tetrakis(1-methyl-4-pyridyl)porphyrine (MnTMPyP) est un analogue perméant membranaire de la superoxyde dismutase ; il permet de mettre en évidence la présence d'anion superoxydes. La polyéthylène glycol-catalase (PEG-catalase) est un analogue perméant de la catalase, elle permet de mettre en évidence la présence de peroxyde d'hydrogène. En pratique, après traitement avec le MnTMPyP et la PEG-catalase, la fluorescence émise par la DHE est inversement proportionnelle à la quantité d'anions superoxydes (O_2^-) ou de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

4.8.4.2 Protocole du marquage avec la sonde dihydroethidium

Les coupes sont décongelées à température ambiante et délimitées à l'aide d'un stylo hydrophobe (Dako, Dutscher). Les coupes sont ensuite incubées pendant 30 minutes à 37°C avec une solution contenant la sonde dihydroethidium à 2,5 x 10^{-6}mol.l^{-1} (Sigma-Aldrich).

Les inhibiteurs sont préincubés à 37°C pendant 30 minutes avant l'ajout de la sonde DHE. Ils sont utilisés aux dilutions suivantes : le MnTMPyP à 10^{-4}mol.l^{-1} (Alexis Biochemicals, Enzo Life science, Villeurbanne, France) et la PEG-catalase à 500 UI / ml (Sigma-Aldrich). La fluorescence émise est visualisée par microscopie à fluorescence

4.9 Etude de l'expression protéique

4.9.1.1 Extraction des protéines

4.9.1.1.1 A partir de cellules en culture (Western blot)

Après lavage des cellules avec du PBS, l'extraction des protéines totales est réalisée dans un tampon de lyse (62,5 mmol.l^{-1} de Tris-HCL (Euromedex, Souffleweyersheim, France), 2% de SDS (Euromedex), 10% de glycérol (Sigma-Aldrich), 50 mmol.l^{-1} de DTT (Bio-Rad), 0,001 % de bleu de bromophénol (Bio-Rad)) soit 150 µl de tampon pour une boîte de culture de 25 cm^2. Les macrophages sont décollés à l'aide d'un grattoir (GreinerBio-one, Dutscher) et transférés dans un tube de 1,5 ml tandis que le tampon est directement déposé sur les îlots dans un tube de 1,5 ml. Le lysat est soniqué 3 x 10 secondes et conservé à -20°C jusqu'à l'analyse.

4.9.1.1.2 A partir de tissus (Electrophorèse 2D)

Pour les tissus, une première étape de broyage à 4°C à l'aide d'un potter dans le tampon échantillon (7 mol.l^{-1} Urée (Bio-Rad), 2 mol.l^{-1} Thiourée (Bio-Rad), 0,24% Triton X-100 (Sigma-Aldrich), 4% CHAPS (Bio-Rad) et 0,001% de bleu de bromophénol + 1% d'inhibiteur de protéase (Roche Diagnostic) est nécessaire. Le broyat est soniqué 3 x10 secondes et centrifugé à 2800 x g pendant 10 minutes à 4°C en tube de 50 ml puis à 21 000 x g pendant 1 heure à 4°C. Le surnageant contenant les protéines est récupéré et conservé à -80°C jusqu'à l'analyse.

4.9.1.2 Dosage des protéines

La présence de certains composants dans les tampons d'extraction tels que le DTT, l'urée rend impossible le dosage des protéines selon une méthode classique (Bradford, Lowry originale). Par ce fait, le dosage des protéines contenues dans les surnageants est réalisé selon la méthode de Lowry (Lowry & al., 1951) modifiée à l'aide du kit RC DC (Bio-Rad) et selon les instructions du fournisseur. Brièvement, 25 µl d'échantillons sont précipités dans 125 µl réactif RC I, vortexés et incubés 1 minute à température ambiante. Ensuite, 125µl de tampon RC II sont ajoutés et les échantillons sont vortexés puis centrifugés pendant 5 minutes à 15 000 x g. Le surnageant est éliminé et 127 µl de réactif A' sont ajoutés dans chaque tube. Les échantillons sont vortexés et incubés à température ambiante pendant 5 minutes. Après l'ajout de 1 ml de réactif DC, tous les échantillons sont de nouveau vortexés et incubés à température ambiante pendant 15 minutes. Les concentrations en protéines des échantillons sont déterminées par la DO et par rapport à une gamme étalon établie à partir d'une solution d'albumine de sérum bovin (BSA, Bio-Rad).

4.9.1.3 Western-Blot

L'extrait protéique (15-30 µg de protéines) est dénaturé à 95°C et déposé sur un gel de polyacrylamide 12% (Bio-Rad). Les protéines sont séparées par électrophorèse (100 Volts pendant 40 minutes). Le transfert est réalisé sur membrane de Polyvinylidene Difluoride (45 µm, Immobilon-P, Millipore) pendant 40 minutes à 200 Volts. Après transfert, la membrane est saturée 1 heure sous agitation à température ambiante dans du TBS (TBS-T) supplémenté avec 0,1 % de Tween 20 (Sigma-Aldrich) et 5% de BSA (Sigma-Aldrich). La membrane est ensuite incubée la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire à la dilution optimale dans le tampon de blocage (**Tab. 3-2**). La membrane est ensuite lavée trois fois sous agitation dans le TBS-T, puis incubée pendant 1 heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire

correspondant couplé à la peroxydase et dilué dans le tampon de blocage. Après trois lavages avec le TBS-T, le complexe d'anticorps est révélé par chiomioluminescence avec un kit de détection (Immun-Star™ Western C™, Bio-Rad). L'imageur Chemidoc XRS (Bio-Rad) permet l'acquisition du signal de chimioluminescence pour une exposition optimale des membranes, et une capture par caméra à transfert de charge (CCD) refroidie. L'exploitation numérique de l'image obtenue est réalisée à l'aide du logiciel Image J (Abramoff, et al., 2004).

ANTICORPS PRIMAIRES				
Antigènes	Anticorps	Références	Fournisseurs	Dilutions
Rat - TLR-4	Monoclonal - souris	ab22048	Abcam®	1/500ème
Rat – TLR-2	Monoclonal - lapin	ab108998	Abcam®	1/500ème
Rat – Hème Oxygénase	Monoclonal - souris	ab13248	Abcam®	1/250ème
Rat - Cyclooxygénase	Polyclonal – lapin	ab15191	Abcam®	1/1000ème
Rat - mTOR	Polyclonal – lapin	2972	Cell Signaling Technology®	1/500ème
Rat – Phospho mTOR	Polyclonal - lapin	2971	Cell Signaling Technology®	1/500ème
Rat – JAK2	Monoclonal - lapin	3776	Cell Signaling Technology®	1/500ème
Rat – Phospho JAK2	Monoclonal - lapin	3230	Cell Signaling Technology®	1/500ème
Rat – ßactine	Monoclonal - souris	sc - 32251	Santa Cruz	1/8000ème
Rat – ßactine	Monoclonal - lapin	ab1801	Abcam®	1/8000ème
ANTICORPS SECONDAIRES COUPLES				
Couplage	Anticorps	Références	Fournisseurs	
HRP	Anti-Souris	A0545	Sigma-Aldrich	1/8000
HRP	Anti-Lapin	A9044	Sigma-Aldrich	1/8000

Tableau 4-2. Récapitulatif des anticorps utilisés pour les analyses par Western blot

4.9.1.4 Electrophorèse Bidimensionnelle

- Préparation des échantillons

Afin de s'assurer de la propreté des extraits protéiques utilisés pour l'électrophorèse 2D, tous les échantillons sont purifiés avec le kit « ReadyPrep 2-D Cleanup » (Biorad) suivant les recommandations du fournisseur. Brièvement, 100 µg de protéines sont précipités avec 300 µl d'une solution d'acide trichloroacétique, vortexés et incubés 15 minutes dans la glace à 4°C. Puis 300 µl de solution saline sont ajoutés. Les protéines sont vortexées et centrifugées à 14000 x g pendant 5 minutes. Le surnageant est jeté et le culot de protéines est lavé avec 40µl de solution saline puis centrifugé à 14000 x g pendant 5 minutes. Le surnageant est jeté et le culot de protéines est lavé avec 25 µl de d'eau bisdistillée. Après avoir vortexé 1 minute le culot 1 ml d'une solution d'acétone glacé est ajouté avec 5 µl de solution saline. Les protéines sont vortexées pendant 1 minutes et incubées 30 minutes à -20°C. Les tubes sont centrifugés à 14000 x g pendant 5 minutes et le culot est suspendu dans 200 µl tampon de réhydratation (20 mmol.l^{-1} de DTT, 2 µl d'ampholytes Bio-Lyte 3-10 100 x (Bio-Rad) complété à 200 µl avec du tampon échantillon).

- Réhydratation des strips

Pendant la réhydratation, les protéines de l'échantillon sont absorbées et réparties sur toute la longueur du « strip ». Pour ce faire, 100 µg d'extraits protéiques (volume total de 200 µl) sont déposés dans un plateau de réhydratation. Un « strip » de 11 cm (Bio-Rad) est déposé délicatement sur chaque extrait protéique, l'ensemble est recouvert d'huile minérale (Bio-Rad) et les strips sont réhydratés passivement pendant la nuit.

- Focalisation des échantillons (1ère dimension)

Les protéines sont séparées en premier lieu suivant leur point isoélectrique (pI) c'est-à-dire le pH auquel une protéine ne porte aucune charge et donc ne peut pas migrer dans un champ électrique. Cette technique est appelée focalisation isoélectrique. Elle est utilisée avec un gradient de pH immobilisé pour l'électrophorèse 2D.

Techniquement, les « strips » réhydratés sont déposés dans un plateau de focalisation et focalisés suivant les étapes suivantes :

ReadyStrip pH 3-10, 11cm				
Etapes	**Heures**	**Voltage à atteindre**	**Montée**	**Volts x Heures Théorique**
1	2H	50 V	Linéaire	100
2	1H	200 V	Linéaire	200
3	2H	1 000 V	Linéaire	2 000
4	1H	8 000 V	Linéaire	8 000
5		8 000V	Rapide	qsp 19 700
(6)	(24H)	(500V)	(Rapide)	

Tableau 4-3. Récapitulatifs des conditions de focalisations

Après focalisation, les strips sont stockés à -80°C jusqu'à la prochaine étape

- Equilibration

Cette étape d'équilibration est nécessaire pour des protéines séparées par focalisation isoélectrique avant l'exécution de deuxième dimension. Ce processus réduit les liaisons disulfures et alkyle les groupements sulfhydryles des résidus de cystéine. Parallèlement, les protéines sont revêtues avec du « Sodium Dodecyl Sulfate » (SDS) nécessaire à la séparation sur la base d'un poids moléculaire. Ainsi, les strips sont incubées pendant 30 minutes dans le tampon d'équilibration I (50 mmol.l^{-1} de Tris-HCL pH 8,8, 6mol.l^{-1} d'urée, 30% de glycérol, 2% de SDS et 65 mmol.l^{-1}de DTT) puis 20 minutes dans le tampon d'équilibration II (50 mmol.l^{-1} de Tris-HCL pH 8,8, 6mol.l^{-1} d'urée, 30% de glycérol, 2% de SDS et 135 mmol.l^{-1}d'iodocétamide (Bio-Rad)).

- Electrophorèse en SDS-PAGE (2ème dimension)

La séparation des protéines par SDS-PAGE se fait selon le poids moléculaire des protéines préalablement focalisées et perpendiculairement à la première dimension.
Pour ce faire, les strips sont déposées dans le puits au dessus d'un gel SDS 12% (Bio-Rad) contenant de l'agarose fondu (Bio-Rad). Une fois l'agarose polymérisé, la cuve de migration est remplie avec du tampon MOPS (Bio-Rad) et les protéines migrent pendant 1 heure à 25 Volts puis 1 heure à 200 Volts.

- Coloration des gels au bleu de Coomassie

A la fin de la migration, les gels sont lavés trois fois avec de l'eau distillée et incubés la nuit avec une solution de bleu de Coomassie (Bio-Safe Coomassiestain, Blue R-250, Bio-Rad). Le gel est ensuite décoloré avec une solution de décoloration chauffée (10 % d'éthanol, 10 % d'acide acétique).

- Analyse des gels 2D

Les gels 2-D sont numérisés à l'aide d'un densitomètre (GS-800 calibrated imaging densitometer, Bio-Rad) et traités à l'aide du logiciel PDQuest ™ (Bio-Rad). Les analyses ont été réalisées avec l'aide de P. Hamman de la plateforme de protéomique de l'esplanade (IBMC, Strasbourg).

- Identification des protéines d'intérêts

Les protéines sont analysées par Spectrométrie « Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time of flight mass - Time of flight mass » (MALDI-TOF-TOF) dont le principe est le suivant : les peptides produits par l'hydrolyse des protéines sont déposés sur la plaque MALDI et cristallisent avec un composé chimique appelé matrice. Les tirs lasers sur les dépôts cristallisés de peptides forment des ions peptidiques dans la partie source de l'appareil. Dans le cas d'une analyse de protéines, on utilisera d'autres matrices plus adaptées à l'échantillon (SA, Acide Férulique,…), le principe de l'analyse restant le même, à la différence qu'il est pratiqué en mode linéaire.
Ces ions vont être accélérés et vont rentrer dans l'analyseur TOF pour être séparés selon le rapport masse/charge. En effet, dans cette région, non soumise à un champ électrique, les ions se déplacent à une vitesse inversement proportionnelle à la racine carrée de leur masse. Ainsi, l'information de temps de vol est transformée en information de masse pour chaque ion formé. L'ensemble de ces informations de masse mesurées pour chaque tir laser sont enregistrées sous forme de spectre. Ce spectre est appelé empreinte peptidique de masse. A partir de ce spectre, l'interrogation des banques de données protéiques peut permettre d'identifier la protéine qui est à l'origine du spectre mesuré dans le spectromètre de masse.
En mode TOF-TOF, les peptides sélectionnés vont être fragmentés par collision avec un gaz inerte, produisant des fragments dont les masses seront mesurées dans un second analyseur. L'analyse des masses de ces fragments permettra de remonter à la séquence des peptides.

Ces expériences ont été réalisées à l'institut de biologie moléculaire et cellulaire de Strasbourg par P. Hammann de la plateforme de protéomique de l'esplanade (IBMC, Strasbourg).

4.9.1.5 Dosage "Enzyme Linked Immunosorbent Assay" (ELISA)

4.9.1.5.1 Principe du dosage ELISA double sandwich

Le principe repose sur la détection par deux anticorps monoclonaux dirigés contre 2 déterminants antigéniques différents de la molécule d'intérêt. Durant la période d'incubation, la protéine d'intérêt contenue dans chaque échantillon réagit avec les anticorps anti-protéine d'intérêt adsorbés au fond de chaque puits de microtitration. Après le lavage permettant de supprimer les protéines non fixées, les anticorps anti-protéine d'intérêt conjugués avec une peroxydase sont ajoutés. Ces anticorps conjugués se complexent avec la protéine d'intérêt préalablement fixée. Après une étape de lavage, le conjugué est détecté par réaction avec le 3,3'-5,5'-tetramethylbenzidine (TMB). La réaction est stoppée par l'addition d'acide, donnant ainsi un changement de couleur mesuré avec un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 450 nm. La quantité d'enzyme complexée varie directement avec la concentration de protéine d'intérêt dans l'échantillon testé. Ainsi, l'absorbance à 450 nm est une mesure indirecte de la concentration en protéine d'intérêt dans chaque échantillon testé. La quantité de protéine d'intérêt peut être déduite d'une courbe standard, et corrigée par la dilution des échantillons. Les différents kits ELISA ont été utilisés selon les recommandations du fournisseur et les références sont regroupées dans le **tableau 3-4**.

Antigène	Référence	Fournisseur
IL-6	Rat IL-6 Quantikine ELISA Kit	R&D Systems
IL-10	Rat IL-10Quantikine ELISA Kit	R&D Systems
MCP-1	Rat MCP1 ELISA Kit	Raybiotec, Inc., Clinisciences, Nanterre, France
Peptide-C	C-peptide, Rat ELISA	Mercodia, Uppsala, Suède
α2M	Rat Alpha 2-Macroglobulin	GenWay, Euromedex
TAT	ELISA Kit for Thrombin/Antithrombin Complex (TAT)	USCN Life Science Inc., Euromedex

Tableau 4-4. Récapitulatif des kits ELISA utilisés

4.9.1.5.2 Principe du dosage ELISA multiplexe

Les dosages multiplexes des cytokines sont réalisés à l'aide du kit « RayBio® Cytokine Antibody Arrays 1 » (RayBiotech,Inc., Tebu-Bio, Le Perray en Yvelines, France) pour le criblage qualitatif et à l'aide du kit «Quantibody® Rat Inflammation Array 1 » (RayBiotech, Inc.) pour le dosage quantitatif . Ce dosage est basé sur le principe du « Sandwich immunoassay » où un panel d'anticorps spécifiques à des cytokines est fixé à des localisations spécifiques sur une membrane de nitrocellulose (**Fig. 3-9A**) ou sur une lame de verre (**Fig. 3-9B**). L'incubation des membranes ou des lames de verre avec les échantillons biologiques entraîne la capture des cytokines présentes par leurs anticorps spécifiques. Après une série de lavages, les cytokines fixées sont détectées avec un cocktail d'anticorps biotinylés. La révélation des membranes de nitrocellulose est réalisée à l'aide du couple extravidine-peroxidase par chimioluminescence pour le criblage qualitatif. La révélation des lames de verre est réalisée à l'aide du couple extravidine-Cy3 par fluorescence pour le dosage quantitatif. Enfin, l'analyse semi-quantitative des cytokines fixées par les membranes (**Tab. 3-5**) est réalisée à l'aide du logiciel Image J pour les membranes de nitrocellulose ou directement par le fournisseur pour le quantikine®.

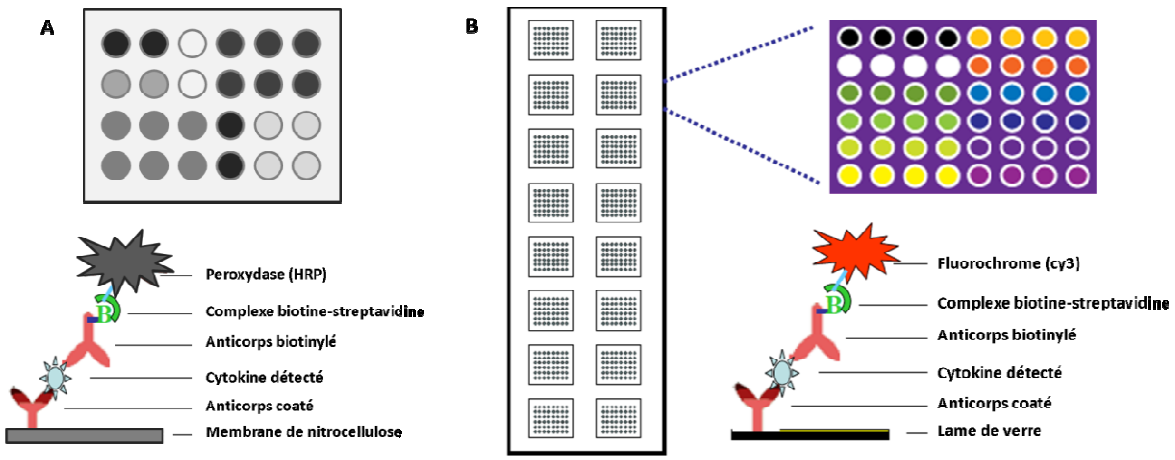


Figure 4-9. Principe du Cytokine Array (A) et du Quantiboby® Array (B)

	a	b	c	d	e	f	g	h
1	Pos	Pos	Neg	Neg	CINC-2	CINC-3	CNTF	Fractalkine
2	Pos	Pos	Neg	Neg	CINC-2	CINC-3	CNTF	Fractalkine
3	GM-CSF	IFN-gamma	IL-1 alpha	IL-1 beta	IL-4	IL-6	IL-10	LIX
4	GM-CSF	IFN-gamma	IL-1 alpha	IL-1 beta	IL-4	IL-6	IL-10	LIX
5	Leptin	MCP-1	MIP-3 alpha	beta-NGF	TIMP-1	TNF-alpha	VEGF	BLANK
6	Leptin	MCP-1	MIP-3 alpha	beta-NGF	TIMP-1	TNF-alpha	VEGF	BLANK
7	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	Pos
8	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	BLANK	Pos

Tableau 4-5. Tableau récapitulatif des cytokines présentes sur le « RayBio® Rat AntibodyArray 1 ».

4.10 Statistiques

Toutes les valeurs sont exprimées par leur moyenne ± Erreur Standard Moyenne (ESM). Elles sont comparées en utilisant une analyse multifactorielle de la variance, suivie d'un test de Student pour les comparaisons multiples. Les résultats sont considérés comme significatifs lorsque p est inférieur à 0,05 (*/# : P<0,05 ; **/## : P<0,01 ; ***/### : P< 0,001).

5 RESULTATS ET DISCUSSIONS

5.1 Mise en évidence du processus inflammatoire au cours de la culture d'îlots

- **La fonctionnalité des îlots diminue au cours du temps de culture**

La première étape de ce travail consiste à caractériser l'effet du temps de culture sur la viabilité et la fonctionnalité des îlots *in vitro*. La fluorescence verte et l'absence de fluorescence rouge observées semblent indiquer que la viabilité des îlots (**Fig.4-1A**) reste préservée au cours du temps. L'index de stimulation qui rend compte de la fonctionnalité des îlots diminue progressivement et significativement durant les 48 heures de culture (2,3 ± 0,5, p<0,001 *vs* 18,5 ± 2,2 immédiatement après transplantation). (**Fig. 4-1B**). Ceci suggère que le temps de culture est délétère pour la fonctionnalité des îlots pancréatiques.

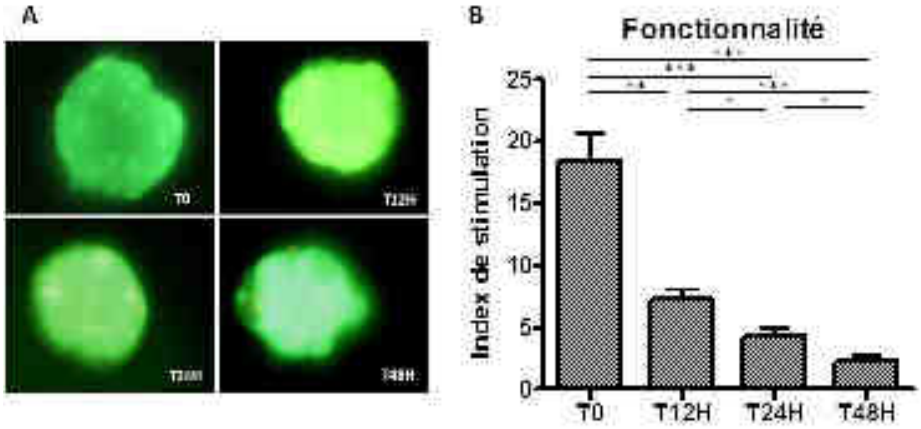


Figure 5-1. (A) Viabilité et (B) fonctionnalité des îlots pancréatiques de Rat en fonction du temps de culture.

La viabilité est appréciée visuellement et les résultats de fonctionnalité sont exprimés selon la valeur moyenne ± ESM de l'index de stimulation. Chaque expérience est effectuée au moins trois fois de manière indépendante. ***p<0.001, *p<0.01, *p<0.05.

- **La voie des Toll-Like récepteurs est modulée au cours du temps**

Prenant pour point de départ la perte de fonctionnalité des îlots en culture, nous cherchons à déterminer si un processus inflammatoire peut être associé à cette altération. Ainsi, nous cherchons à déterminer quelles voies de l'inflammation pourraient être impliquées. Pour répondre à cette question, nous nous sommes donc intéressés à la voie des Toll-like récepteurs (TLRs).

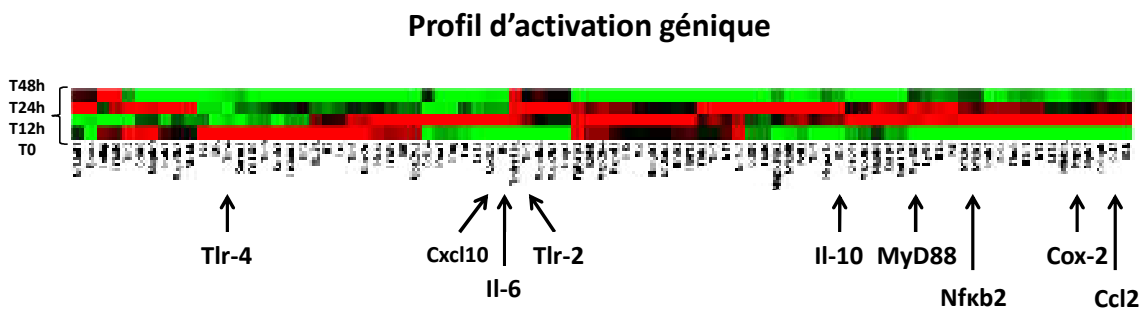


Figure 5-2. Profil d'expression génique de la voie des Toll-like récepteurs.

Les profils d'activation génique sont exprimés par rapport à la condition T0 qui correspond à des ARNm d'îlots extraits immédiatement après isolement. L'amplitude d'expression est représentée suivant le code couleur suivant : (■) amplitude faible; (■) amplitude moyenne (■) amplitude forte

Dans un premier temps, nous avons effectué un criblage de 84 gènes par PCR arrays afin de valider l'implication de la voie des TLRs dans ce processus. Comme le démontre le profil d'activation variable de chaque gène, il semblerait que cette voie de signalisation soit modulée durant les 48 heures de culture (**Fig. 4-2**). Parmi les 84 gènes criblés, nous avons choisi d'analyser les gènes dont le profil d'activation varie selon une amplitude faible ou forte par rapport à la condition contrôle T0 (ARNm extraits immédiatement après isolement). En relations avec le profil d'activation et la pertinence d'étudier ces gènes dans les mécanismes mis en évidence, nous avons sélectionné les gènes : *Tlr-2* et *-4*, *MyD88*, *Nf-κB2*, *Cox-2*, *IL-6* et *-10*, *Cxcl-10* et Ccl2.

Les endotoxines présentes dans le milieu de culture peuvent être à l'origine d'une activation de la voie des TLRs. Ainsi, chaque surnageant de culture est testé afin de s'assurer que les résultats obtenus ne sont pas dus à une contamination par des endotoxines.

Les résultats ont montré que tous les surnageants testés par la méthode LAL présentent une faible concentration en endotoxines < **0,7 EU/ml**.

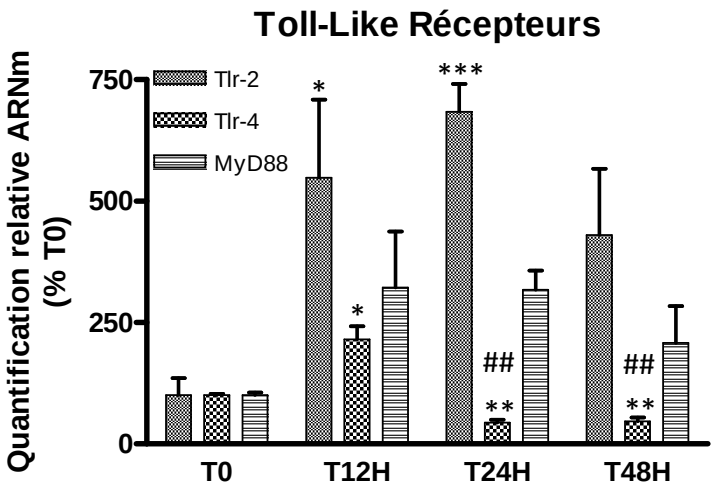


Figure 5-3. Quantification relative de l'ARNm transcrit des gènes *Tlr-2, Tlr-4, MyD88* à partir d'extraits d'îlots pancréatiques de Rat par PCR arrays.

L'expression des gènes est quantifiée immédiatement ou après 12H, 24H, 48H de culture. Les résultats sont exprimés selon le pourcentage de la valeur moyenne ± ESM de la quantité d'ARNm par rapport à T0. Chaque expérience est effectuée au moins trois fois de manière indépendante en doublet. ***p<0,001, *p<0,01, *p<0,05 par comparaison avec T0. ## p<0,01 par comparaison avec T12H.

D'après les données recueillies avec les PCR arrays, l'expression du gène *Tlr-2* (**Fig. 4-3**) est maximale après 24 heures de culture. La quantité d'ARNm augmente de 684,3 % ± 57,5 (p<0,001) après 24 heures *vs* 100 % ± 35,2 à T0. L'expression du gène *Tlr-4* est plus faible que celle de *Tlr-2*. En effet, après 12 heures de culture, la quantité d'ARNm de *Tlr-4* augmente de 215,5 % ± 26,5 (p<0,05) *vs* 100 % ± 3 à T0. Enfin, l'expression de l'adaptateur *MyD88* est également modulée au cours des 48 heures de culture.

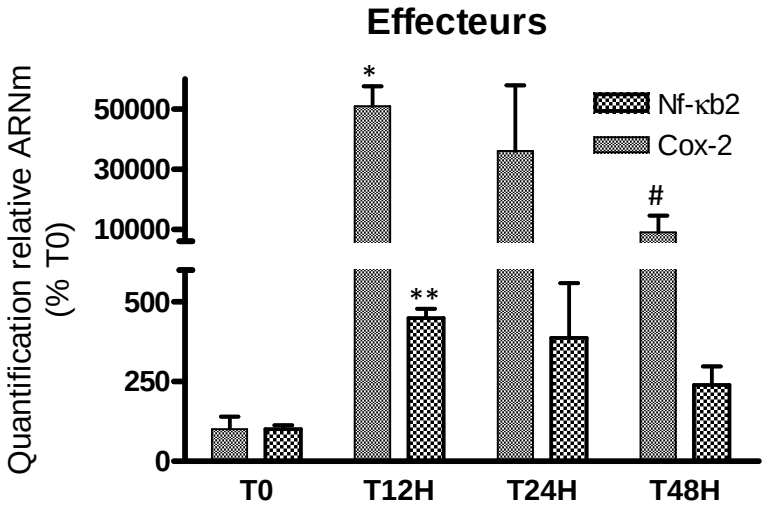


Figure 5-4. Quantification relative de l'ARNm transcrit des gènes *Nf-κb2* et *Cox-2* à partir d'extraits d'îlots pancréatiques de Rat par PCR arrays.

L'expression des gènes est quantifiée immédiatement ou après 12H, 24H, 48H de culture Les résultats sont exprimés selon le pourcentage de la valeur moyenne ± ESM de la quantité d'ARNm par rapport à T0. Chaque expérience est effectuée au moins trois fois de manière indépendante en doublet.p<0,01, *p<0,05 par comparaison avec T0. # p<0,05 par comparaison avec T12H.**

D'après la **figure 4-4**, l'expression du gène *Cox-2* est maximale après 12 heures de culture (50904,9 % ± 6711,1, p<0,05) ; le gène est approximativement 509 fois plus activé par rapport à T0 (100 % ± 32,1). Après son pic à 12 heures, l'expression de *Cox-2* diminue significativement au cours du temps pour atteindre 8992,3% ± 5631,3 à 48 heures (p<0,05 par rapport à T12H). Le temps de culture induit également une augmentation de la quantité de transcrits de *Nf-κb2* après 12 heures de culture (450 % ± 28,5 ; (P<0,01) *vs* 100 % ± 12,7 par rapport à T0). Le profil d'expression de *Nf-κB2* suit la même tendance que celle de *Cox-2* et diminue au cours du temps.

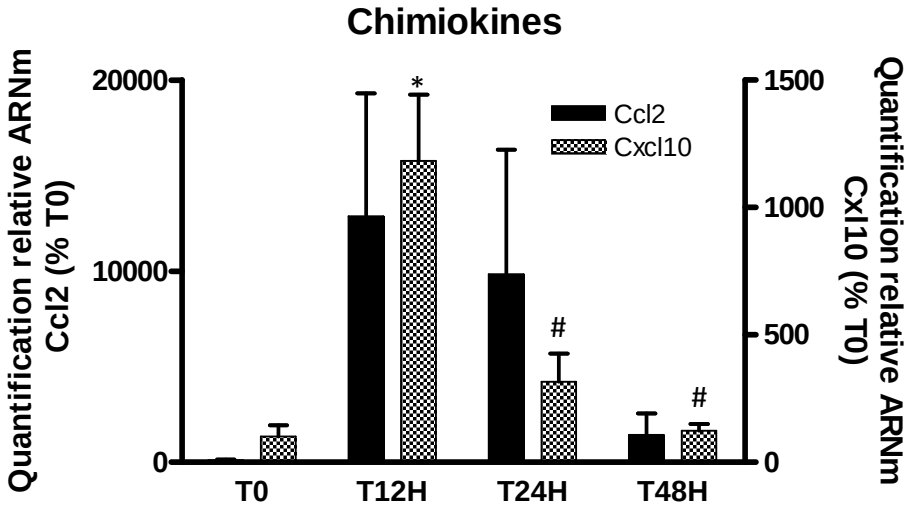


Figure 5-5. Quantification relative de l'ARNm transcrit des gènes *Ccl2* et *Cxcl10* à partir d'extraits d'îlots pancréatiques de Rat par PCR arrays.

L'expression des gènes est quantifiée immédiatement ou après 12H, 24H, 48H de culture. Les résultats sont exprimés selon le pourcentage de la valeur moyenne ± ESM de la quantité d'ARNm par rapport à T0. Chaque expérience est effectuée au moins trois fois de manière indépendante en doublet. *p<0,05 par comparaison avec T0.# p<0,05 par comparaison avec T12H.

D'après la **figure 4-5**, la quantité d'ARNm du gène *Ccl2* augmente significativement après 12 heures de culture (12872,1 % ± 6443,5, p<0,05) par rapport à T0 (100 % ± 44,5). Ensuite, l'expression de *Ccl2* diminue au cours du temps pour atteindre 1431,4% ± 1117,3 à 48 heures. De la même manière, l'expression du gène *Cxcl-10* passe également par son maximum après 12H avec une activation relative de 1182,08 % ± 260,57 (p<0,05) par rapport aux conditions contrôles T0 (100 % ± 44,9) et diminue au cours du temps. Après 48 heures de culture, le pourcentage d'expression de *Ccl2* atteint 122,6 % ± 27,15 (p<0,05 par rapport à T12H).

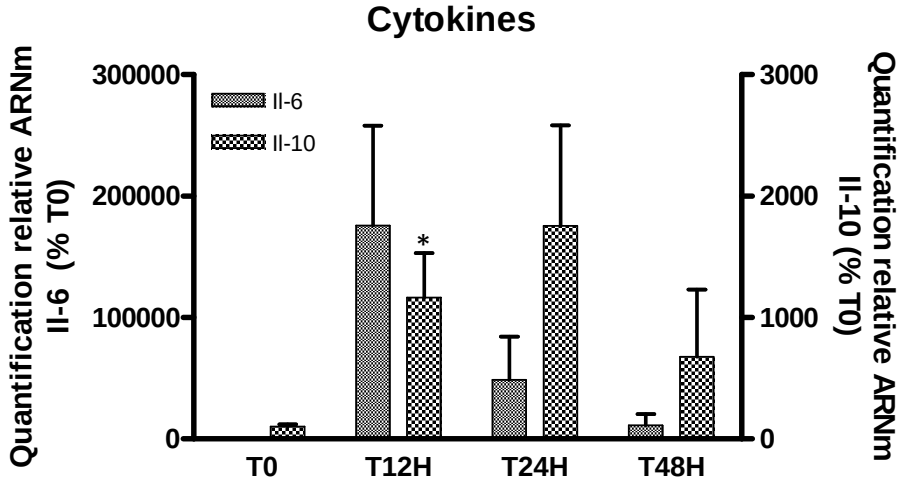


Figure 5-6. Quantification relative de l'ARNm transcrits des gènes *Il-6* et *Il-10* à partir d'extraits d'îlots pancréatiques de Rat par PCR arrays.

L'expression des gènes est quantifiée immédiatement ou après 12H, 24H, 48H de culture. Les résultats sont exprimés selon le pourcentage de la valeur moyenne ± ESM de la quantité d'ARNm par rapport à T0. Chaque expérience est effectuée au moins trois fois de manière indépendante en doublet.*p<0,05 par comparaison avec T0.

Enfin, l'expression du gène *Il-6* est maximale après 12 heures de culture et décroit avec le temps (**Fig. 4-6**). Le gène *Il-6* est plus de 1700 fois activé après 12 heures de culture (175756,5 % ± 82456,5) comparé à la condition contrôle T0 (100 % ± 41,6). La quantité de transcrit de Il-10 atteint son maximum après 24 heures de culture (1754,33 % ± 829,1) et diminue de nouveau après 48 heures de culture (676,7 % ± 552,9).

Ces résultats préliminaires confirment la modulation de la voie de signalisation des TLRs. Toutefois, ces données doivent être confirmées par des analyses plus précises d'expression génique (qPCR) et d'expression protéique (Western Blot et ELISA).

- **Le temps de culture induit la mise en place d'un processus inflammatoire**

Suite aux données obtenues par les PCRarrays, nous avons fait le choix de mettre en relation l'activation (gènes) et l'expression (protéines) des gènes suivants : *Tlr-2* et *-4*, *Cox-2*, *Nf-κB2*, *Ccl2*, *Il-6* et *IL-10*. Par son rôle central dans les processus inflammatoires, le gène *Ho-1* fait également partie des cibles moléculaires sélectionnées.

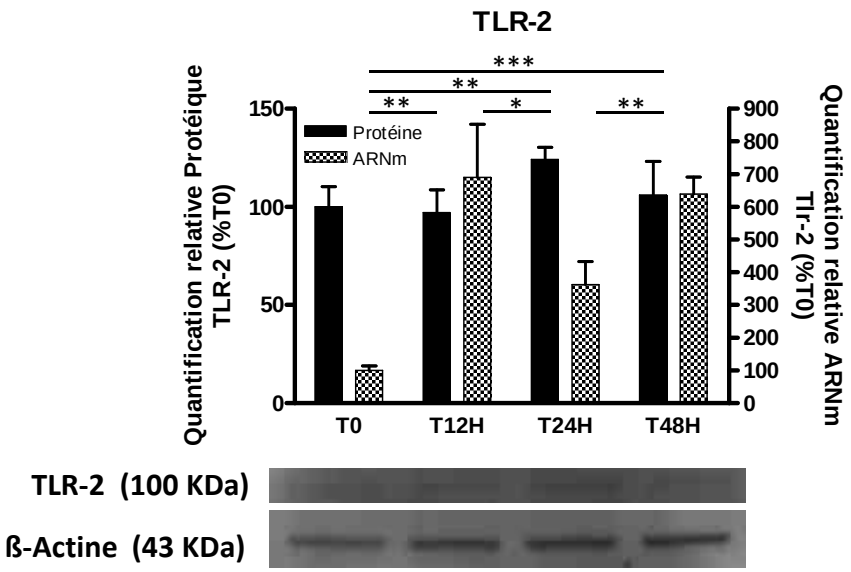


Figure 5-7. Quantification de l'activation relative et de l'expression du gène *Tlr-2* à partir d'extrait d'îlots pancréatiques de Rat par qPCR et Western Blot.

L'activation et l'expression des gènes sont quantifiées immédiatement ou après 12H, 24H, 48H de culture. Les résultats sont exprimés selon le pourcentage de la valeur moyenne ± ESM de la quantité d'ARNm ou de protéine par rapport à la condition T0. Chaque expérience est effectuée au moins trois fois de manière indépendante en doublet ***p<0,001, *p<0,01, *p<0,05. Le pourcentage d'expression protéique est exprimé par rapport au ratio PROTEINE / ACTINE à la condition T0. Chaque expérience est effectuée au moins trois fois de manière indépendante.

D'après la **figure 4-7**, les profils d'activation et d'expression du gène *Tlr-2* ne sont pas corrélés. Ce récepteur est de manière générale très faiblement activé et exprimé dans l'îlot pancréatique. L'activation du gène *Tlr-2* est très variable au cours du temps, tandis que l'expression de la protéine TLR-2 semble se maintenir constante durant les 48 heures de culture.

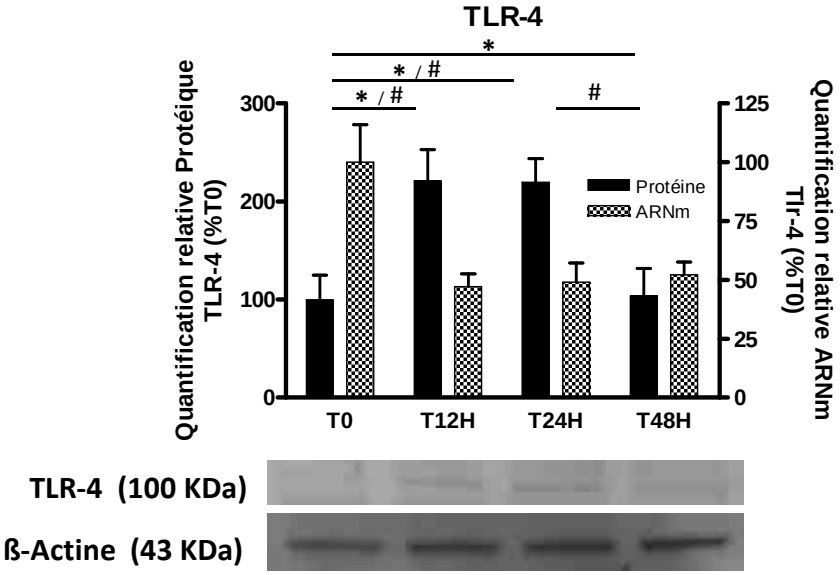


Figure 5-8. Quantification de l'activation relative et de l'expression du gène *Tlr-4* à partir d'extraits d'îlots pancréatiques de Rat par qPCR et Western Blot.

L'activation et l'expression des gènes sont quantifiées immédiatement ou après 12H, 24H, 48H de culture. Les résultats sont exprimés selon le pourcentage de la valeur moyenne ± ESM de la quantité d'ARNm ou de protéine selon le pourcentage par rapport à la condition T0. Chaque expérience est effectuée au moins trois fois de manière indépendante en doublet. *p<0,05. Le pourcentage d'expression protéique est exprimé par rapport au ratio PROTEINE / ACTINE à la condition T0. Chaque expérience est effectuée au moins trois fois de manière indépendante. #p<0,05.

Concernant le gène *Tlr-4*, l'activation génique relative est maximale (100 % ± 13,88) dans les conditions contrôles T0, et diminue pour se maintenir durant les 48 heures de culture avec des valeurs de 47,17 % ± 5,53 (p<0,05), 49,05 % ± 8,14 (p<0,05), 52,16 % ± 5,52 (p<0,05) après 12, 24 et 48 heures de culture respectivement. Toutefois, le profil d'expression de TLR-4 est différent, la quantité de protéines est maximale après 12 heures de culture (221 % ± 31,9 ; p<0,05 par rapport à T0) et se maintient après 24 heures de culture (219,6 % ± 23,9 ; p<0,05 par rapport à T0). Enfin, l'expression relative de TLR-4 diminue significativement après 48 heures de culture (103,8 % ± 27,8 ; p<0,05) par rapport à T24H.

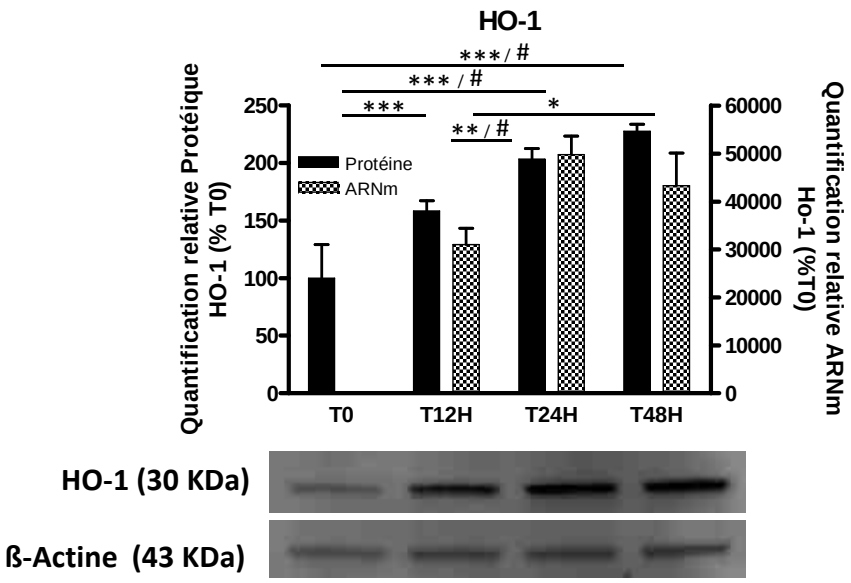


Figure 5-9. Quantification de l'activation relative et de l'expression du gène *Ho-1* à partir d'extraits d'îlots pancréatiques de Rat par qPCR et Western Blot.

L'activation et l'expression des gènes sont quantifiées immédiatement ou après 12H, 24H, 48H de culture. Les résultats sont exprimés selon le pourcentage de la valeur moyenne ± ESM de la quantité d'ARNm ou de protéine par rapport à la condition T0. Chaque expérience est effectuée au moins trois fois de manière indépendante en doublet. ***p<0,001, *p<0,01, *p<0,05. Le pourcentage d'expression protéique est exprimé par rapport au ratio PROTEINE / ACTINE à la condition T0. Chaque expérience est effectuée au moins trois fois de manière indépendante. #p<0,05

En revanche, les profils d'activation et d'expression de Ho-1 et Cox-2 sont cohérents. Quel que soit le profil concerné, le gène *Ho-1* a une activité croissante durant les 48 heures de culture (**Fig. 4-9**). En effet, l'activation du gène *Ho-1* après 48 heures de culture (43287,27 % ± 6843,5 ; p<0,001) est 43 fois plus élevée que celle à T0 (100 % ± 13). Il faut noter, tout de même, une légère diminution de l'activation après 48 heures de culture (43287,3 % ± 6843,5) par rapport à la condition T24H. Par comparaison, l'expression de la protéine HO-1 atteint 227,5 % ± 5,9 (p<0,05 par rapport à T0)

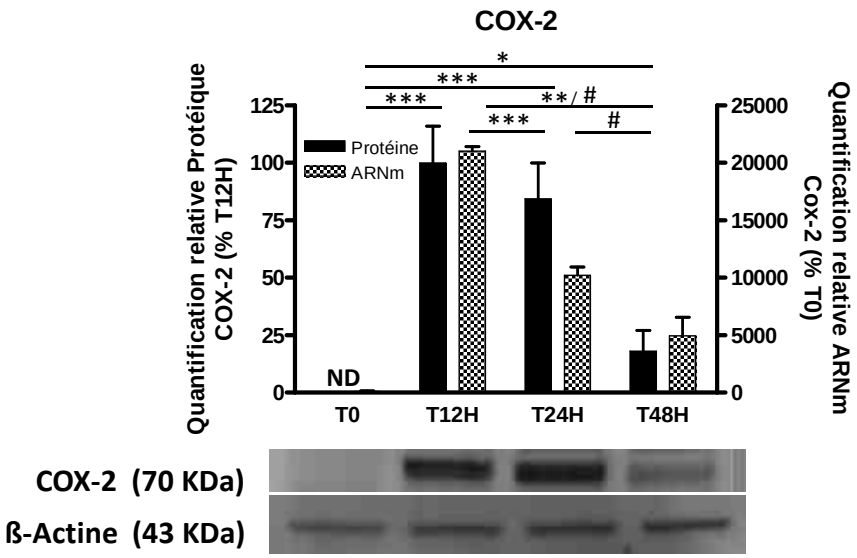


Figure 5-10. Quantification de l'activation relative et de l'expression du gène *Cox-2* à partir d'extraits d'îlots pancréatiques de Rat par qPCR et Western Blot.

L'activation et l'expression des gènes sont quantifiées immédiatement ou après 12H, 24H, 48H de culture. Les résultats sont exprimés selon le pourcentage de la valeur moyenne ± ESM de la quantité d'ARNm ou de protéine par rapport à la condition T12H. Chaque expérience est effectuée au moins trois fois de manière indépendante en doublet. ***p<0,001, *p<0,01, *p<0,05. Le pourcentage d'expression protéique est exprimé par rapport au ratio PROTEINE / ACTINE à la condition T0. Chaque expérience est effectuée au moins trois fois de manière indépendante. #p<0,05

A l'inverse, l'activation du gène *Cox-2* ne cesse de diminuer au cours du temps (**Fig. 4-10**). Bien que l'activation et l'expression soient à un niveau basal après isolement, l'activation est maximale après 12 heures de culture et diminue durant les 36 heures restantes. Après 12 heures de culture, l'activation de *Cox-2* atteint 21029,4 % ± 386,7 *vs* 4958,2 % ± 1588,3 (p<0,01) après 48 heures de culture. L'expression de COX-2 est minimale après 48 heures de culture 18, 04 % ± 9,08 *vs* 100 % ± 15,99 (p<0,05) après 12 heures de culture.

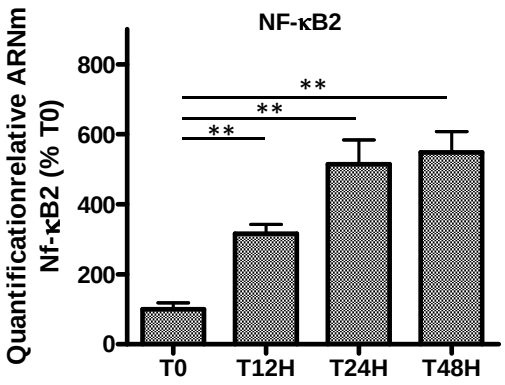


Figure 5-11. Quantification de l'activation relative génique du gène *Nf-κB2* à partir d'extraits d'îlots pancréatiques de Rat par qPCR.

L'activation des gènes est quantifiée immédiatement ou après 12H, 24H, 48H de culture. Les résultats sont exprimés selon le pourcentage de la valeur moyenne ± ESM de la quantité d'ARNm par rapport à T0. Chaque expérience est effectuée au moins trois fois de manière indépendante en doublet. *p<0,05.

Les extraits protéiques dont nous disposions ne nous ont pas permis d'analyser l'expression de la protéine NF-κB2 qui requiert une extraction spécifique (séparation des contenus cytosolique et nucléaire).

Le profil d'activation du gène *Nfκb2* nous apporte cependant des informations intéressantes. De la même manière que les gènes *Ho-1* et *Cox-2*, le gène *Nfκb2* est faiblement activé à T0 (**Fig 4-11**). Son activation est maximale et augmente progressivement avec le temps. Les valeurs d'activation atteignent 315,4 % ± 26,9 après 12 heures de culture et augmentent à 547,7 % ± 9 après 48 heures de culture.

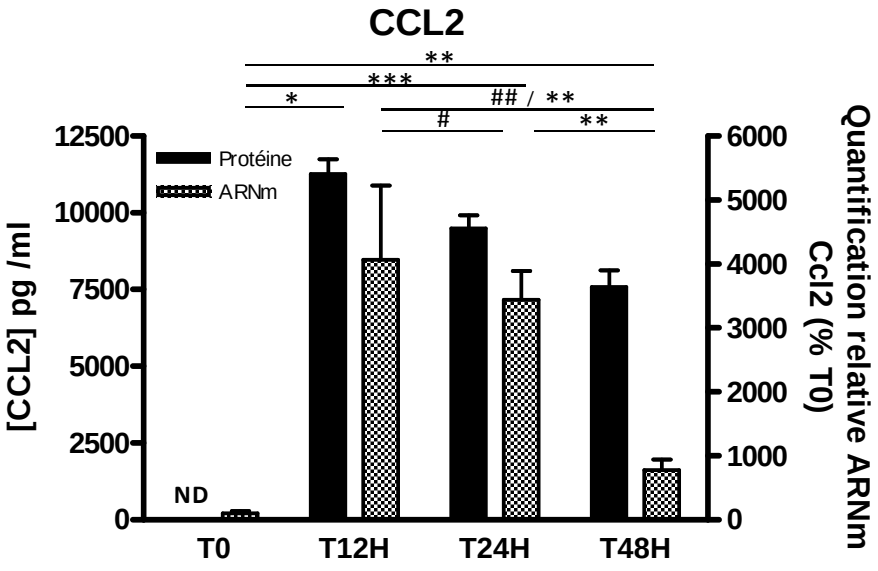


Figure 5-12. Quantification de l'activation relative génique du gène *Ccl2* et de la sécrétion de CCL2 à partir d'extraits d'îlots pancréatiques de Rat par qPCR et ELISA.

L'activation des gènes et la sécrétion des protéines sont quantifiées immédiatement ou après 12H, 24H, 48H de culture. Pour l'activation génique, Les résultats sont exprimés selon le pourcentage de la valeur moyenne ± ESM de la quantité d'ARNm par rapport à T0. Chaque expérience est effectuée au moins trois fois de manière indépendante en doublet ***p<0,001, *p<0,01, *p<0,05. Pour l'expression protéique, les résultats sont exprimés selon la quantité de protéine en pg/ml. Chaque expérience est effectuée au moins trois fois de manière indépendante. ## p<0.01, # p<0.05

D'après la **figure 4-12**, CCL2 est indétectable immédiatement après isolement dans le milieu de culture et apparaît en grande quantité dès la 12ème heure de culture pour diminuer avec le temps. L'activation relative du gène *Ccl2* est de 4066,8 % ± 1162,4 après 12 heures de culture et diminue significativement (p<0,01) pour atteindre 941,9 % ± 163,9 après 48 heures de culture. La quantité de protéine CCL2 dans le surnageant diminue également durant les 48 heures de culture. La quantité moyenne de CCL2 présente dans le surnageant après 12 heures de culture est de 11270,6 pg / ml ± 425,3 *vs* 7584,7 pg/ml ± 489,98 (p<0,01) après 48 heures de culture.

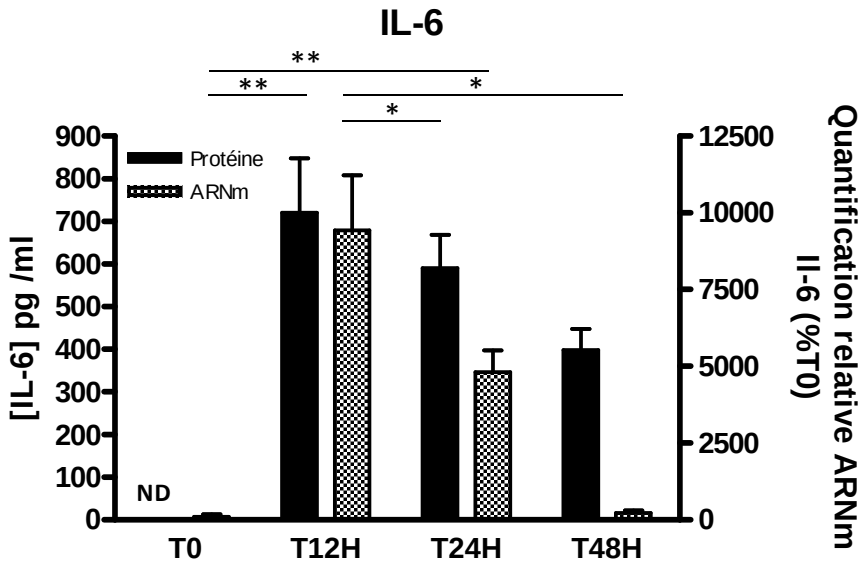


Figure 5-13. Quantification de l'activation relative génique du gène *Il-6* et de la sécrétion d'IL-6 à partir d'extraits d'îlots pancréatiques de Rat par qPCR et ELISA.

L'activation des gènes et la sécrétion des protéines sont quantifiées immédiatement ou après 12H, 24H, 48H de culture. Pour l'activation génique, Les résultats sont exprimés selon le pourcentage de la valeur moyenne ± ESM de la quantité d'ARNm par rapport à T0. Chaque expérience est effectuée au moins trois fois de manière indépendante en doublet.p<0,01, *p<0,05 Pour l'expression protéique, les résultats sont exprimés selon la quantité de protéine en pg/ml. Chaque expérience est effectuée au moins trois fois de manière indépendante.**

Les profils d'activation et d'expression du gène *Il-6* suivent une tendance comparable à ceux de *Ccl2*. Indétectable dans le milieu de culture immédiatement après isolement, IL-6 apparaît dès la 12ème heure de culture (720,6 pg/ml ± 73,6) et diminue significativement après 24 heures (590,8 pg/ml ± 50,6) et 48 heures de culture (398,1 pg/ml ± 21,6). Des résultats comparables sont obtenus pour l'activation du gène qui est de 9429,9 % ± 1794,3 après 12 heures de culture et diminue significativement ($p<0,05$) pour atteindre 227,1 % ± 84,4 après 48 heures de culture.

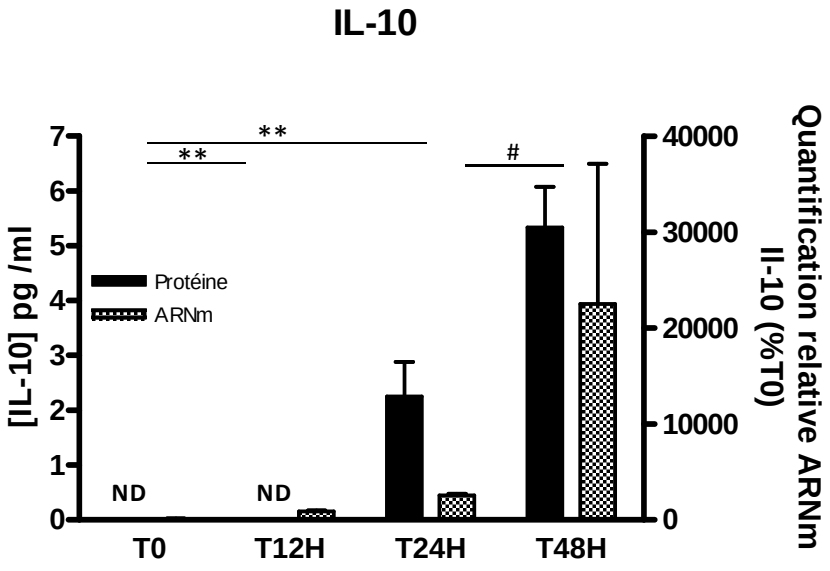


Figure 5-14. Quantification de l'activation relative génique du gène *Il-10* et de la sécrétion d'IL-10 à partir d'extraits d'îlots pancréatiques de Rat par qPCR et ELISA

L'activation et l'expression des gènes sont quantifiées immédiatement ou après 12H, 24H, 48H de culture. Pour l'activation génique, Les résultats sont exprimés selon le pourcentage de la valeur moyenne ± ESM de la quantité d'ARNm par rapport à T0. Chaque expérience est effectuée au moins trois fois de manière indépendante en doubletp<0,01. Pour l'expression protéique, les résultats sont exprimés selon la quantité de protéine en pg/ml. Chaque expérience est effectuée au moins trois fois de manière indépendante. #p<0,05.**

D'après la **figure 4-14**, la protéine IL-10 est indétectable durant les 12 premières heures de culture. De plus, les quantités d'IL-10 retrouvées dans le surnageant après 24 ou 48 heures de culture sont très faibles et sont à la limite du détectable donc doivent être interprétées avec précaution. Le pourcentage d'activation du gène *Il-10* est également très faible durant les 12 premières heures de culture. Le gène *Il-10* semble être activé dès 24 heures et l'activation se poursuit à 48 heures. L'activation relative d'*Il-10* est de 2566,5 % ± 156,5 après 24 heures de culture *vs* 22497,7 % ± 14608,9 après 48 heures de culture (p<0,05).

- **Le temps de culture induit la mise en place d'un stress oxydant**

Afin de compléter ces résultats et de comprendre l'implication de l'hème oxygénase-1 dans la prévention du stress oxydant des îlots, nous avons choisi de quantifier les espèces réactives de l'oxygène (ROS) générées pendant la culture des îlots pancréatiques. Pour ce faire, les ROS générées par les îlots sont quantifiées à l'aide d'une sonde Dihydroéthidium (DHE) et identifiées.

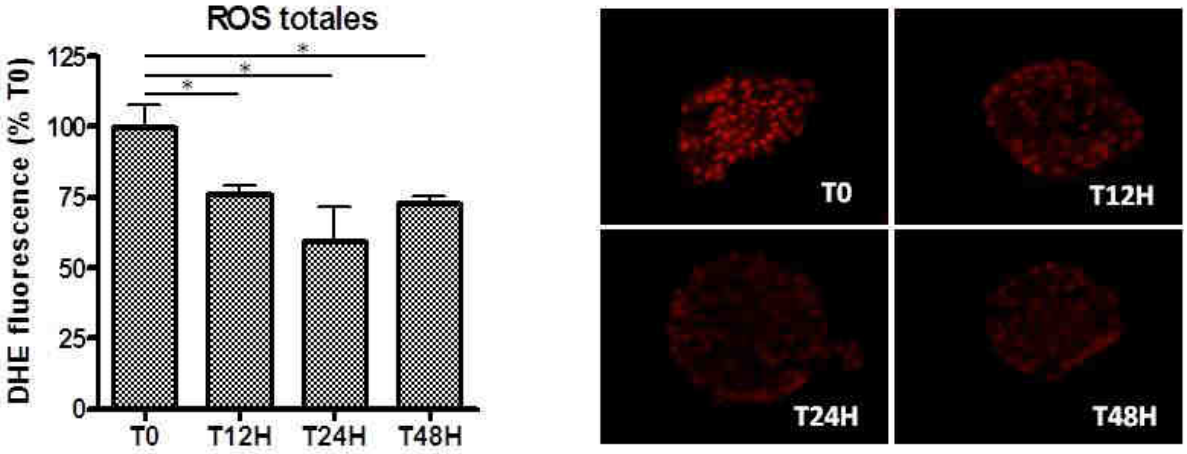


Figure 5-15.Quantification des espèces réactives de l'oxygène (ROS) produites par les îlots pancréatiques de Rat à l'aide d'une sonde de Dihydroéthidium (DHE).

Les îlots pancréatiques sont prélevés immédiatement ou après 12H, 24H, 48H de culture, congelés et coupés à 4 µm. Les résultats sont exprimés en valeur moyenne ± ESM de la fluorescence émise par la sonde DHE. Chaque expérience est effectuée trois fois de manière indépendante et pour chaque expérience les intensités de fluorescence sont mesurées à partir de 5 îlots pancréatiques différents mais présents sur la même coupe. *p<0,05.

D'après les **figures 4-15**, la production de ROS varie au cours du temps de culture. La quantité de ROS totales est maximale immédiatement après isolement (100 % ± 7,7) et diminue significativement ($p<0,05$) jusqu'à 24 heures (59,2 % ± 12,6). Passé ce délai, la quantité de ROS (72,6 % ± 2,7) augmente de nouveau mais reste significativement ($p<0,05$) inférieure à la quantité initiale après isolement.

L'identification des ROS est réalisée en présence de manganèse (III) tetrakis(1-methyl-4-pyridyl)porphyrine (MnTMPyP) et de polyéthylène glycol-catalase (PEG-catalase) afin de mettre en évidence respectivement les anions superoxyde (O_2^-) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Après traitement avec les molécules, la fluorescence émise par la DHE est inversement proportionnelle à la quantité d'O_2^- ou H_2O_2 présente.

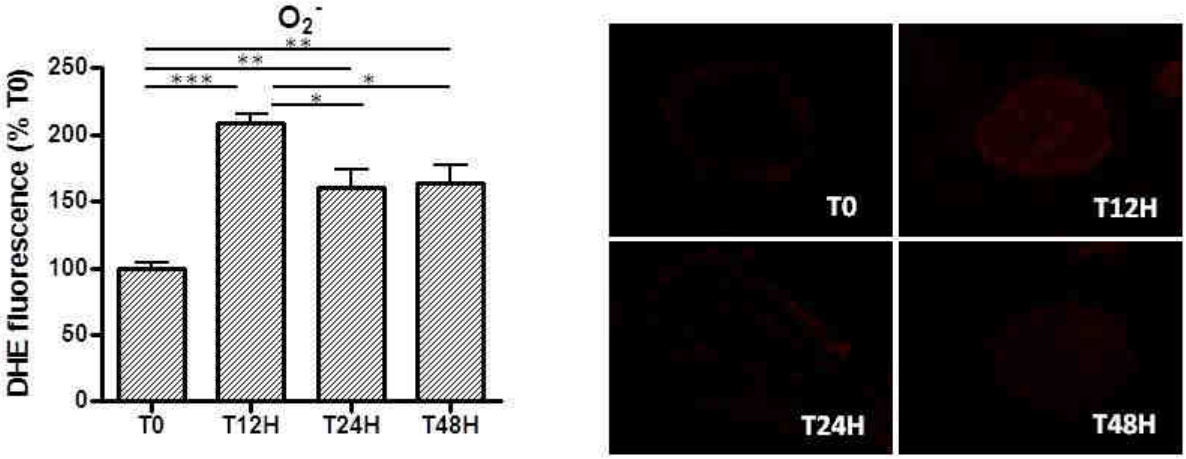


Figure 5-16.Quantification des anions superoxyde (O_2^-) produits par les îlots pancréatiques de Rat à l'aide d'une sonde de Dihydroéthidium (DHE) en présence de MnTMPyP.

Les îlots pancréatiques sont prélevés immédiatement ou après 12H, 24H, 48H de culture, congelés et coupés à 4 µm. Les résultats sont exprimés en valeur moyenne ± ESM de la fluorescence émise par la sonde DHE. Chaque expérience est effectuée trois fois de manière indépendante et pour chaque expérience les intensités de fluorescence sont mesurées à partir de 5 îlots pancréatiques différents mais présents sur la même coupe. *<p0,001 ; **p<0,01 ; *p<0,05.**

D'après la **figure 4-16**, l'intensité de fluorescence émise par la DHE est significativement (p<0,001) augmentée de 2 fois (208,1 % ±7,8) après 12 heures de culture par rapport à T0 (100 % ± 4,2), donc la quantité d'O_2^- diminue. La diminution et le maintien d'une intensité de fluorescence faible, 160,6 % ± 12,9 (p<0,05), 164,1 % ± 13,1(p<0,05) après 24 et 48 heures de culture respectivement, témoigne d'une augmentation significative de la quantité d'O_2^- par rapport à T12H. Bien que la quantité d'O_2^- augmente après 12 heures de culture, elle reste significativement plus faible par rapport à T0.

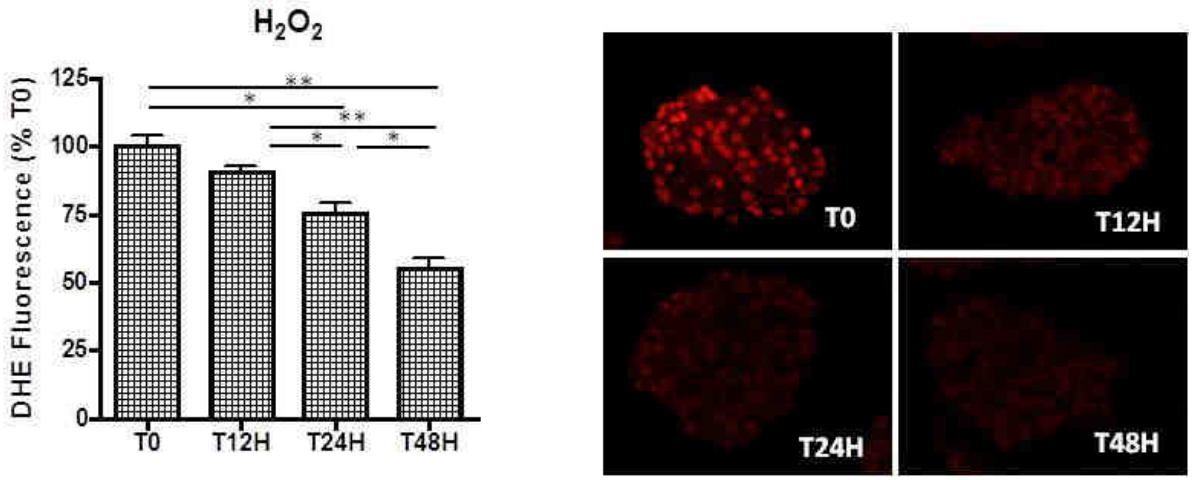


Figure 5-17.Quantification du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) produit par les îlots pancréatiques de Rat à l'aide d'une sonde de Dihydroéthidium (DHE) en présence de PEG-catalase.

Les îlots pancréatiques sont prélevés immédiatement ou après 12H, 24H, 48H de culture, congelés et coupés à 4 µm. Les résultats sont exprimés en valeur moyenne ± ESM de la fluorescence émise par la sonde DHE. Chaque expérience est effectuée trois fois de manière indépendante et pour chaque expérience les intensités de fluorescence sont mesurées à partir de 5 îlots pancréatiques différents mais présents sur la même coupe. **p<0,01 ; *p<0,05.
***p<0,05.**

Concernant la génération d'H_2O_2 (**Fig.4-17)**, les quantités produites sont croissantes en fonction du temps de culture. En effet, l'intensité de fluorescence émise par la DHE diminue au cours du temps. Immédiatement après isolement, la fluorescence émise par la DHE (100 % ± 4,4) diminue significativement (p<0,01) pour atteindre 55 % ± 4,2 après 48 heures de culture. Ces résultats suggèrent que le temps de culture induit la génération d'H_2O_2.

En résumé d'après le **tableau 4-1**, la quantité de ROS produites varie au cours du temps. La quantité d'O_2^- diminue après 12 H et se maintient jusqu'à 48 heures tandis que la quantité d'H_2O_2 augmente progressivement au cours du temps de culture. Ces résultats suggèrent que la source des ROS change au cours du temps, les anions superoxyde semblent jouer un rôle durant la période post-isolement et la génération de peroxyde d'hydrogène semble corréler avec la mise en culture des îlots.

	T0	T12H	T24H	T48H
ROS totales	100 %	↓ 76 %	↓↓ 59 %	↓ 73 %
O_2^-	100 %	- - -	- -	- -
H_2O_2	100 %	+	+ +	+ + +

Tableau 5-1. Résumé des variations (par rapport à T0) de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), d'anion superoxyde (O2-) et de peroxyde d'hydrogène (H2O2) par les îlots pancréatiques au cours du temps de culture.

L'étude du stress oxydant est complétée avec l'évaluation de la capacité anti-oxydante totale des îlots. Ces mesures s'effectuent par la méthode ABTS et permettent d'évaluer la libération d'entités anti-oxydantes dans le surnageant de culture des îlots pancréatiques.

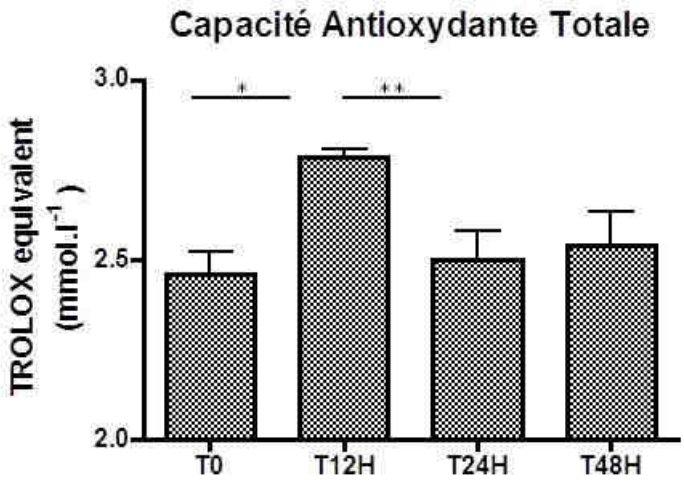


Figure 5-18. Evaluation de la capacité antioxydante totale de surnageants d'îlots pancréatiques de Rat par la méthode ABTS.

Les surnageants de culture d'îlots pancréatiques sont prélevés immédiatement ou après 12H, 24H, 48H de culture. Les résultats sont exprimés en valeur moyenne ± ESM par rapport à la gamme standard de TROLOX. Chaque expérience est effectuée trois fois de manière indépendante en doublet. **p<0,01, *p<0,05.

Ainsi, la quantité d'entités anti-oxydantes libérée par les îlots est maximale (2,8 mmol.l^{-1} ± 0,02) après 12 heures de culture (**Fig. 4-18**). La production d'entités anti-oxydantes est significativement plus grande que celle immédiatement après isolement (2,5 mmol.l^{-1} ± 0,06 ; p<0,05) ou après 24 heures de culture (2,5mmol.l^{-1} ± 0,07 ; p< 0,01).

5.1.1 Discussion : Les îlots sont pro-inflammatoires et pro-oxydants en culture

Cette première partie avait pour objectif de démontrer la mise en place d'un processus inflammatoire au cours de la culture des îlots pancréatiques. Pour ce faire, nous avons étudié plus particulièrement la voie des Toll-like récepteurs. En effet, une équipe a montré que l'échec de la greffe d'îlots peut être initié par TLR2 et TLR4 et suggèrent que la protéine HMGB1 (« high mobility group box-1» ; = ligand endogène des TLRs) pourrait contribuer à cette activation (Krüger, et al., 2010). Ces résultats ont été confortés une autre équipe qui a démontré que l'activation de TLR-4 participe à l'échec précoce de la transplantation d'îlots (Gao, et al., 2010). Ici, nous avons démontré que l'îlot était pro-inflammatoire en culture et que cette inflammation était à l'origine de l'activation des TLRs pendant les étapes d'isolement et de culture des îlots.

L'utilisation de PCR arrays a permis de réaliser un criblage de 84 gènes. Parmi tous les gènes criblés, nous avons mis en évidence l'activation variable d'effecteurs tels que *Nf-κb2*, *Cox-2*

et de médiateurs tels que *Ccl2*, *Il-6* et *Il-10*. Ces résultats préliminaires ont permis de valider l'implication de la voie des TLRs dans les îlots en culture (Vivot, et al., 2011).

Afin de valider ces données préliminaires, des études plus précises ont permis d'établir les profils d'activation et d'expression des gènes ciblés. Ainsi au cours du temps de culture, nous avons observé que l'activation et l'expression des gènes des récepteurs Tlr-2 et Tlr-4 varient au cours du temps. L'expression constitutive des récepteurs TLR-2 et TLR-4 par les îlots est déjà mentionnée dans la littérature (Krüger, et al., 2010; Goldberg, et al., 2007). Au delà de leur fonction immunitaire, les TLRs jouent un rôle essentiel dans l'homéostasie glucidique. En effet, plusieurs études suggèrent que les TLRs participent au maintien de la fonction et de la masse des cellules β (Hutton, et al., 2010; Bollyky, et al., 2009). Les TLRs, en particulier TLR2 et TLR4, sont également impliqués dans la pathogenèse du diabète de type 1, la dysfonction des cellules β du diabète de type 2, et le rejet allogénique de la greffe d'îlots (Wen, et al., 2004; Eguchi, et al., 2012; Goldberg, et al., 2007). Il convient donc de s'interroger sur le rôle de ces mêmes récepteurs dans la perte précoce des îlots *in vitro*. Les variations d'activation et d'expression des TLRs observées suggèrent l'implication de ces récepteurs après isolement et pendant le temps de culture. Néanmoins, afin de confirmer ces résultats, l'étude des effecteurs de la voie des TLRs est nécessaire.

Immédiatement après isolement, les gènes codant pour les effecteurs de la voie des TLRs (*Nf-κb2* et *Cox-2*) sont très faiblement activés. Toutefois, leur activation est maximale après 12 heures de culture et décroit progressivement avec le temps. L'activation de la voie de signalisation des TLRs se traduit par la régulation en aval de molécules qui aboutissent à l'expression des gènes *Nf-κB2*, *Cox-2* et la production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires. Dans notre étude, l'activation des gènes *Nfκb2* et *Cox-2* sont les témoins positifs de l'implication de la voie des TLRs. Cependant, la modulation de ces gènes au cours du temps suggère que l'activation des voies de signalisation se déroule dès les premiers instants en culture. En effet, d'après nos résultats, le pic d'activité de *Nfκb2* et de *Cox-2* se situe après 12 heures de culture. Ces données sont en adéquation avec les résultats de la littérature. En effet, une étude a démontré que le maintien des îlots de souris en culture induit l'activation de *Cox-2* comparé à des îlots fraîchement isolés (Persaud, et al., 2004). De la même manière, le rôle central de NF-κB dans la médiation de la réponse inflammatoire des îlots *in vitro* a clairement été établi (Negi, et al., 2012). De plus, les profils d'activation et d'expression des médiateurs de l'inflammation tels qu'Il-6 et Ccl-2 suivent la même tendance. La production et la sécrétion de CCL2 par les îlots pancréatiques humains sont bien connues (Piemonti, et al., 2002). Chez la souris et l'homme, CCL2 est associé à la sécrétion d'autres

cytokines/chimiokines pro-inflammatoires telles que IL-6, CXCL8 et CXCL1 (Melzi, et al., 2010).

A l'inverse, HO-1 et IL-10 qui exercent une activité anti-inflammatoire ont des profils opposés confortant l'hypothèse de l'activation précoce des voies pro-inflammatoires en culture. En effet, le gène *Ho-1* est progressivement activé et exprimé au cours du temps. Bien qu'IL-10 soit indétectable dans le milieu de culture avant 24 heures, son expression semble également augmenter avec le temps. La faible production d'IL-10 durant les 48 heures de culture observée par une autre équipe est en accord avec nos résultats (Johansson, et al., 2003). En outre, les données obtenues pour l'expression de HO-1 par l'ilot sont en adéquation avec les résultats d'une autre étude (Pileggi, et al., 2001).

Au-delà de l'activation des effecteurs et des médiateurs de l'inflammation, cette étude permet d'intégrer ensemble les évènements inflammatoires se déroulant au cours du temps de culture des îlots. Pour la première fois, l'ensemble de ces données met en évidence le déroulement de la réponse inflammatoire des îlots *in vitro*. Plus précisément, nos résultats suggèrent la mise en place d'une réponse TLR-dépendante *in vitro* dont le pic d'activation semble culminer après 12 heures après l'isolement. Pour contrecarrer les effets délétères de la réponse pro-inflammatoire, l'îlot semble déclencher sa défense anti-inflammatoire plus tardivement, avec notamment la production et la sécrétion d'IL-10 et de HO-1 24 heures après isolement.

Etant donné que la réponse inflammatoire induit la production de ROS et inversement la production de ROS peut également induire une réponse inflammatoire, nous avons étudié la production de ROS au cours du temps de culture. Nous avons ainsi observé que la production de ROS est maximale immédiatement après isolement et varie au cours du temps. En revanche, le phénotypage des ROS indique que la source des ROS change au cours du temps. Ainsi, la quantité d'O_2^- est maximale immédiatement après isolement, diminue rapidement après 12 heures de culture pour augmenter de manière limitée. La production élevée d'O_2^- observée après isolement pourrait être à l'origine de l'activation de *Cox-2* 12 heures après isolement. En effet, des chercheurs ont mis en évidence que l'augmentation de la production de ROS mitochondriales induit l'activation de *NF-κB* qui conduit à son tour à l'activation et l'expression de Cox-2 (Kiritoshi, et al., 2003). Quant à la production d'H_2O_2, elle ne cesse d'augmenter avec le temps. Ces résultats sont associés à une capacité antioxydante totale qui est maximale après 12 heures de culture. Les résultats obtenus avec la quantification des ROS sont en adéquation avec d'autres travaux qui ont utilisé la production de ROS par les îlots comme marqueur de la fonctionnalité des îlots *in vitro* (Armann, et al., 2007). De la même manière, il a été démontré que l'usage de MnTMPyP (analogue perméant membranaire de la

superoxyde dismutase) améliore la viabilité des îlots humains exposés à un stress oxydant *in vitro* (Moriscot, et al., 2007). Ainsi, comme le démontre ces 2 études, les ROS sont largement impliqués dans le contexte de la transplantation d'îlots pancréatiques. Par contre, contrairement à une autre équipe qui a observé une peroxydation des lipides après 24 heures de culture (Armann, et al., 2007), nous n'avons pas mis en évidence de peroxydation lipidique (résultats non montrés) au cours de notre étude, mais le phénotypage de source des ROS produites et sa variation au cours du temps semblent être corrélés avec la mise en place de la réponse inflammatoire.

Ainsi, ces résultats démontrent la mise en place d'un processus pro-inflammatoire et pro-oxydant par l'îlot après isolement et au cours du temps de culture défavorisant le succès de la transplantation.

L'ensemble de ces données indique qu'il existe une modulation des voies pro-inflammatoires et pro-oxydantes pendant la culture des îlots pancréatiques. Une étude plus précise de ces voies avec l'usage d'inhibiteurs et d'activateurs des différentes cibles préalablement sélectionnées devrait permettre de comprendre et de préciser le rôle de ces médiateurs de l'inflammation.

5.2 Evaluation du rôle des TLRs dans ce processus inflammatoire *in vitro*

- **Le CoPP induit l'activation et l'expression de Ho-1**

Suite aux résultats obtenus et pour reproduire au mieux les conditions pré-cliniques de la transplantation, nous avons fait le choix de travailler sur un seul temps de culture d'îlots (24 heures). D'autre part, afin de simplifier les analyses, nous n'étudierons plus que l'activation génique des voies de signalisation identifiées précédemment (TLRs, NF-κB2, COX-2 et HO-1). Les médiateurs de l'inflammation tels que l'IL-6, IL-10 et CCL2 seront quant à eux analysés par qPCR et ELISA.

Dans une première étape, le modèle d'activation de *Ho-1* par la protoporphyrine XI de cobalt (CoPP) a été mis en place. Ainsi, nous avons réalisé une gamme de concentration de CoPP et étudié l'activation génique et l'expression protéique du gène *Ho-1* sur une lignée de cellule β, les cellules RINm5f (**Fig. 4-19**).

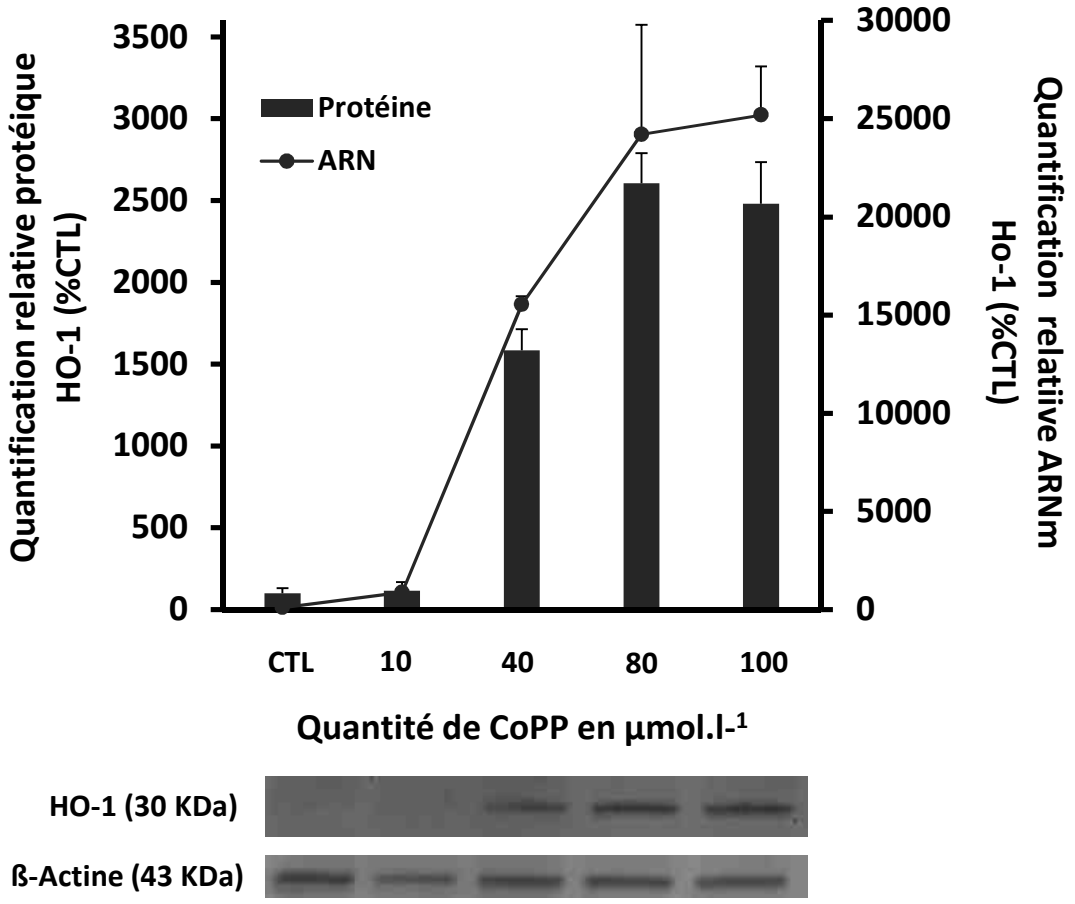


Figure 5-19. Quantification de l'activation génique (qPCR) et de l'expression protéique (Western Blot) de HO-1 induites par la protoporphyrine de Cobalt (CoPP) dans des cellules RINm5f.

Les protéines et les ARNm de cellules RINm5f sont extraits après 24H de culture en présence de différentes concentrations de CoPP. L'expression protéique, exprimée par rapport au ratio HO-1 / ACTINE, et l'activation génique relative de Ho-1 sont reportées selon la valeur moyenne ± ESM de la quantité d'ARNm. Chaque expérience est effectuée au moins trois fois de manière indépendante (en doublet pour la qPCR).

Nous avons observé que CoPP à 10 µmol.l^{-1} n'avait pas d'effet sur l'activation et l'expression de HO-1 après 24 heures de culture. HO-1 est activé à partir de 40 µmol.l^{-1} de CoPP avec un effet plateau entre 80 et 100 µmol.l^{-1}. Ces résultats sont associés à une absence de toxicité (vérifiée par une mesure de l'activité mitochondriale ; résultats non montrés). Ainsi, nous avons choisi d'utiliser le CoPP à 100 µmol.l^{-1} afin d'induire une activation et une expression du gène *Ho-1* optimale.

- **Ho-1, Cox-2 et Nfκb2 sont impliqués dans ce processus inflammatoire**

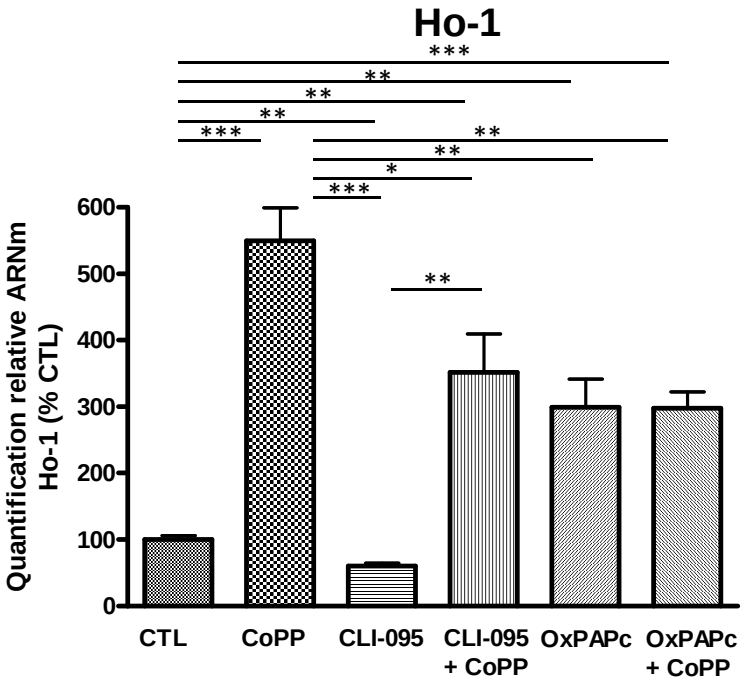


Figure 5-20. Quantification relative de l'ARNm transcrit du gène *Ho-1* à partir d'extraits d'îlots pancréatiques de Rat par qPCR.

Les îlots pancréatiques sont traités pendant 24H avec de la protoporphyrrine de Cobalt (CoPP) ou CLI-095 ou OxPAPc. Suivant les conditions, CoPP est associé ou non sous forme d'un co-traitement (CLI-095 + CoPP; OxPAPc + CoPP). Les îlots pancréatiques non traités sont considérés comme contrôles (CTL). Les résultats sont exprimés selon le pourcentage de la valeur moyenne ± ESM de la quantité d'ARNm par rapport au CTL. Chaque expérience est effectuée au moins trois fois de manière indépendante en doublet. ***p<0,001 ; **p<0,01 ; *p<0,05.

D'après la **figure 4-20,** CoPP induit une activation significative du gène *Ho-1* (549 % ± 49,2 ; p<0,001) par rapport aux conditions contrôles (100 % ± 5,9). Ces résultats confirment le rôle activateur de CoPP sur Ho-1 dans l'îlot (contrôle positif). CLI-095 induit une inhibition significative (60,63 % ± 3,8 ; p<0,01) du gène *Ho-1*, tandis que OxPAPc induit une activation significative (299,1 % ± 42,5 ; p<0,01) de *Ho-1* par rapport aux conditions contrôles. Le pourcentage d'activation du gène Ho-1 augmente significativement après traitement avec CLI-095 + CoPP (351,6 % ± 57,9 ; P<0,01) ou OxPAPc + CoPP (297,6 % ± 24,8 ; p<0,001) par rapport aux conditions contrôles. Toutefois, cette activation n'atteint pas celle induite par CoPP seul.

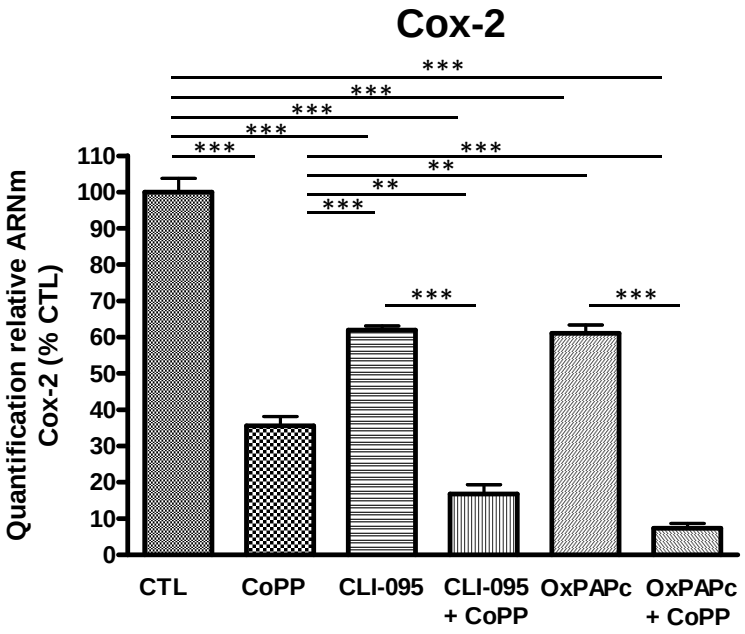


Figure 5-21. Quantification relative de l'ARNm transcrit du gène *Cox-2* à partir d'extraits d'îlots pancréatiques de Rat par qPCR.

Les îlots pancréatiques sont traités pendant 24H avec de la protoporphyrrine de Cobalt (CoPP) ou CLI-095 ou OxPAPc. Suivant les conditions, CoPP est associé ou non sous forme d'un co-traitement (CLI-095 + CoPP; OxPAPc + CoPP). Les îlots pancréatiques non traités sont considérés comme contrôles (CTL). Les résultats sont exprimés selon le pourcentage de la valeur moyenne ± ESM de la quantité d'ARNm par rapport au CTL. Chaque expérience est effectuée au moins trois fois de manière indépendante en doublet. ***p<0,001, **p<0,01.

L'activation du gène *Cox-2* (**fig.4-21)** est inhibée par le traitement avec CoPP (35,5 % ± 2,6 ; p<0,001), CLI-095 (61,9 % ± 1,1 ; p<0,001) ou OxPAPc (61,1 % ± 2,2 ; p<0,001) par rapport aux conditions contrôles sans traitement (100 % ± 3,7). Cette inhibition est amplifiée par les co-traitements CoPP + CLI-095 ou CoPP + OxPAPc. Le pourcentage d'activation du gène *Cox-2* est significativement diminué après traitement avec CoPP + CLI-095 (16,8 % ± 2,5 ; p<0,001) ou CoPP + OxPAPc (7,4 % ± 1,3 ; p< 0,001) par rapport aux conditions contrôles sans traitement.

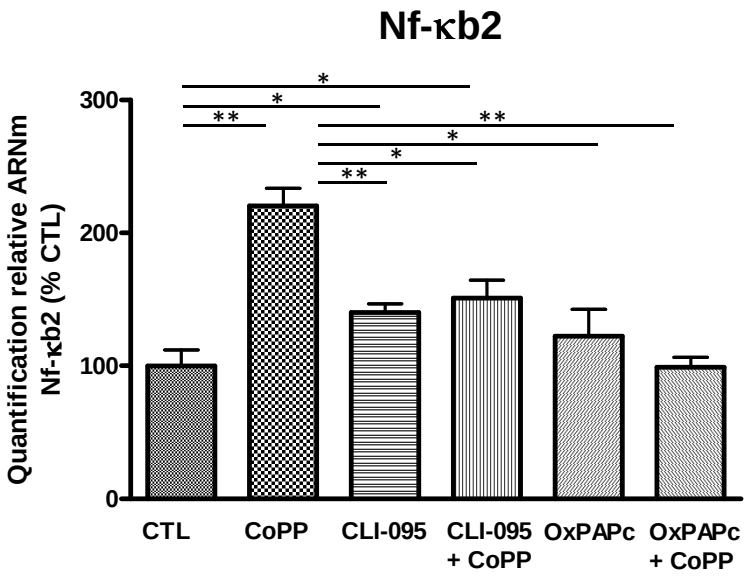


Figure 5-22. Quantification relative de l'ARNm transcrit du gène *Nf-κb2* à partir d'extraits d'îlots pancréatiques de Rat par qPCR.

Les îlots pancréatiques sont traités pendant 24H avec de la protoporphyrrine de Cobalt (CoPP) ou CLI-095 ou (B) OxPAPc. Suivant les conditions, CoPP est associé ou non sous forme d'un co-traitement (CLI-095 + CoPP; OxPAPc + CoPP). Les îlots pancréatiques non traités sont considérés comme contrôles (CTL). Les résultats sont exprimés selon le pourcentage de la valeur moyenne ± ESM de la quantité d'ARNm par rapport au CTL. Chaque expérience est effectuée au moins trois fois de manière indépendante en doublet. ***p<0,001 ; **p<0,01 ; *p<0,05.

L'étude de *Nf-κB2* (**fig.4-22)** montre une activation du gène par le traitement avec CoPP (220,3 % ± 13,41; p<0,001) par rapport aux conditions contrôles sans traitement (100 % ± 12.1). De la même manière, les traitements avec CLI-095 et OxPAPc induisent son activation (140,3 % ± 6,4 ; p<0,05 et 122,2 % ± 20,42 respectivement) par rapport aux conditions contrôles. Par contre, l'activation de *Nf-κB2* est plus importante après co-traitement avec CLI-095 + CoPP (150,9 % ± 13,7 ; p<0,05), tandis que l'activation de *Nf-κB2* en présence de OxPAPc + CoPP est équivalente (98,98 % ± 7,6) par rapport aux traitements avec CLI-095 ou OxPAPc.

- **Seule l'activation du gène Tlr-4 est influencée par l'induction de HO-1 ou l'inhibition des TLRs**

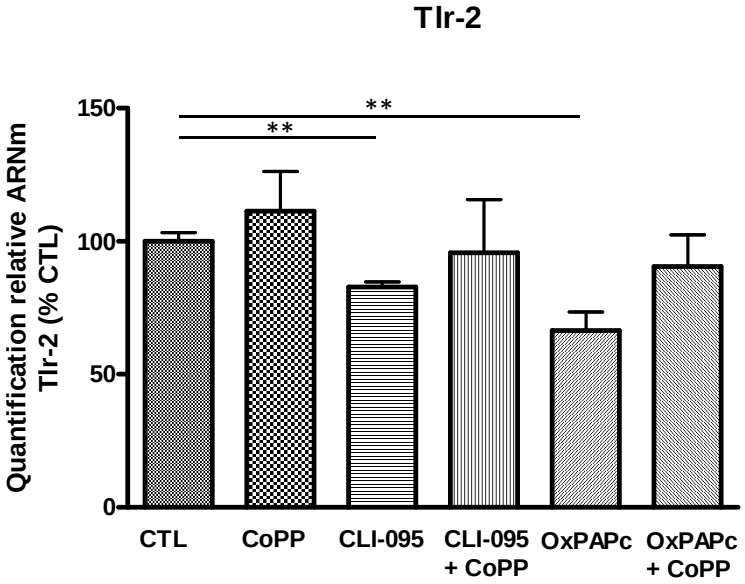


Figure 5-23. Quantification relative de l'ARNm transcrit du gène Tlr-2 à partir d'extraits d'îlots pancréatiques de Rat par qPCR.

Les îlots pancréatiques sont traités pendant 24H avec de la protoporphyrrine de Cobalt (CoPP) ou CLI-095 ou OxPAPc. Suivant les conditions CoPP est associé ou non sous forme d'un co-traitement (CLI-095 + CoPP; OxPAPc + CoPP). Les îlots pancréatiques non traités sont considérés comme contrôles (CTL). Les résultats sont exprimés selon le pourcentage de la valeur moyenne ± ESM de la quantité d'ARNm par rapport au CTL. Chaque expérience est effectuée au moins trois fois de manière indépendante en doublet.p<0,01 .**

D'après la **figure 4-23**, le traitement avec CoPP n'influence pas l'activation du gène *Tlr-2*. L'activation du gène *Tlr-2* n'augmente pas significativement après l'induction de *Ho-1* (111, 3 % ± 15) par rapport aux conditions contrôles (100 % ±3,2). Toutefois, l'utilisation de CLI-095 ou OxPAPc diminue significativement l'expression génique de *Tlr-2*. L'inhibition des voies de signalisation TLR-4 dépendantes (CLI-095) ou celles induites par TLR-4 et TLR2 (OxPAPc), diminue significativement l'activation du gène *Tlr-2* (82,9 % ± 1,8 (p<0,01), et 70,4% ± 6,9 (p<0,01) respectivement) par rapport aux contrôles (100 % ± 3,2). Toutefois, cette inhibition n'est pas retrouvée lors d'un co-traitement avec l'activateur de *Ho-1*.

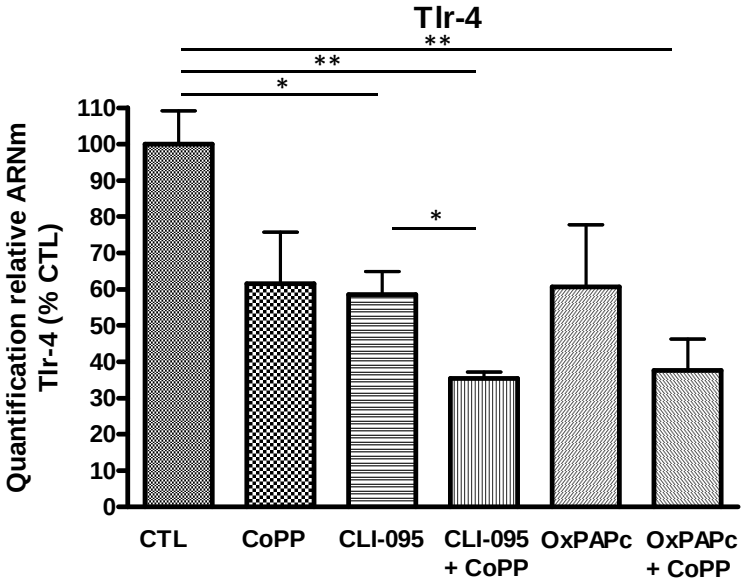


Figure 5-24. Quantification relative de l'ARNm transcrit du gène *Tlr-4* à partir d'extraits d'îlots pancréatiques de Rat par qPCR.

Les îlots pancréatiques sont traités pendant 24H avec (A et B) de la protoporphyrine de Cobalt (CoPP) ou (A) CLI-095 ou (B) OxPAPc. Suivant les conditions CoPP est associé ou non sous forme d'un co-traitement ((A) CLI-095 + CoPP; (B) OxPAPc + CoPP). Les îlots pancréatiques non traités sont considérés comme contrôles (CTL). Les résultats sont exprimés selon le pourcentage de la valeur moyenne ± ESM de la quantité d'ARN par rapport au CTL. Chaque expérience est effectuée au moins trois fois de manière indépendante en doublet.p<0,01 ; *p<0,05.**

L'activation du gène *Tlr-4* (**fig.4-24)** est inhibée par l'induction d'HO-1 ou par l'inhibition des TLRs. Le pourcentage d'activation du gène *Tlr-4* ne diminue pas significativement après traitement avec CoPP (61,5 % ± 14,2) par rapport aux conditions contrôles sans traitement (100 % ± 9,2). En revanche, les traitements avec CLI-095 (58,5 % ± 6,4 ; p<0,05) ou OxPAPc (60,7 % ± 17,1) induisent une diminution significative de l'activation de *Tlr-4* par rapport au contrôles. Cette inhibition est significativement accentuée lors d'un co-traitement avec l'activateur de *Ho-1*. Le pourcentage d'activation du gène *Tlr-4* diminue et atteint 35,4 % ± 1,9 (p<0,01) après traitement avec CLI-095 + CoPP ou 37,6 % ± 8,7 (P< 0,01) avec OxPAPc + CoPP par rapport aux conditions contrôles sans traitement.

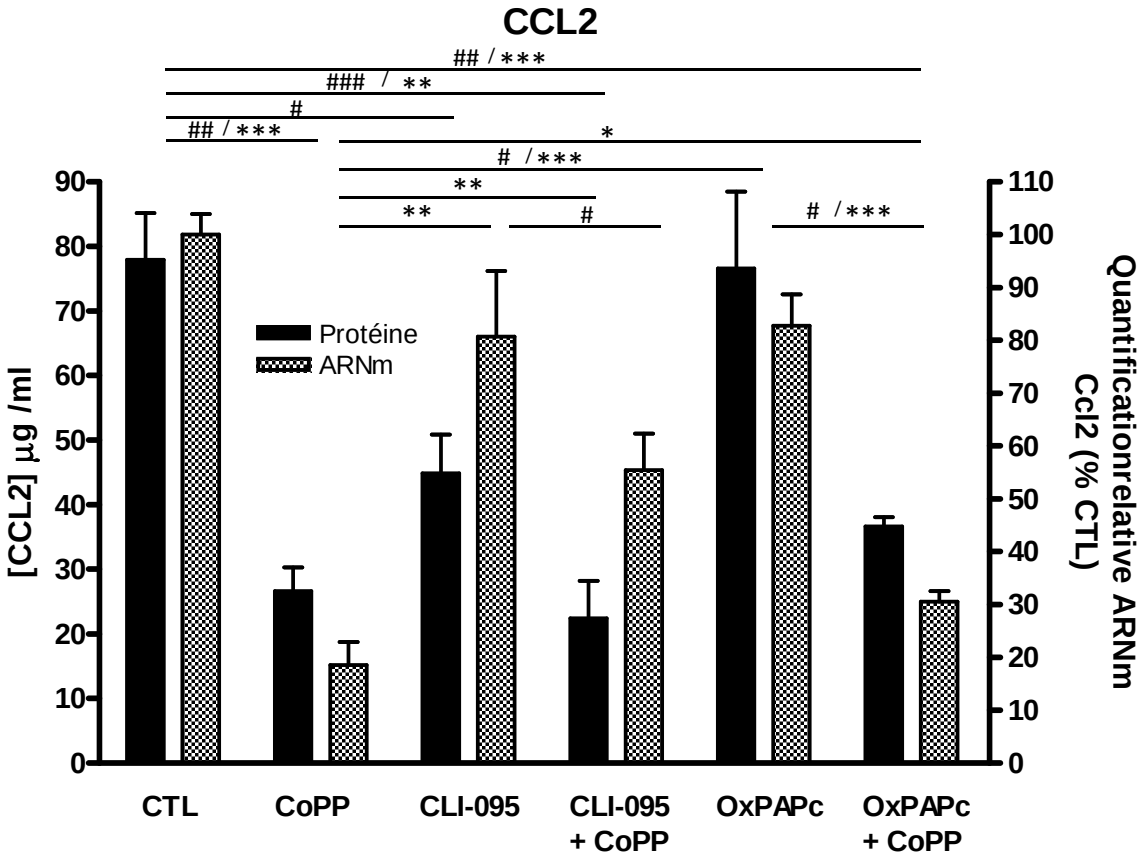


Figure 5-25. Quantification relative de l'ARNm transcrit du gène *Ccl2* et de la sécrétion de CCL2 d'îlots pancréatiques de Rat par qPCR et ELISA.

Les îlots pancréatiques sont traités pendant 24H avec de la protoporphyrrine de Cobalt (CoPP) ou CLI-095 ou OxPAPc. Suivant les conditions CoPP est associé ou non sous forme d'un co-traitement (CLI-095 + CoPP; OxPAPc + CoPP). Les îlots pancréatiques non traités sont considérés comme contrôle (CTL). Pour l'activation génique, les résultats sont exprimés selon le pourcentage de la valeur moyenne ± ESM de la quantité d'ARNm par rapport à la condition CTL. Chaque expérience est effectuée au moins trois fois de manière indépendante en doublet ***p<0,001 ; *p<0,01 , *p<0,05. Pour l'expression protéique, les résultats sont exprimés selon la quantité de protéine en pg/ml. Chaque expérience est effectuée au moins trois fois de manière indépendante. ###p<0,001 ; ## p<0,01 ; # p<0,05

D'après la **figure 4-25**, l'activation et l'expression du gène *Ccl2* sont significativement inhibées par l'induction de Ho-1. Après traitement avec CoPP, l'activation de *Ccl2* est inhibée (18,6 % ± 4,3 ; p<0,001) par rapport aux conditions contrôles sans traitement (100 % ± 3,8). L'induction de HO-1 inhibe également l'expression des protéines CCL2 (26,6 µg / ml ± 3,7 ; p<0,01) par rapport aux conditions contrôles (77,9 µg / ml ± 7,2). De plus, l'inhibition des voies de signalisation TLR-4 dépendantes (CLI-095) induit une inhibition de l'expression des protéines CCL2 (48 µg / ml ± 8,3, p<0,05) par rapport aux contrôles. L'inhibition des voies de signalisation TLR-4 et TLR-2 dépendantes par OxPAPc a très peu d'effet sur l'activation et l'expression de CCL2 par rapport aux conditions contrôles.

L'activation relative de *Ccl2* est diminuée après l'inhibition des voies de signalisation TLR-4 dépendante et l'induction de Ho-1 (CLI-095 + CoPP) (55,42 % ± 6,95 ; p<0,01) par rapport aux conditions contrôles sans traitement (100 % ± 3,85). L'inhibition des voies de signalisation TLR-4 et TLR-2 dépendantes et l'induction concomitante de *Ho-1* (OxPAPc + CoPP) (28,59 % ± 2 ; P< 0,001) conduit également à cette inhibition.

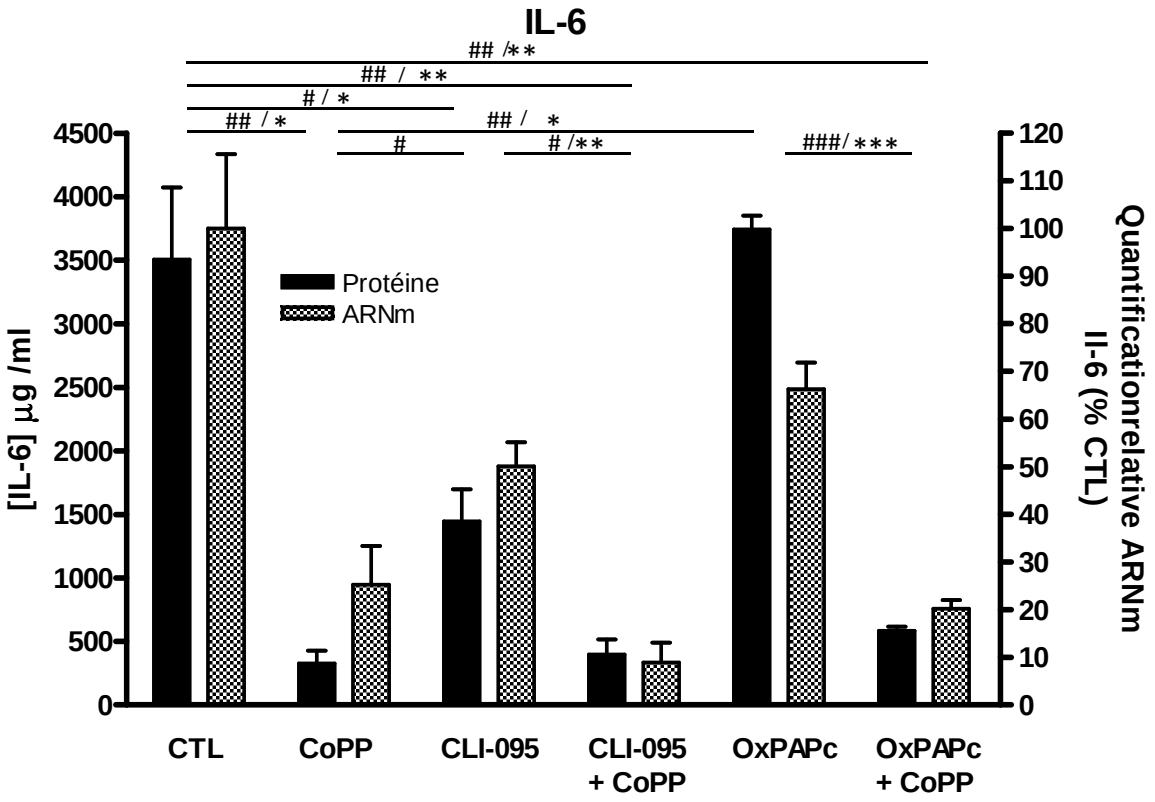


Figure 5-26.Quantification de l'expression relative génique et de la la sécrétion d'Il-6 à partir d'extraits d'îlots pancréatiques de Rat par qPCR et ELISA.

Les îlots pancréatiques sont traités pendant 24H avec de la protoporphyrrine de Cobalt (CoPP) ou CLI-095 ou OxPAPc. Suivant les conditions CoPP est associé ou non sous forme d'un co-traitement (CLI-095 + CoPP; OxPAPc + CoPP). Les îlots pancréatiques non traités sont considérés comme contrôles (CTL). Pour l'activation génique, les résultats sont exprimés selon le pourcentage de la valeur moyenne ± ESM de la quantité d'ARNm par rapport à la condition CTL. Chaque expérience est effectuée au moins trois fois de manière indépendante en doublet ***p<0,001 ; *p<0,01 , *p<0,05. Pour l'expression protéique, la quantité de protéine est exprimée en pg/ml. Chaque expérience est effectuée au moins trois fois de manière indépendante. ## p<0,01 ; # p<0,05.

D'après la **figure 4-26**, l'activation et l'expression d'Il-6 sont comparables avec celles de Ccl2. Après traitement avec CoPP, l'activation d'*Il-6* est inhibée (25,3 % ± 8,1 ; p< 0,05) par rapport aux conditions contrôles sans traitement (100 % ± 3,8 et 100 % ± 8,1). L'induction de *Ho-1* inhibe également l'expression d'IL-6 (410,7 pg/ml ±109, 8 ; p<0,01) par rapport aux conditions contrôles (77,9 µg / ml ± 7,2 et 3504,3 pg/ml ± 570 respectivement). De plus,

l'inhibition des voies de signalisation TLR-4 dépendantes (CLI-095) induit une inhibition de l'expression d'IL-6 (1446,7 pg / ml ± 249,3 ; p<0,05) par rapport aux contrôles. L'inhibition des voies de signalisation TLR-4 et TLR-2 dépendantes par OxPAPc n'a pas d'effet sur l'activation et l'expression d'Il-6 par rapport aux conditions contrôles. En revanche, les co-traitements diminuent significativement l'activation d'*Il-6* par rapport aux conditions contrôles sans traitement (100 % ± 3,85) soit 8,9 % ± 4,1 (p<0,01) avec CLI-095 + CoPP ou 20,2 % ± 1,8 (P< 0,01) avec OxPAPc + CoPP. Cependant, cette inhibition est plus faible que celle induite par CoPP seul.

- **L'induction de Ho-1 et l'inhibition des TLRs diminuent la production de ROS**

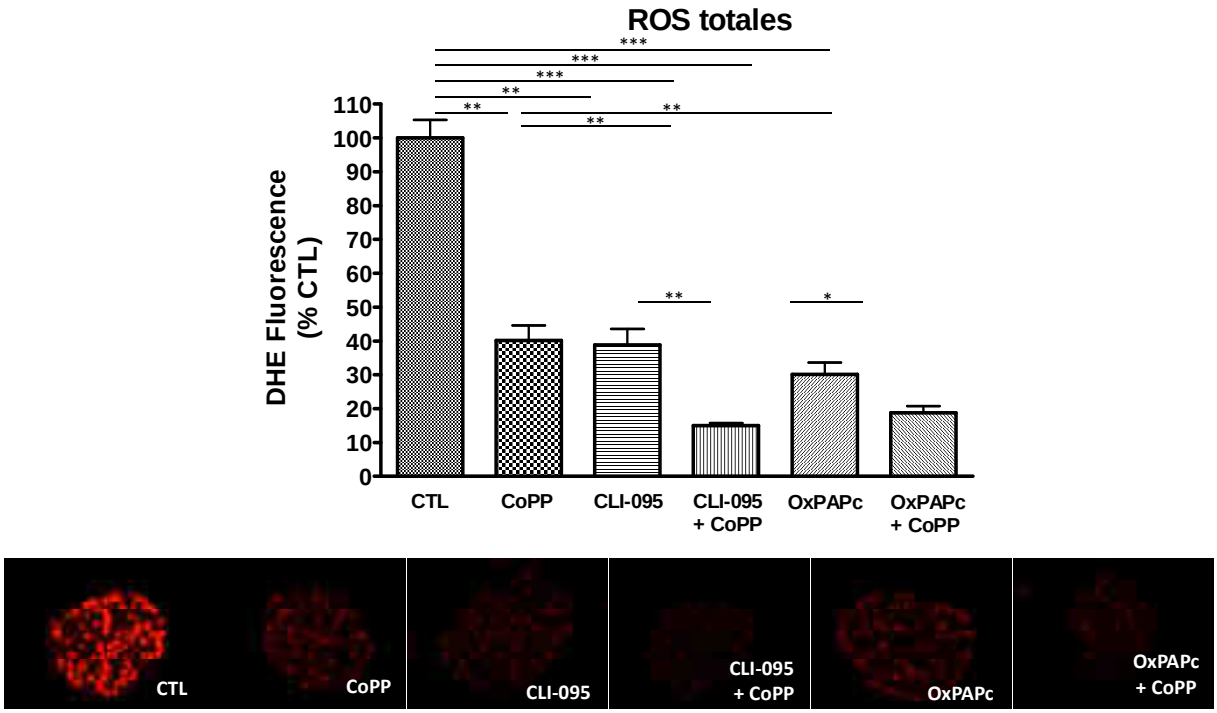


Figure 5-27. Quantification des espèces réactives de l'oxygène (ROS) produites par les îlots pancréatiques de Rat à l'aide d'une sonde de Dihydroéthidium (DHE) après traitement.

Les îlots pancréatiques sont traités pendant 24H avec de la protoporphyrrine de Cobalt (CoPP) ou CLI-095 ou OxPAPc. Suivant les conditions CoPP est associé ou non sous forme d'un co-traitement ((A) CLI-095 + CoPP; OxPAPc + CoPP). Les îlots pancréatiques non traités sont considérés comme contrôles (CTL). Les résultats sont exprimés en valeur moyenne ± ESM de la fluorescence émise par la sonde DHE. Chaque expérience est effectuée de manière indépendante avec au moins trois lames différentes et pour chaque expérience les intensités de fluorescence sont mesurées à partir de 5 îlots pancréatiques différents. ***p<0,001, **p<0,01.

L'induction de *Ho-1* (CoPP) inhibe la production de ROS (40,14 % ± 4,49 ; p<0,01) (**fig.4-27)**. L'inhibition des voies de signalisation TLR-4 dépendantes (CLI-095) ou l'inhibition des voies de signalisation TLR-4 et TLR-2 dépendantes (OxPAPc) induit une diminution

significative (38,83 % ± 4,8 (p<0,01) ; 30,14 % ± 2,25 (p<0,001) respectivement) de la quantité de ROS par rapport aux conditions contrôles sans traitement (100 % ± 5,4). Cette inhibition est amplifiée après co-traitements CLI-95 + CoPP (15 % ± 0,88 ; p<0,001) ou OxPAPc + CoPP (18,74 % ± 2,04 ; P< 0,001) par rapport aux conditions contrôles sans traitement.

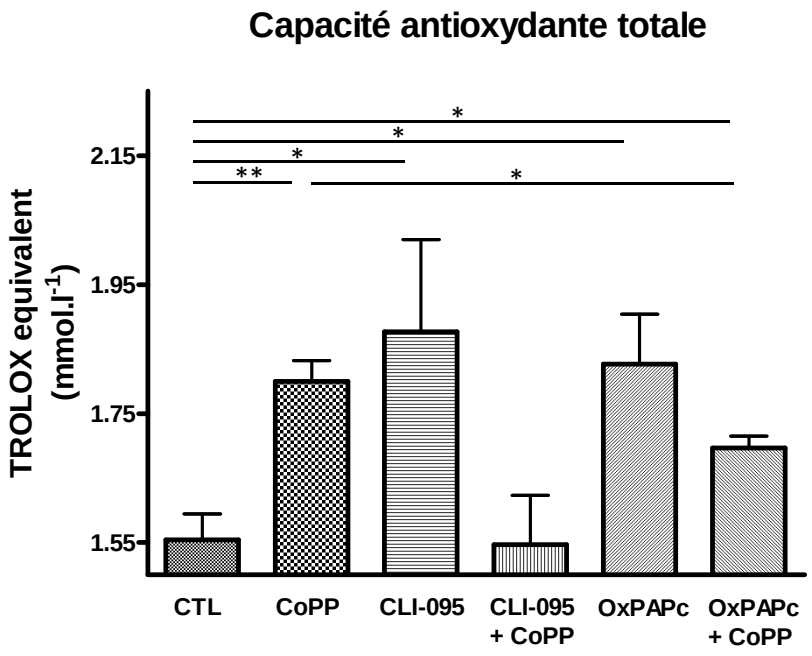


Figure 5-28. Evaluation de la capacité antioxydante totale de surnageants d'îlots pancréatiques de Rat par la méthode ABTS.

Les surnageants de culture d'îlots pancréatiques sont prélevés après 24H de culture. Au préalable, les îlots pancréatiques sont traités pendant 24H avec de la protoporphyrine de Cobalt (CoPP) ou CLI-095 ou OxPAPc. Suivant les conditions CoPP est associé ou non sous forme d'un co-traitement ((A) CLI-095 + CoPP; (B) OxPAPc + CoPP). Les résultats sont exprimés en mmol.l^{-1} de TROLOX équivalent selon la valeur moyenne ± ESM par rapport à la gamme standard de TROLOX. Chaque expérience est effectuée au moins trois fois de manière indépendante en doublet. **p<0,01, *p<0,05.

D'après la **figure 4-28**, la production d'entités anti-oxydantes par les îlots est augmentée en présence de CoPP (1,80 mmol.l^{-1} ± 0,03 ; p<0,01), de CLI-095 (1,74 mmol.l^{-1} ± 0,14 ; p<0,05) et de OxPAPc (1,852 mmol.l^{-1} ± 0,07 ; p<0,05) par rapport aux contrôles (1,55 mmol.l^{-1} ± 0,04). La production d'entités anti-oxydantes est équivalente aux contrôles en présence de CLI-95 + CoPP (1,55 mmol.l^{-1} ± 0,07). Toutefois, en présence d'OxPAPc + CoPP, la production d'entités anti-oxydantes est significativement augmentée (1,61 mmol.l^{-1} ± 0,01 ; p< 0,05) par rapport aux conditions contrôles sans traitement.

5.2.1 Discussion : Implication de la voie des TLRs

L'objectif de cette deuxième partie est de confirmer l'implication de la voie des TLRs dans le processus inflammatoire initié *in vitro* par les îlots. Par son interaction reconnue avec la voie des TLRs (Shih & Yang, 2010; Goldberg, et al., 2007), HO-1 est également une cible à privilégier. Ainsi, le deuxième objectif de cette partie est de démontrer l'intérêt de cibler conjointement HO-1 et les TLRs pour prévenir ou limiter la réponse inflammatoire *in vitro*.
Nous avons démontré que l'activation de HO-1 par CoPP (**Fig. 4-29A)** induit l'activation de *Nf-κb2* et que l'effet inverse est observé avec l'inhibiteur de TLR-4, CLI-095, (**Fig. 4-29B**) tandis qu'aucun effet n'est observé avec l'inhibiteur de TLR-4 et TLR-2, OxPAPc (**Fig. 4-29C**). D'autres études ont déjà montré que l'activation de *NF-κB* peut être diminuée par HO-1 (Tsoyi, et al., 2008), CLI-095 (Seki, et al., 2010) et OxPAPc (Eligini, et al., 2002).

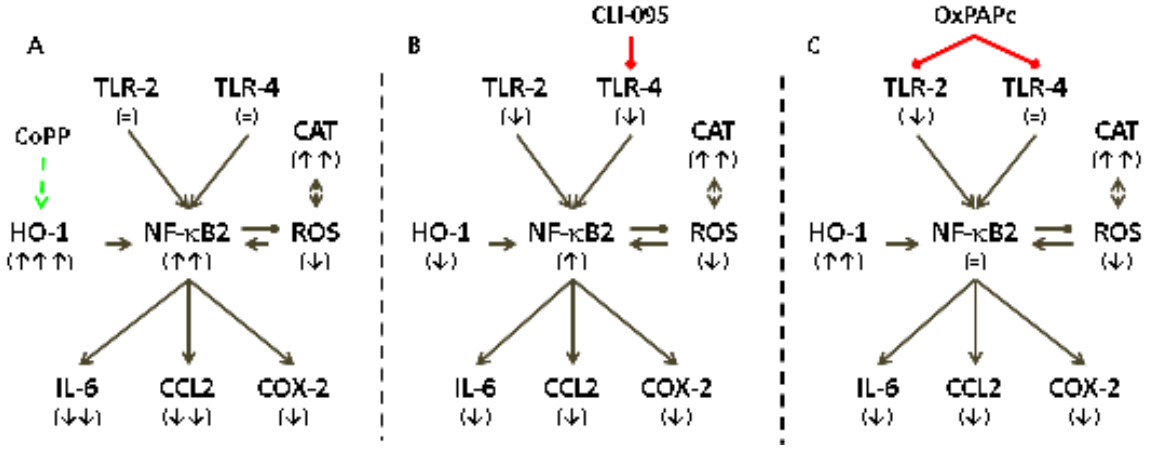


Figure 5-29. Schéma des effets induits par les différentes molécules utilisées

(A) CoPP (Activateur de l'Hème oxygénase-1) ; (B) CLI-095 (Inhibiteur de TLR-4) ; (C) OxPAPc (Inhibiteur de TLR-2 et -4)

Comme pour la plupart des familles de facteurs de transcription, chez les mammifères la famille NF-κB a de nombreux membres. Ils comprennent RELA (p65), NF-κB1 (p50; p105), NF-κB2 (p52; p100), c-REL et RELB (Li & al, 2002). Ces protéines ont une région amino-terminale structurellement conservée de 300 acides aminés, qui contient les domaines de dimérisation, de localisation nucléaire et de liaison à l'ADN.

Plus particulièrement les protéines NF-κB1 et NF-κB2 sont produites sous forme de protéines précurseurs, NF-κB1 p105 et NF-κB2 p100 respectivement. Celles-ci sont clivées par le protéasome afin de produire les facteurs de transcription matures NF-κB1 p50 et NF-κB2 P52 kappaB2. En outre, p105 et p100 sont connus pour fonctionner comme IκBs (inhibiteurs de NF-kB), qui retiennent les sous-unités associées de NF-κB dans le cytoplasme des cellules

non stimulées (Beinke & Ley, 2004). Ainsi, nos résultats suggèrent que l'activation de NF-κB2 observée en présence de CoPP pourrait exercer un effet inhibiteur sur l'activation de NF-κB via p100. Toutefois, OxPAPc ne semble pas interagir avec NF-κB2.

NF-κB est un médiateur important de la voie des TLRs. Quelque soit l'adaptateur recruté, la cascade de signalisation conduit à l'activation de NF-κB. Bien que NF-κB soit un facteur de transcription essentiel pour l'activation de nombreux gènes, il n'agit pas de façon isolé mais en tant que composant d'une série complexe d'événements moléculaires nécessaires pour la transcription de gènes. NF-κB interagit avec un certain nombre de facteurs de transcription, y compris C/ EBP, l'AP-1, Sp-1, LSR, STAT6 et SEF (Carmody & Chen, 2007). Ainsi, NF-kB est clairement l'un des régulateurs les plus importants de l'activation des gènes pro-inflammatoires. Par conséquent, la synthèse de cytokines, telles que TNF-α, IL-1β, IL-6, et IL-8, est médiée par NF-κB comme l'expression de COX-2 (Tak & Firestein, 2001).

D'ailleurs, nous avons également observé une inhibition de la sécrétion d'IL-6 et de CCL2, une inhibition de l'activation du gène *Cox-2* après induction d'HO-1 avec CoPP ou le traitement des îlots avec les inhibiteurs des TLRs. Les inhibitions s'accompagnent d'une diminution de la production de ROS et d'une augmentation de la capacité antioxydante totale (**Fig. 4-29**). Nos résultats sont en adéquation avec la littérature qui confirme les effets anti-inflammatoires de CoPP (Roach, et al., 2009; Shih & Yang, 2010), de CLI-095 (Yamada, et al., 2008; Küper, et al., 2012; Aye, et al., 2012), et de OxPAPc (Aye, et al., 2012; Eligini, et al., 2002). Toutefois, l'action inhibitrice de CLI-095 sur *Ho-1* n'est pas relatée dans la littérature, mais cette donnée suggère une véritable régulation entre HO-1 et TLR-4.

D'après nos résultats, les effets induits par CoPP, CLI-095 et OxPAPc se caractérisent par une activité anti-inflammatoire et anti-oxydante. Il faut tout de même noter que les effets anti-inflammatoires semblent plus importants avec CoPP par rapport à ceux induits des inhibiteurs des TLRs. En revanche, les effets anti-oxydants sont équivalents quelle que soit la molécule utilisée. Ainsi, ces données suggèrent une interaction évidente entre l'inflammation et le stress oxydant dans ce processus.

Par ailleurs, la régulation de l'activité NF-κB n'est pas exclusive à la voie des TLRs. Non seulement les ROS sont capables d'activer NF-κB, mais il existe un lien de réciprocité entre les ROS et NF-κB. Ce dernier exerce un véritable rôle de régulateur négatif de l'activité oxydante induite en réponse au stress et aux cytokines (Bubici, et al., 2006). Ainsi, l'activation de *Nf-κb2* et la production diminuée des ROS pourraient être le reflet de ce processus anti-inflammatoire et anti-oxydant. En revanche, la diminution de l'activation de *Cox-2*, la réduction de la production d'IL-6, de CCL-2 mettent irréfutablement en évidence

l'activité anti-inflammatoire des molécules utilisées. En outre, nos résultats justifient le ciblage de cette voie de signalisation pour prévenir le développement du processus inflammatoire dans l'îlot *in vitro*.

D'autre part, nous avons démontré que l'activation de *Ho-1* et l'inhibition de la voie des TLRs de façon concomitante induit un effet anti-inflammatoire et anti-oxydant encore plus efficace que celui induit par *Ho-1* seul. Toutefois, en fonction de la voie des TLRs ciblée les résultats peuvent légèrement varier. En effet, les effets anti-inflammatoires et anti-oxydants de CoPP et CLI-095 semblent être induits par l'activation de l'inhibiteur de NF-κb, Nf-κb2 (**Fig. 4-30A**). Les effets engendrés par CoPP et OxPAPc semblent, quant à eux, se concentrer sur Cox-2 (**Fig. 4-30B**).

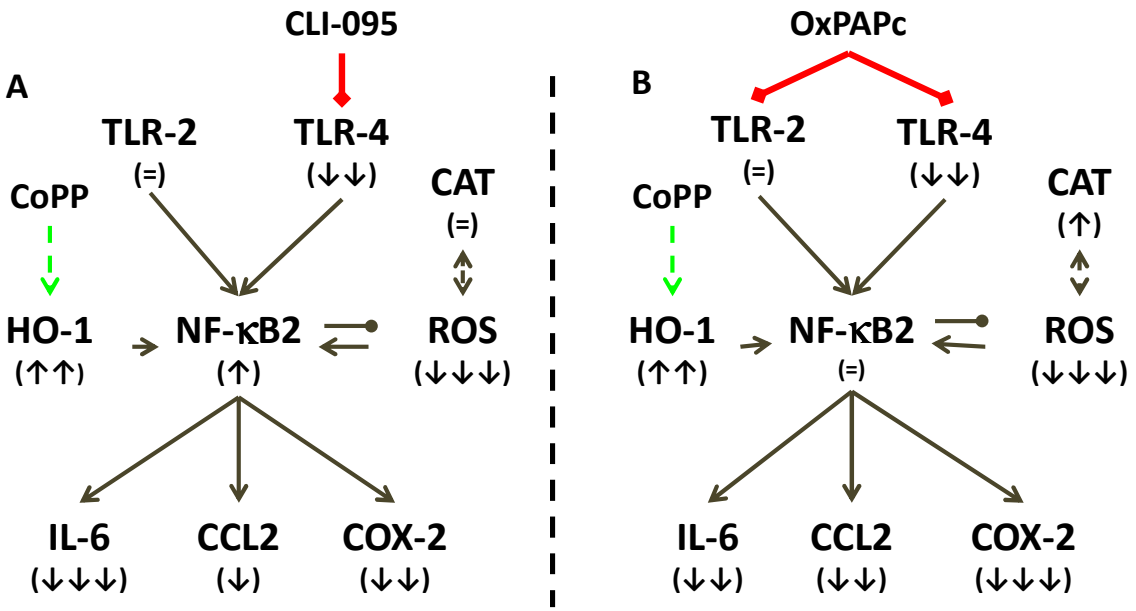


Figure 5-30. Schéma des effets induits par les différentes molécules utilisées

(A) CoPP + CLI-095; (B) CoPP + OxPAPc

En outre, l'usage de ces molécules de façon simultanée montre qu'il existe un véritable réseau d'interaction entre les différents médiateurs ciblés. D'après nos résultats, le ciblage exclusif de la voie des TLRs ou de HO-1 est moins efficace qu'un ciblage simultané. Ces résultats suggèrent donc que les deux cibles étudiées contribuent de manière indépendante mais synergique à la réponse inflammatoire observée. Cette observation est justifiée par l'inhibition accrue de COX-2, IL-6 et MCP-1 dans ce contexte.

5.3 Caractérisation des réactions inflammatoires précoces chez le Rongeur

Comme évoqué précédemment, le modèle « tubing loops » est le « gold » standard pour décrire IBMIR. Toutefois, convaincus que ce modèle n'est pas assez précis pour décrire l'aspect inflammatoire d'IBMIR, nous avons mis en place un modèle de transplantation *in situ* mimant les conditions d'implantation d'îlots humains.

Plus précisément, nous avons choisi de travailler avec des rats Lewis syngéniques afin de nous affranchir des réactions de rejet. Les îlots sont transplantés en intra-portale mais sont dirigés par clampage dans le lobe caudé hépatique afin de faciliter l'étude histologique. Nous avons également utilisé des billes de dextran « inertes » afin de créer un véritable contrôle de chirurgie (Sham).

La première étape de cette étude vise à contrôler la présence des îlots ou billes transplantés (**Fig 4-14**). Comme on peut le remarquer sur la photographie à ce stade précoce de transplantation, les îlots pancréatiques sont micro-embolisés dans les veinules et présentent un marquage positif à l'insuline. Les billes de dextran sont également facilement retrouvées dans le foie.

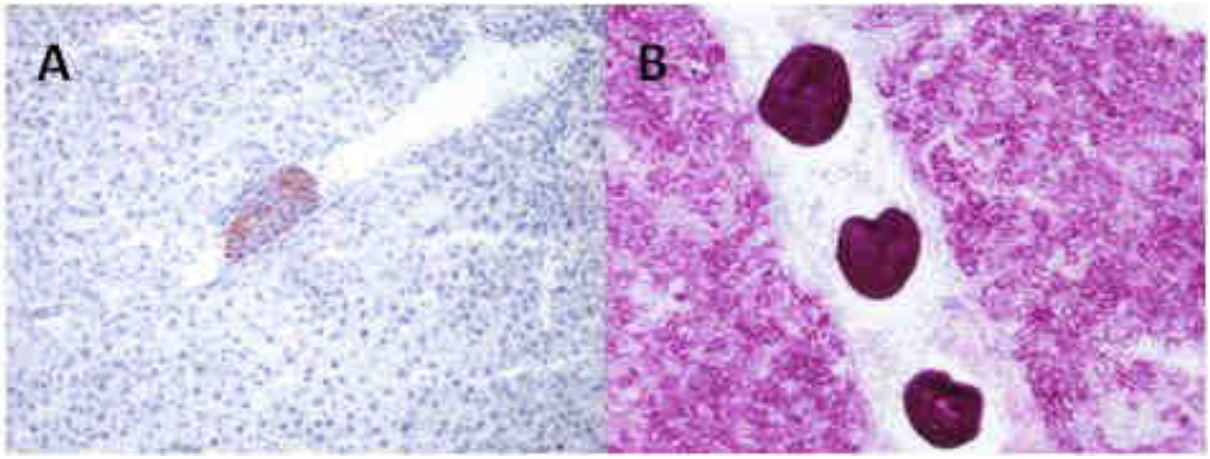


Figure 5-31. Contrôle de la présence (A) des îlots pancréatiques et (B) des billes de dextran après transplantation et injection intra portale chez le Rat.

Les îlots sont transplantés et les billes sont injectées dans le foie des animaux. Les foies sont prélevés immédiatement ou 2H après injection. La visualisation s'effectue par microscopie (x 400). Les îlots sont marqués par immunohistochimie avec un anticorps anti-insuline. Les billes sont colorées par coloration PAS modifiée.

La présence des îlots / billes transplantés est la condition requise pour que les prélèvements soient inclus dans l'étude. Parmi les 31 rats transplantés, les îlots pancréatiques ont été retrouvés dans le foie de seulement 22 rats (au moins 3 prélèvements pour chaque condition). Les billes ont été mises en évidence dans le foie de 34 animaux parmi les 44 transplantés.

- **La transplantation d'îlots ou de billes de dextran induit la production d'IL-6 et d'α2-macroglobuline après transplantation**

Nous avons ensuite analysé l'évolution de deux marqueurs plasmatiques de l'inflammation après transplantation.

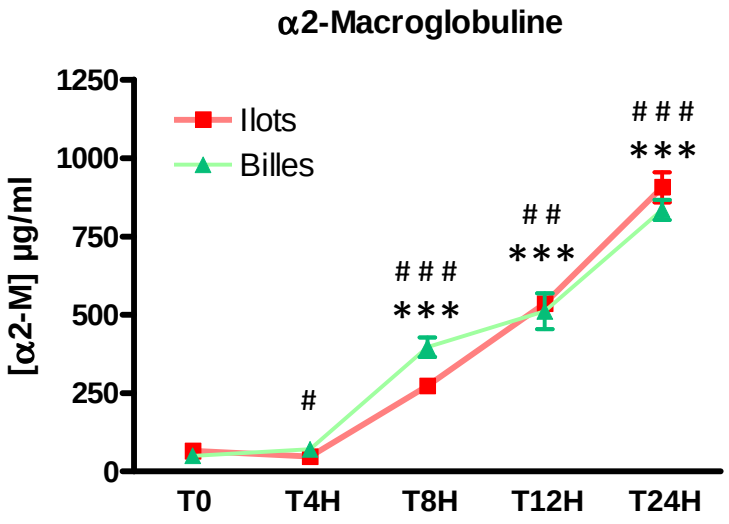


Figure 5-32. Quantification de l'expression de l'α2-macroglobuline plasmatique après transplantation d'îlots ou injection de billes de dextran par ELISA.

Les plasmas de rats injectés sont obtenus à partir du prélèvement de sang total récolté immédiatement ou 4H, 8H, 12H, 24H après injection. Les résultats sont exprimés selon la concentration moyenne de protéines en µg de protéine par ml de plasma (µg / ml). Chaque expérience est effectuée au moins trois fois de manière indépendante. ***p<0,001 par rapport à T0 ilots ; #p<0,05, ##p<0,01, ### p<0,001 par rapport à T0 billes.

Les résultats indiquent que l'α2-macroglobuline (protéine de la phase aiguë de l'inflammation) est produite après transplantation. Sa production s'élève significativement (p<0,001) 8 heures après transplantation d'îlots (273,3 µg / ml ± 0,52 *vs* 64,9 µg / ml ± 8,5 immédiatement après transplantation) (**Fig.4-32**). La quantité d'α2-macroglobuline plasmatique ne cesse d'augmenter significativement jusqu'à 24 heures (906,5 µg / ml ± 48,1 ; p<0,001). De manière comparable à la transplantation d'îlots pancréatiques, la libération plasmatique d'α2-macroglobuline augmente progressivement et significativement par rapport à T0 après transplantation de billes. La concentration d'α2-Macroglobuline atteint 834,5 µg / ml ± 14,3 (p<0,001) vs 49,6 ± 15,6 à T0.

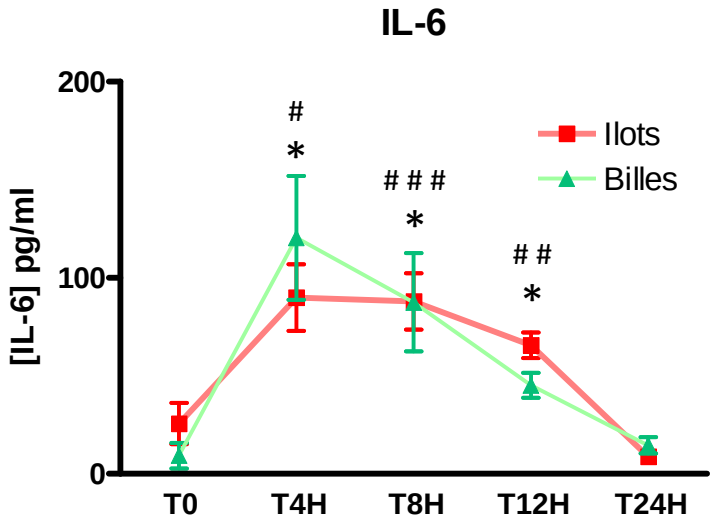


Figure 5-33. Quantification de l'expression de l'IL-6 plasmatique après transplantation d'îlots ou injection de billes de dextran par ELISA.

Les plasmas de rats injectés sont obtenus à partir du prélèvement de sang total récoltés immédiatement ou 4H, 8H, 12H, 24H après injection. Les résultats sont exprimés selon la concentration moyenne de protéines en pg de protéine par ml de plasma (pg / ml). Chaque expérience est effectuée au moins trois fois de manière indépendante. *p<0,05 par rapport à T0 ilots ; #p<0,05, ##p<0,01, ### p<0,001 par rapport à T0 billes.

D'autre part, la libération d'IL-6 augmente significativement après transplantation d'îlots ou de billes. Les quantités d'IL-6 plasmatiques atteignent leur maximum 4 heures après transplantation d'îlots et de billes soit 90 pg/ml ± 17 (p<0,05 par rapport à T0) et 152,2 pg/ml ± 38,9 (p<0,05 par rapport à T0) respectivement. Ensuite la quantité IL-6 diminue progressivement jusqu'à 24 heures pour atteindre des valeurs comparables à T0, soit 8,8 pg/ml ± 0,8 (îlots) et 14,4 pg/ml ± 4,3 (billes). Comme pour l'α2-macroglobuline, la production d'IL-6 suit la même tendance après transplantation d'îlots ou de billes (**Fig. 4-33**).

- **La production d'IL-6 précède celle d'α2-macroglobuline après transplantation**

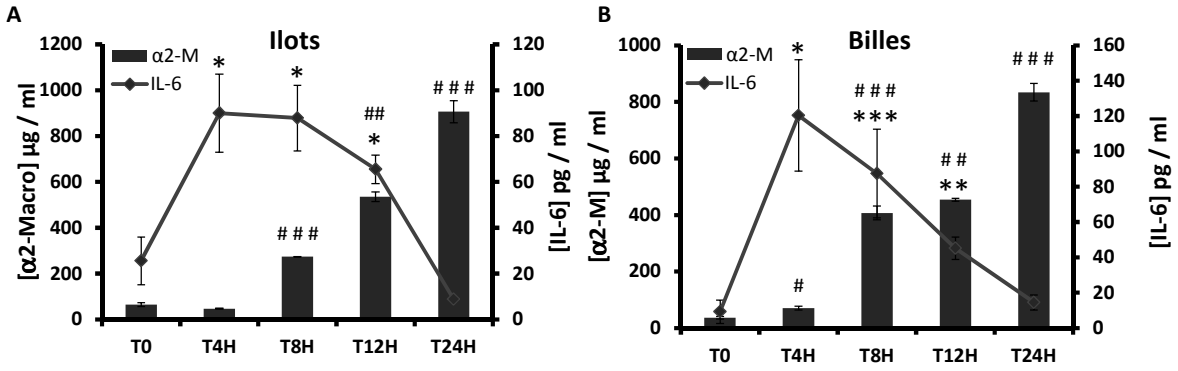


Figure 5-34. Représentation de l'expression de l' α2-Macroglobuline et l'IL-6 plasmatique après transplantation d'îlots (A) ou injection de billes de dextran(B) par ELISA.

Les plasmas de rats injectés sont obtenus à partir du prélèvement de sang total récolté immédiatement ou 4H, 8H, 12H, 24H après injection. Les résultats sont exprimés selon la concentration moyenne de protéines en µg de protéine par ml de plasma (µg / ml) pour l'α2-Macroglobuline et en pg de protéines par ml de plasma (pg / ml) pour l'IL-6.Chaque expérience est effectuée au moins trois fois de manière indépendante. Pour IL-6 :*p<0,05 par rapport à T0 ; pour α2-Macroglobuline #p<0,05, ##p<0,01, ### p<0,001 par rapport à T0 billes.

Lorsque l'on compare la production d'IL-6 à celle d'α2-macroglobuline (**Fig.4-32**), on remarque que la production d'IL-6 précède de 8 heures la production d'α2-macroglobuline qui atteint son maximum à 24 heures alors que la production d'IL-6 est minimale.

- **Il existe 2 périodes de relargage de peptide-C après transplantation**

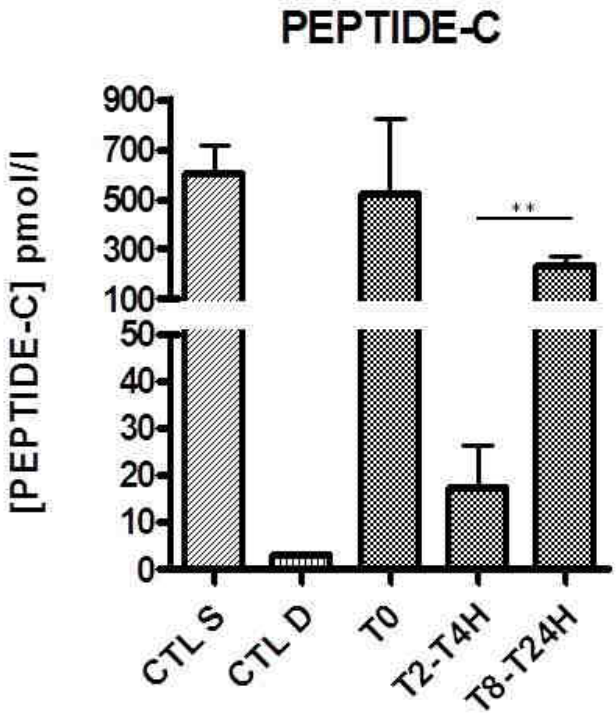


Figure 5-35. Quantification du relargage de peptide C plasmatique d'îlots pancréatiques par ELISA.

Les plasmas de rats transplantés sont obtenus à partir du prélèvement de sang total récoltés immédiatement ou 2H, 4H, 8H, 12H, 24H après transplantation. Le peptide-C est dosé dans le plasma d'animaux sains (CTL S), diabétiques (CTL D) ou transplantés avec des îlots. Les résultats sont exprimés en pmol/ml selon la valeur moyenne ± ESM. Les mesures sont effectuées à partir d'au moins trois plasmas d'animaux différents en doublet. **p<0.01.

L'analyse des médiateurs plasmatiques de l'inflammation est complétée par la quantification du relargage de peptide-C plasmatique après transplantation, témoin de la lyse des îlots et / ou de leur fonctionnalité *in vivo* (**Fig. 4-35**). Immédiatement après transplantation, un premier relargage massif de peptide-C (524,2 pmol/l ± 300,5) est détectable dans le plasma des animaux transplantés avec des îlots. Toutefois, la valeur élevée de l'erreur standard moyenne (ESM) suggère la grande variabilité de ce relargage. La quantité de peptide-C diminue pour atteindre 40,6 pmol/l ± 16,9 2 après 4 heures et s'élève significativement 8 heures après transplantation (233,9 pmol / l ± 38,1, p<0,01).

- **La production de ROS hépatique est maximale 8 heures après transplantation**

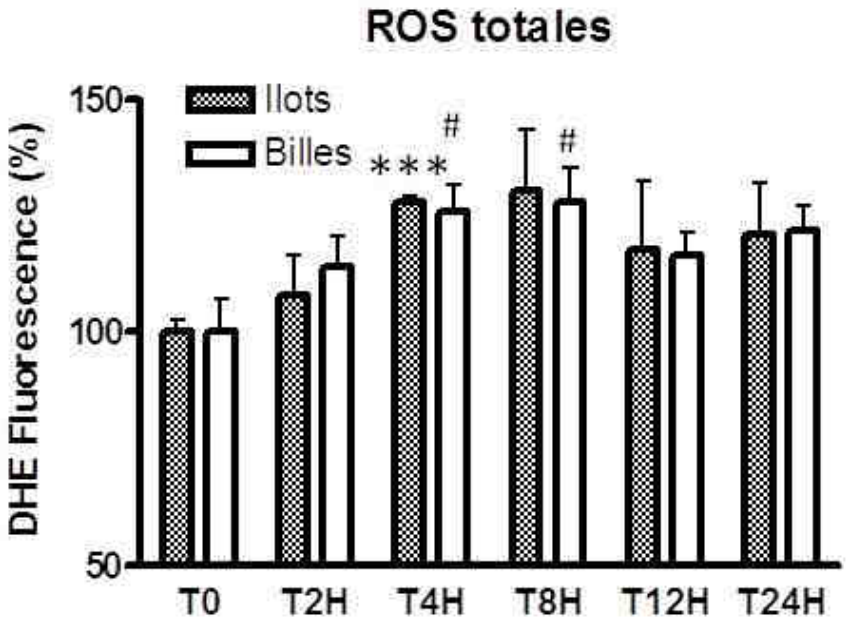


Figure 5-36. Quantification des espèces réactives de l'oxygène (ROS) produites par le foie de Rat à l'aide d'une sonde de Dihydroéthidium (DHE) après transplantation d'îlots ou injection de billes de dextran.

Les îlots et les billes sont injectés dans les foies des animaux qui sont prélevés immédiatement ou 2H, 4H, 8H, 12H 24H après injection. La visualisation s'effectue par microscopie à fluorescence (x 400) à l'aide d'une sonde DHE. Les résultats sont exprimés en valeur moyenne ± ESM de la fluorescence émise par la sonde DHE. Chaque expérience est effectuée de manière indépendante avec au moins trois lames différentes et pour chaque expérience les intensités de fluorescence sont mesurées à partir de 5 champs différents. ***p<0,001 pour les foies transplantés avec des îlots et #p<0,05 pour les foies transplantés avec des billes.

D'après la **Figure 4-36,** la production de ROS hépatiques augmente significativement (p<0,001) 4 heures après transplantation d'îlots pancréatiques (125,7 % ± 1,39), atteint son maximum après 8 heures (130,5 % ± 13,1), diminue après 12 heures (117,5 % ± 2,3) et se maintient jusqu'à 24 heures (120,9 % ± 11,1) par rapport à T0 (100 % ± 2,7). La production de ROS hépatiques suit la même tendance après injection avec les billes, la production de ROS étant significativement (p<0,05) plus élevée et maximale (128% ± 12,6) par rapport à T0 (100% ± 18,01)

- **Les cellules inflammatoires infiltrent les îlots 12 heures après transplantation**

D'après la **figure 4-37**, la thrombine est produite immédiatement après transplantation et elle est détectable durant les 24 premières heures post-transplantation d'îlots pancréatiques.
Les données montrent que les macrophages sont omniprésents initialement dans le foie des animaux transplantés. Les macrophages se regroupent autour des îlots 8 heures après transplantation et infiltrent ces derniers dès la 12ème heure. 24 heures après transplantation, les îlots transplantés sont totalement infiltrés. En revanche, les granulocytes sont peu présents immédiatement après transplantation dans le foie des animaux transplantés. L'infiltration massive des granulocytes qui se déroule 12 heures après transplantation, témoigne d'un recrutement cellulaire important. Enfin, les cellules NK sont présentes dans le foie des animaux transplantés. Le recrutement et l'infiltration du greffon pour ces cellules suit le même cheminement que pour les neutrophiles. Quantitativement, les cellules NK semblent être le type cellulaire le moins abondant après infiltration des îlots.

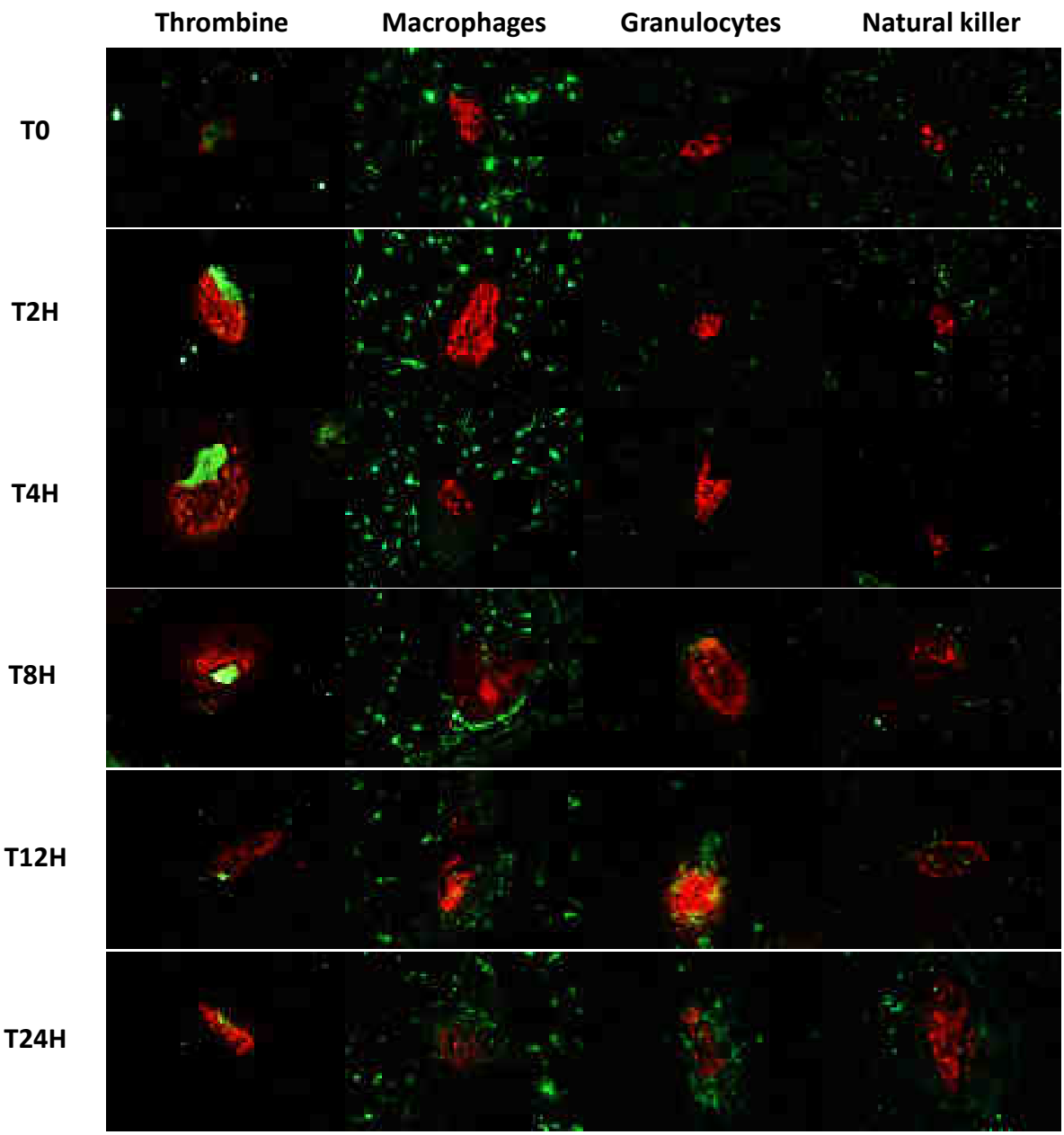


Figure 5-37. Analyse immunohistochimique de l'infiltration leucocytaire et de la génération de thrombine après transplantation intra portale d'îlots pancréatiques.

Les foies de Rats transplantés sont prélevés immédiatement ou 2H, 4H, 8H, 12H 24H après transplantation. La visualisation s'effectue par microscopie (x 200). Les ilots pancréatiques sont immunomarqués et révélés en rouge (Cy3) et les cellules infiltrantes (macrophages, neutrophiles, Natural Killer) et de la thrombine sont révélées en vert (Alexa 488).

L'injection avec des billes de dextran (**Fig. 4-38**) induit un recrutement retardé des cellules inflammatoires par rapport à la transplantation d'îlots. Il faut attendre 24 heures après transplantation pour visualiser le recrutement cellulaire et seuls les macrophages semblent impliqués dans ce processus. A l'inverse de la transplantation d'îlots, la thrombine n'est pas

générée spontanément après transplantation. Les résultats suggèrent donc que la production de thrombine est retardée et apparaît progressivement au cours des 24 heures post-transplantation.

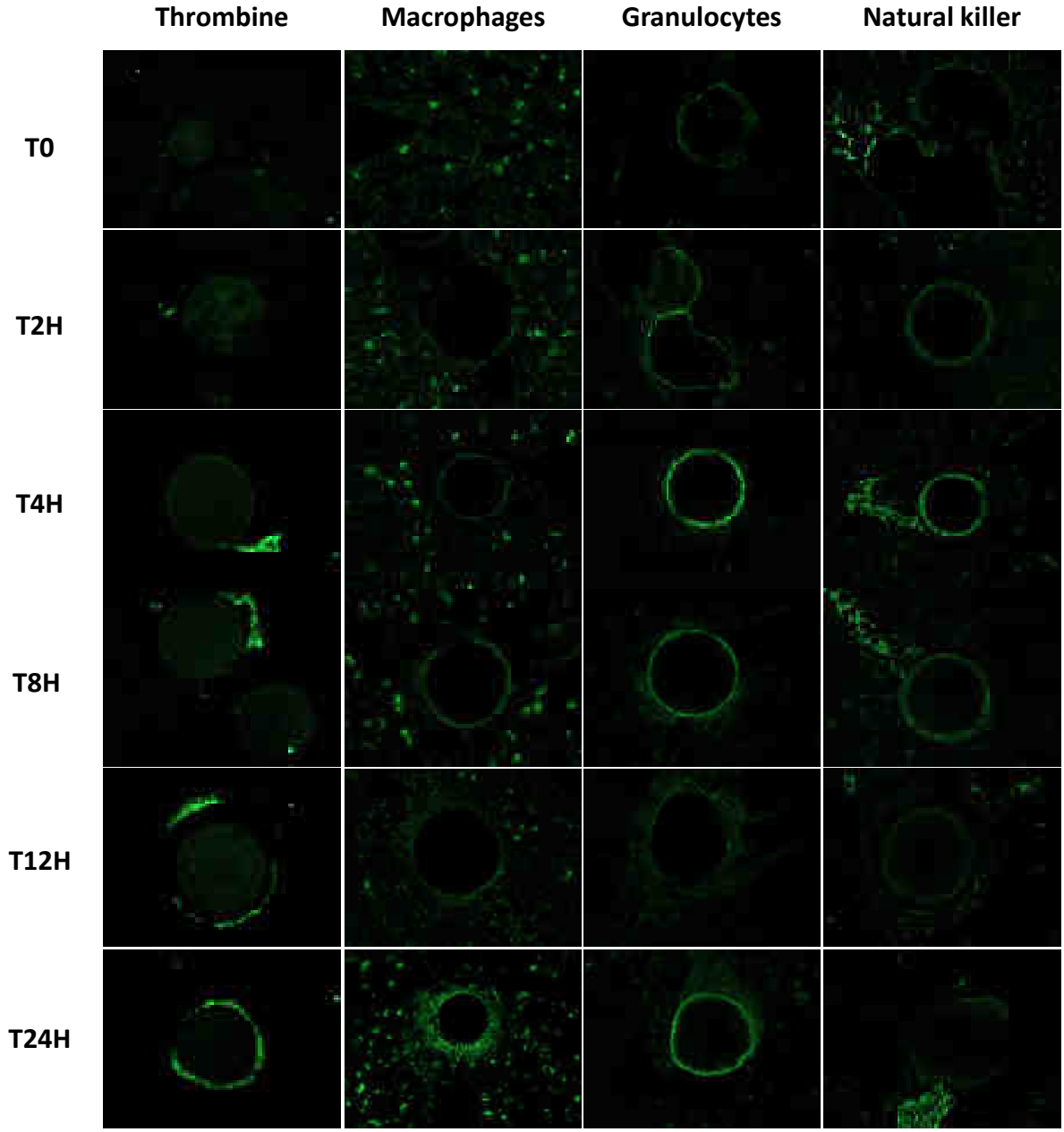


Figure 5-38. Analyse immunohistochimique de l'infiltration leucocytaire et de la génération de thrombine après injection intra portale de billes de dextran.

Les foies de Rats injectés sont prélevés immédiatement ou 2H, 4H, 8H, 12H 24H après transplantation. La visualisation s'effectue par microscopie (x 200). Les cellules infiltrantes (macrophages, neutrophiles, Natural Killer) et de la thrombine sont immunomarqués en vert (Alexa 488).

- **Un changement du profil protéomique hépatique apparaît 12 heures après transplantation**

Après avoir constaté que le recrutement des cellules inflammatoires s'effectue 12 heures après transplantation, nous avons fait le choix d'analyser les variations du protéome total des extraits en fonction du temps. Pour ce faire, l'analyse du protéome total d'extraits prelevés immédiatement ou 12 heures après transplantation d'îlots a été effectuée.

Après extraction et séparation par électrophorèse 2D, plus de 500 spots de protéines ont été repérés (**Fig. 4-39**). Parmi ces 500 spots, 7 d'entre eux ont été sélectionnés et identifiés selon leur profil d'expression différentielle entre les conditions T0 et T12 heures. Plus précisément, les spots d'intérêt ont été sélectionnés parce qu'ils sont présents à T0 et absents à T12 heures ou l'inverse.

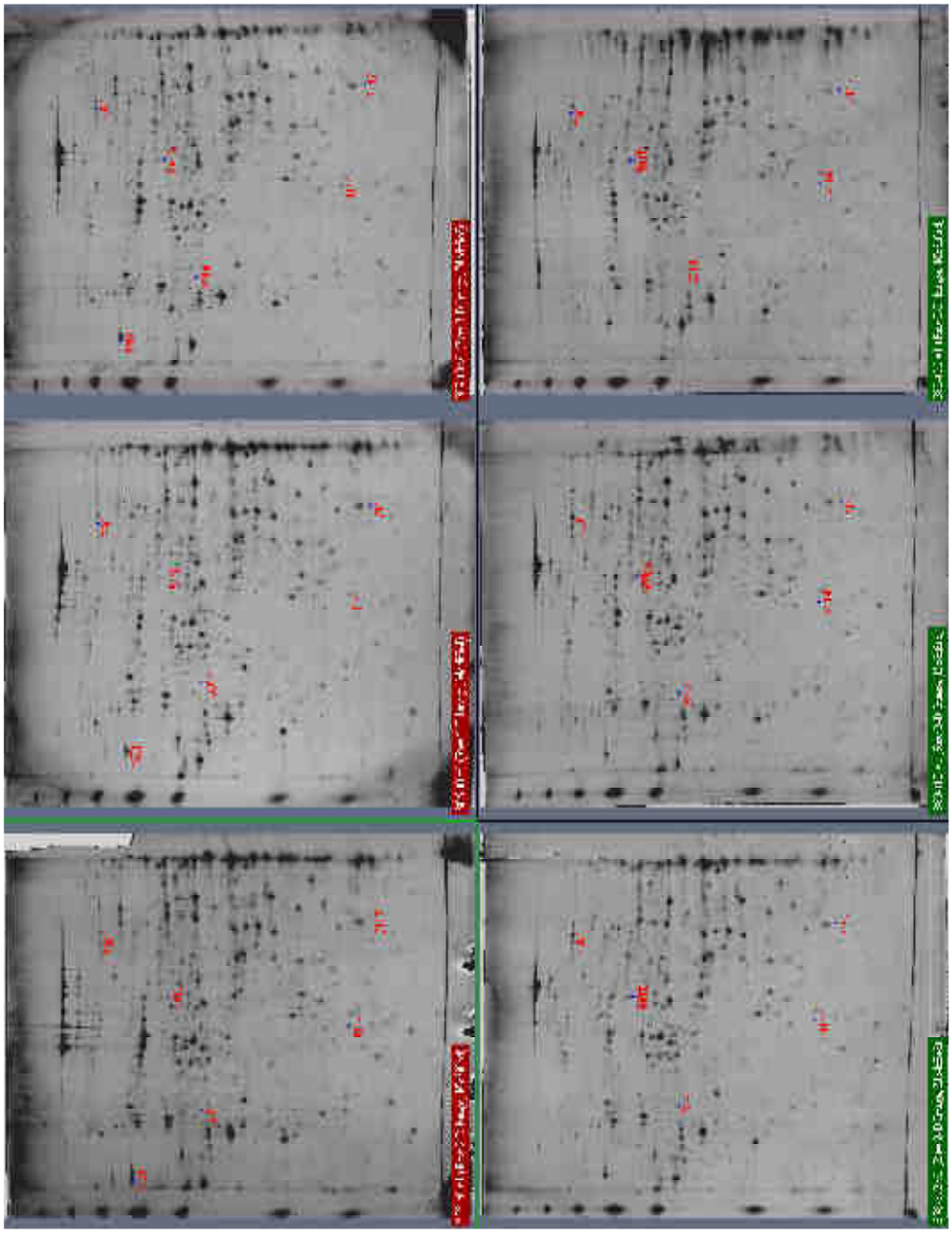


Figure 5-39. Analyse comparative du protéome total d'extrait de foie après transplantation intra portale d'îlots par électrophorèse 2D.

Les foies des rats transplantés sont prélevés immédiatement ou 12H après transplantation.

Toutefois, il faut noter que parmi les spots sélectionnés, le profil d'expression du spot 1501 est différent des autres (**Fig 4-40**). Ce type de profil correspond généralement à une modification post-traductionnelle.

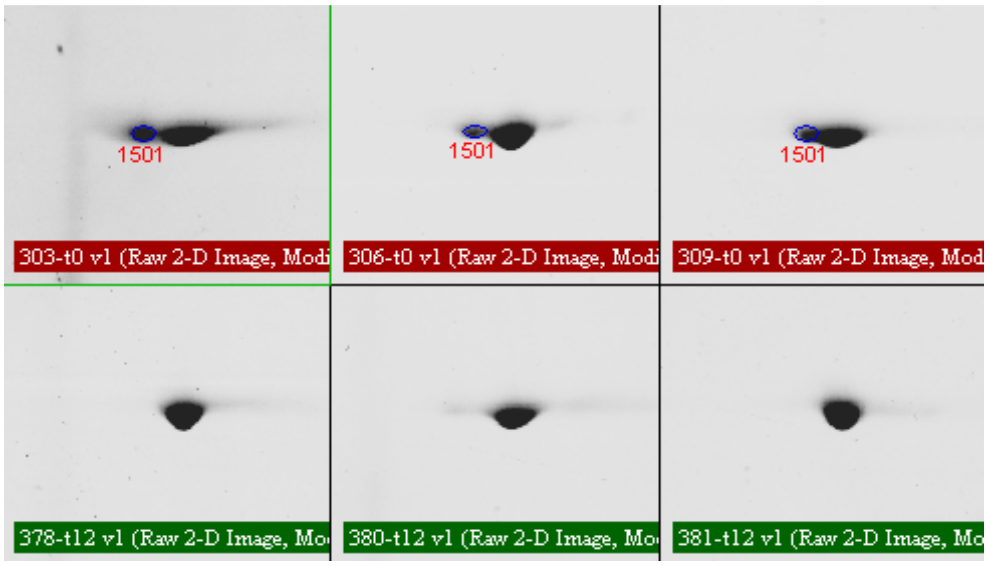


Figure 5-40. Analyse comparative du spot 1501.

Chaque spot a ensuite été identifié par spectrométrie de masse (**Tab. 4-41**). Les peptides présents et identifiés sont soit impliqués dans la réponse inflammatoire (78kDa Glucose regulated protein (GRP78) / Serine protease inhibitor A3N et T-Kininogen-1 (TK-1)) soit les témoins d'une activité cellulaire intense (Phosphoglucomutase-1 (PGM-1) / Triose-phosphate isomerase (TPI) / Elongation factor 2 (eEF2) / Proteasome subunit beta type 7).

Numéro de spot	Nb de peptides	Identification	Poids moléculaire (kDa)	PI
1501	302	78 kDa Glucose-regulated protein	72.3	4.9
2314	36	Serine protease inhibitor A3N	46,6	5,2
5410	46	T-kininogen-1	47.7	6.1
5411	17	Phosphoglucomutase-1	47.5	6.1
7117	51	Triosephosphate isomerase	26.8	7.7
7601	58	Elongation factor 2	35.2	6.4
4114	16	Proteasome subunit beta type 7	29.9	3,1

Tableau 5-2. Identification des protéines contenues dans les spots observés en électrophorèse 2D par spectrométrie de masse maldi tof tof.

Ainsi, ces résultats suggèrent qu'il existe une évolution du protéome hépatique en fonction du temps post-transplantation.

5.3.1 Discussion : Caractérisation d'IBMIR chez le Rat

Cette partie avait pour but de caractériser la réponse inflammatoire du foie induite après transplantation. Pour ce faire, nous avons fait le choix d'utiliser une technique de transplantation intraportale hautement sélective permettant d'augmenter la densité des îlots transplantés et donc de faciliter l'analyse histologique. Ainsi, la première partie de ce travail a consisté à contrôler la présence des îlots pancréatiques ou des billes transplantés par immunohistochimie ou coloration PAS respectivement. Le marquage spécifique des îlots et des billes nous permet de valider leur présence. Cette même technique a déjà été décrite par une autre équipe à l'exception faite que le lobe hépatique transplanté était différent. Ainsi, les auteurs de cette étude ont démontré que la transplantation d'îlots dans un lobe hépatique unique conduit à une baisse identique de la glycémie par rapport aux conditions de transplantation totale (Juszczak, et al., 2009).

De plus, nous avons également fait le choix d'utiliser des animaux transplantés avec des billes de dextran comme contrôle (Sham). Les billes de dextran utilisées mesurent la taille d'un îlot équivalent soit approximativement 150 µm et sont décrites comme inertes. L'intérêt d'utiliser ces billes est d'évaluer l'impact réel des îlots transplantés sur la réponse inflammatoire post-transplantatoire précoce. Juszczak et al. ont également utilisé les mêmes billes de dextran afin de valider leur modèle de transplantation intraportale comme un outil d'analyse histologique quantitative de la survie du greffon d'îlots (Juszczak, et al., 2009).

D'autre part, afin de quantifier l'inflammation, nous avons analysé l'évolution des marqueurs systémiques de l'inflammation au cours du temps. Plus précisément nous avons démontré que l'IL-6 intervient dans ce processus et sa sécrétion dans le plasma des animaux transplantés précède la libération d'α2-macroglobuline. Bien qu'une différence significative entre les animaux transplantés avec des îlots ou avec des billes soit mise en évidence, cette différence mineure observée est difficilement interprétable. Dans le contexte de la transplantation d'îlots, la sécrétion d'IL-6 post transplantation est une donnée bien connue (Barshes, et al., 2005). D'autre part, des chercheurs ont démontré que la libération d'α2-macroglobuline est connue pour être un bon marqueur de l'inflammation chez le rat de laboratoire (Giffen, et al., 2003).

Ainsi, nos résultats confirment la survenue d'un processus inflammatoire. Toutefois, étant donné qu'aucune variation des médiateurs analysés n'a pu être mise en évidence entre les groupes d'animaux transplantés, ces données ne permettent pas d'établir l'origine de l'inflammation. L'augmentation post-transplantation de l'α2-macroglobuline n'est pas exclusivement due à l'inflammation générée par la présence des îlots, l'acte chirurgical y

contribue de manière significative. En effet, une autre équipe a démontré que la production d'α2-macroglobuline pouvait être augmentée de 25 fois après un acte chirurgical chez le rat (Jinbo, et al., 2001). Etant donné que la chirurgie utilisée pour la transplantation d'îlots pancréatiques de rat est beaucoup plus invasive que celle utilisée pour l'humain, les analyses effectuées ne sont pas adaptées pour étudier l'inflammation spécifiquement due à l'îlot.

Ainsi nous avons fait le choix de travailler en deuxième lieu sur un marqueur plus spécifique de l'îlot : le peptide-C. Comme démontré par Moberg et al., la lyse des îlots post transplantation se caractérise par un relargage plasmatique de peptide-C (Moberg, et al., 2002; Nilsson, et al., 2011). Nous avons mis en évidence deux périodes de relargage de peptide-C qui reflètent la lyse des îlots. La première période est immédiate après transplantation, tandis que la deuxième a lieu plus de 8 heures après transplantation. Le premier relargage de peptide-C doit certainement être dû à la lyse des îlots induite par l'acte chirurgical, tandis que le deuxième relargage pourrait avoir plusieurs origines : soit l'implantation des îlots et la production physiologique de peptide-C par ces derniers, soit la lyse des îlots due aux réponse inflammatoires précoces. Nos données sont en accord avec les observations d'une équipe suédoise qui a démontré un pic de peptide-C une heure après transplantation chez l'Homme (Moberg, et al., 2002). En revanche, cette même étude n'a pas mis en évidence un deuxième relargage de peptide C contrairement à ce que nous avons observé. Ainsi, des études histologiques plus précises des réactions inflammatoires précoces nous permettraient de comprendre l'origine du deuxième pic de peptide-C.

Comme évoqué précédemment, IBMIR est une réaction thrombotique et inflammatoire qui se déroule immédiatement après transplantation. Elle se caractérise par l'activation des systèmes de la coagulation et du complément suivie par un recrutement de cellules inflammatoires. L'ensemble de ces évènements conduit à l'altération et à la lyse des îlots pancréatiques transplantés (Bennet, et al., 2000).

D'après nos analyses, nous avons pu observer que la thrombine est générée immédiatement après transplantation et que sa présence perdure au cours du temps. Par contre, la production de thrombine semble progressive pour les animaux transplantés avec des billes. Comme l'avait décrit une autre étude dans les années 2000 en qualifiant IBMIR de réaction immédiate, nos résultats confirment le caractère immédiat de IBMIR avec la génération de thrombine (Bennet, et al., 2000).

D'autre part, nous avons également observé le recrutement des macrophages dans ce processus. Les cellules de Kupffer sont un médiateur important de l'inflammation dans les sinusoïdes hépatiques, en tant que macrophage résident du foie, elles sont omniprésentes dans

le foie et représentent approximativement 80% des macrophages résidant chez l'homme (Biozzi, et al., 1953). Nos résultats confirment que les macrophages sont abondants dans le foie. Durant les 4 premières heures après transplantation, les macrophages sont encore à distance des îlots transplantés, tandis que 8 heures après transplantation les macrophages se regroupent autour des îlots transplantés. D'après nos observations, les macrophages envahissent les îlots 12 heures après transplantation. Ainsi, ces résultats montrent que l'infiltration des îlots coïncide avec le deuxième pic de peptide-C observé. Ceci suggère que les cellules inflammatoires infiltrantes pourraient être à l'origine d'une lyse des îlots et donc de ce deuxième pic de peptide-C.

Concernant les granulocytes, très peu de cellules sont détectables dans le foie des animaux immédiatement après transplantation. De manière comparable à l'infiltration des macrophages, les granulocytes apparaissent autour des îlots 8 heures après transplantation et envahissent massivement le greffon à T12H. Les neutrophiles sont le chef de file de la famille des granulocytes et la première ligne de défense de l'immunité innée (Kaufmann, 2008). En raison de leurs origines communes, les neutrophiles et les macrophages partagent plusieurs fonctions telles que la capacité de phagocytose, le comportement cinétique lors des infections ou de l'inflammation ainsi que leur propriété immunomodulatrice (Silva, 2010). Toutefois, les neutrophiles apportent une contribution importante à l'activation et au recrutement des macrophages sur le site d'inflammation aiguë. Lors de leur activation, ils génèrent divers facteurs chimiotactiques qui attirent les monocytes et les macrophages (« Macrophage inflammatory protein-1α », MIP-3α) (Chertov, et al., 1997). Nos observations ne sont pas en accord avec les études faites par Moberg et al. Les auteurs ont utilisé un système *in vitro* « Tubing Loops » et ont observé que les granulocytes neutrophiles sont le type cellulaire prédominant infiltrant les îlots. D'après leurs observations, les cellules infiltrent les îlots après 15 minutes, et l'infiltration atteint son maximum après 2 heures (Moberg, et al., 2005). La différence observée peut certainement s'expliquer pour le modèle utilisé, qui n'est pas physiologique et qui ne prend pas en compte le sang et l'environnement hépatique dans son intégralité avec les cellules résidentes.

A l'inverse des macrophages, les cellules natural killer (NK) sont peu présentes dans le foie des animaux immédiatement après transplantation. L'infiltration des îlots par les cellules NK se déroule également 12 heures après transplantation. Toutefois, le recrutement est beaucoup moins important que pour les deux autres types cellulaires étudiés. Les cellules NK participent à la réponse immunitaire innée via leur capacité à reconnaître, sans sensibilisation préalable, des antigènes spécifiques des cellules infectées, transformées ou des cellules

allogéniques (Chiesa, et al., 2006). L'activation des cellules NK se caractérise par deux fonctions effectrices: la cytotoxicité des cellules cibles et / ou la sécrétion d'un large éventail de cytokines et de chemokines (CCL2) (Moretta, et al., 2002). Ishiyama et al. (2011) ont clairement démontré l'activité destructrice des cellules NK hépatiques sur les îlots et suggèrent que les cellules NK jouent un rôle dans la perte précoce des îlots après transplantation intraportale.

En revanche, étant donné qu'aucune infiltration évidente n'a été observée chez les animaux transplantés avec des billes, nos résultats semblent confirmer que les billes sont inertes et que l'îlot joue un rôle primordial dans cette infiltration.

Nous avons également observé que la production de ROS est élevée après transplantation et qu'elle est équivalente entre les animaux transplantés avec des îlots ou des billes. Ces résultats suggèrent à nouveau que l'acte chirurgical pourrait être en partie à l'origine de la production de ROS. Bien que les moyens techniques mis en œuvre ne nous ont pas permis de visualiser le stress oxydant exclusivement dû à l'îlot transplanté, une autre approche doit impérativement être développée afin de comprendre l'implication de l'îlot dans ce processus. Ceci paraît d'autant plus important qu'une équipe a démontré que le traitement systématique avec un antioxydant protège l'îlot de l'ischémie-reperfusion et entrave la réponse antigène-dépendante allo-immune (Sklavos, et al., 2010).

Enfin, après extraction, séparation et identification, 7 protéines de profil d'expression variable entre les conditions T0 et T12 heures ont été mises en évidence chez les rats transplantés avec des îlots pancréatiques. Parmi les spots identifiés figurent la « 78 kDa Glucose-regulated protein », la « Sérine protease A3N » (SPI-3), le T-kininogen 1 (TK-1), la phosphoglucomutase-1 (PGM-1), Triose phosphate isomérase (TPI), facteur d'élongation 2 (eEF2), et la sous unité β type 7 du protéasome.

GRP78 est une protéine chaperonne majeure du réticulum endoplasmique (RE) impliquée dans le contrôle qualité des protéines du RE et dans le contrôle de l'activation des molécules de signalisation transmembranaires du RE (Wang, et al., 2009). Toutefois, la GRP78 exerce de nombreux autres rôles dont des propriétés anti-apoptotiques en tant que récepteur de signalisation pour l'α2-macroglobuline activée, le plasminogène, et le microplasminogène. La GRP78 effectue également un rôle de régulateur de l'activité procoagulante du facteur tissulaire, un rôle de récepteur pour des peptides angiogéniques via un mécanisme indépendant du récepteur au VEGF (Gonzalez-Gronow, et al., 2009). La GRP78 est capable de protéger les cellules β de la lyse induite par les lymphocytes T cytotoxiques par diminution de la réponse immunitaire induite par les cellules β transplantées (Wang, et al., 2007). Ainsi,

nos résultats montrent que GRP78 subit une modification post-traductionnelle 12 heures après transplantation. Deux modifications post-traductionelles sont connues pour GRP78 : la phosphorylation et l'ADP-ribosylation (Carlsson & Lazarides, 1983). La forme phosphorylée de GRP78 diminue lorsque la synthèse *de novo* de GRP78 augmente par la privation de glucose (Hendershot, et al., 1988). La forme phosphorylée et ADP-ribosylée de GRP78 est un dimère qui ne se lie pas à son substrat (Hendershot, et al., 1988). Ceci suggère que la phosphorylation et de l'ADP-ribosylation contrôlent la fonction de GRP78.

Ainsi, la relation de GRP78 avec le facteur tissulaire, l'angiogenèse, l'α2-Macroglobuline et son rôle protecteur vis-à-vis de la cellule β lui confèrent un rôle central dans la problématique de la transplantation d'îlots. En effet, comme évoqué précédemment, le facteur tissulaire est l'élément déclenchant d'IBMIR et le défaut de vascularisation post-transplantation des îlots est un facteur limitant majeur de la transplantation d'îlots. Via son rôle protecteur de la cellule β et son interaction avec l'α2-Macroglobuline, GRP78 joue également un rôle important dans la réponse inflammatoire qui est délétère pendant la période précoce post transplantation. Ainsi, la GRP78 est une cible à privilégier, d'autant plus que ses fonctions protectrices et immunosuppressives ont été mises en évidence dans l'amélioration de l'allo-immunité dans le contexte de la transplantation d'îlots pancréatiques. (Wang, et al., 2007)

Nous avons également identifié deux autres protéines impliquées dans l'inflammation : la « Sérine protease A3N » (SPI-3) et le T-kininogène (TK). Ces deux protéines sont faiblement exprimées immédiatement après tranplantation, et leur expression augmente 12 heures après transplantation. La « Sérine protease A3N » appartient à la famille des inhibiteurs des sérine-protéases. L'inflammation aiguë modifie radicalement la synthèse hépatique des ARNm codant les SPI chez le Rat. Ainsi, l'expression des gènes SPI apparaît comme contrôlée, à la fois positivement et négativement, par plusieurs facteurs tels que les glucocorticoïdes et les cytokines entre autres (Pages, et al., 1990). Ainsi, Chinnaiyan et al ont démontré que la protéine de phase aiguë SPI-3 est précocément surexprimée dans un modèle de « graft-versus-host disease » cutané (Sugerman, et al., 2004). De plus, certains travaux démontrent que l'IL-1ß induit l'expression du gène SPI-3 des cellules β pancréatiques de rat (Chen, et al., 1999). Ces résultats suggèrent que cet inhibiteur de protéases peut faire partie des mécanismes de défense des cellules ß déclenchés en réponse à des dommages cellulaires.

D'autre part, le T-kininogen 1 fait partie de la famille des kininogènes qui sont des molécules glycosylées multifonctionnelles. Néanmoins, seul le plasma de rat contient un troisième type de kininogène, dit T-kininogène (TK ou Thiostatine). Ce kininogène supplémentaire est le seul kininogène chez les mammifères décrit dont la concentration augmente de façon

spectaculaire au cours de l'inflammation. (Lalmanach, et al., 2010). Ainsi, la surexpression 12 heures après transplantation de SPI-3 et du T-kininogen 1 conforte les données concernant l'α2-macroglobuline plasmatique et confirme la cinétique des évènements inflammatoires post-transplantation. Toutefois, des investigations supplémentaires sont nécessaires afin de comprendre le lien entre ces protéines et l'inflammation précoce au cours de la transplantation d'îlots.

Par ailleurs, nous avons observé l'apparition de la phosphoglucomutase-1 (PGM-1) et la sous-expression de la triose phosphate isomérase (TPI) 12 heures après transplantation. Ces deux protéines sont impliquées dans le métabolisme du glucose. Plus précisément, la PGM-1 est une phosphotransférase intervenant à la fois dans la glycolyse et la gluconéogenèse. Elle catalyse le transfert du phosphate entre les positions 1 et 6 du glucose (Putt, et al., 1993). D'autre part, la fonction physiologique de la TPI consiste à ajuster l'équilibre entre les triosephosphates (Wierenga, et al., 2010). Ces données sont d'autant plus intéressantes, qu'une étude récente a démontré que les cellules β sont contrôlées de manière systématique, plutôt que par des facteurs locaux tels que des dommages tissulaires. Ainsi, les changements chroniques dans le métabolisme du glucose des cellules β, plutôt que les niveaux de glucose dans le sang, sont le principal régulateur positif de la prolifération des cellules β *in vivo*. Les manipulations génétiques et pharmacologiques montrent que le glucose induit la réplication des cellules β (Porat, et al., 2011). Ces données démontrent que l'homéostasie de la masse cellulaire β est contrôlée par la demande métabolique. Par conséquent, la surexpression de la PGM-1 ou la sous-expression de TPI pourrait favoriser la survie des îlots transplantés.

Enfin, la surexpression du facteur d'élongation 2 (eEF2) et de la sous unité β de type 7 du protéasome 12 heures après transplantation témoigne d'une activité cellulaire importante. En effet, eEF2 favorise la translocation GTP-dépendante de la chaîne protéique naissante à partir du site-A vers le site-P du ribosome. La régulation de la traduction protéique au niveau de l'allongement chez les eucaryotes semble être l'une des étapes importantes dans la régulation de la synthèse protéique. Cette étape est principalement régulée grâce à l'activation et la désactivation de eEF2. Comme la traduction des protéines nécessite une quantité considérable d'énergie, eEF2 semble être l'un des facteurs de régulation les plus importants de la synthèse des protéines pendant les périodes de carence énergétique et / ou nutritive chez les eucaryotes supérieurs (Kaul, et al., 2011).

Le protéasome est un grand complexe enzymatique multimérique qui comprend plusieurs activités protéolytiques. Il est indispensable dans l'élimination irréversible de protéines régulatrices permettant ainsi le déroulement normal de la réponse immunitaire (Wu, 2002).

De plus, le protéasome joue aussi un rôle essentiel dans la présentation des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I. Ainsi, dans le cas de la transplantation, la surexpression de la sous unité β de type 7 du protéasome pourrait être le reflet d'une activité métabolique intense et cela pourrait signifier une augmentation de l'alloantigénicité, délétère pour l'implantation des îlots. D'ailleur, Wu et al ont mis en évidence que l'inhibition du protéasome prévient le rejet de greffe d'îlots pancréatiques.(Wu, et al., 2004)

Ainsi, la surexpression d'eEF2 et de la sous unité β de type 7 du protéasome témoigne d'une activité cellulaire intense. Au vu de leur rôle central dans le métabolisme cellulaire, nos données suggèrent que leur activité est sous-jacente à tous les processus engagés par la cellule après transplantation.

Toutefois, l'identification de ces cibles moléculaires potentielles doit être validée, afin de préciser si leur activité est spécifique à la transplantation d'îlots. Pour ce faire, la réalisation d'une analyse similaire est nécessaire sur les prélèvements provenant d'animaux injectés avec des billes.

Cette partie a permis de comprendre le rôle propre de l'îlot dans la survenue de l'inflammation et de décrire la cinétique des évènements durant les 24 premières heures post transplantation. L'étude histologique est la première du genre et devrait permettre de mieux revoir le concept de l'inflammation précoce post transplantation.

5.4 Prévention des réactions inflammatoires précoces

Afin de prévenir l'inflammation au cours de la transplantation d'îlots, nous avons développé plusieurs stratégies. Etant donné que l'îlot joue son rôle dans le développement de ces réactions, une des stratégies consiste à traiter l'îlot *in vitro* afin de prévenir le développement de son phénotype pro-inflammatoire et pro-oxydant. Toutefois, nous pensons qu'au-delà du traitement anti-rejet pris par le receveur, une autre approche visant à limiter les réactions inflammatoires précoces inhérentes au site d'implantation devrait être développée.

De plus, comme démontré précédemment, la mise en place des moyens de défense de l'îlot (IL-10, HO-1) contre le stress inflammatoire et oxydant est retardée. Ainsi, une induction rapide de ces défenses devrait permettre de lutter plus efficacement contre ce stress. Pour ce faire, nous avons préalablement démontré que l'induction de *Ho-1* ou l'inhibition de la voie de signalisation des TLRs permettait de limiter le phénotype pro-inflammatoire et pro-oxydant de l'îlot. Maintenant, nous allons étudier si la pré-incubation des îlots avec de l'IL-10 (cytokine anti-inflammatoire) ou de la rapamycine (molécule anti-rejet avec des propriétés anti-inflammatoires utilisée pour la transplantation d'îlots) dans le milieu de culture peut également limiter ou prévenir ces réactions inflammatoires.

- **La rapamycine et l'IL-10 limitent la sécrétion d'IL-6 par les îlots pancréatiques**

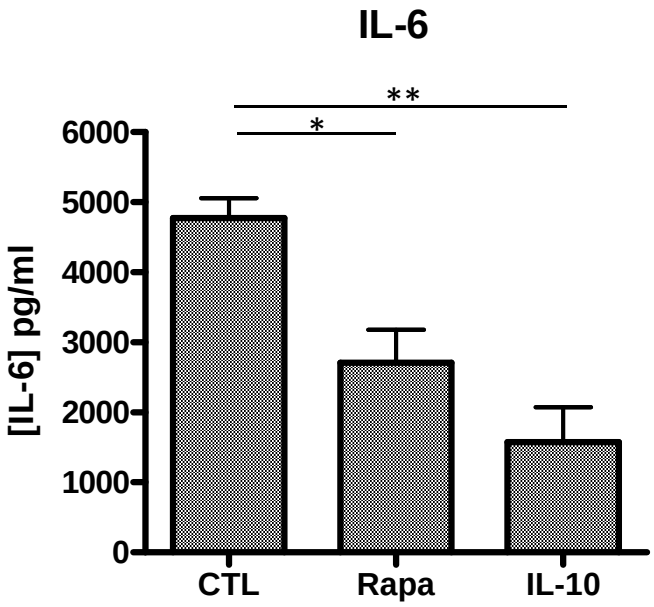


Figure 5-41. Quantification par test ELISA de la sécrétion d'IL-6 par les îlots pancréatiques.

Les surnageants de culture d'îlots pancréatiques sont récoltés après 24H de culture. Les îlots pancréatiques sont cultivés en présence de milieu M199 sans traitement (CTL), avec 100 pg/ml de rapamycine (Rapa) ou 10 ng/ml d'interleukine-10 (IL-10). Les résultats sont exprimés en picogramme de protéine par millilitre de surnageant selon la

valeur moyenne ± ESM. Chaque expérience est effectuée au moins trois fois de manière indépendante en doublet. *p<0,05 ;p<0,01.**

D'après la **figure 4-41**, la rapamycine ou l'interleukine-10 (IL-10) diminue significativement la sécrétion d'IL-6 par rapport aux contrôles. En effet, les quantités d'IL-6 dans le surnageant des îlots après traitement avec de la rapamycine (2705,8 pg/ml ± 469,26, p<0,05) ou avec de l'IL-10 (1578,3 pg/ml ± 494,42, p<0,01) sont significativement plus faibles par rapport à celle présentes dans les surnageants contrôles (4772,8 pg/ml ± 282,5).

- **La rapamycine et l'IL-10 limitent la production de ROS par les îlots pancréatiques**

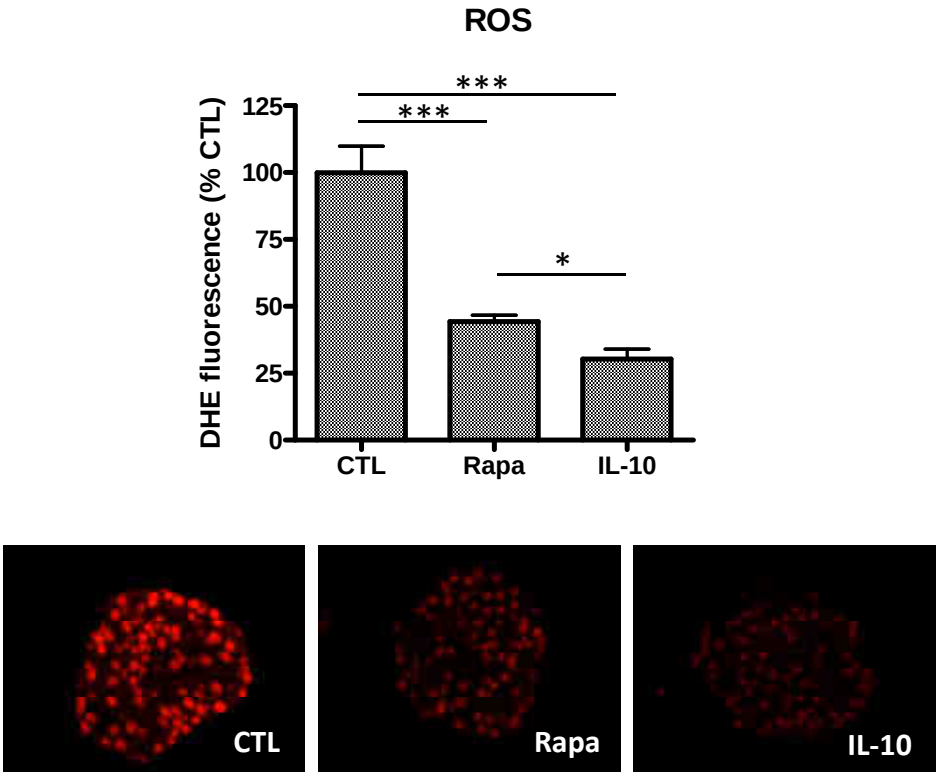


Figure 5-42. Quantification des espèces réactives de l'oxygène (ROS) produites par les îlots pancréatiques de Rat à l'aide d'une sonde de Dihydroéthidium (DHE) après traitement.

Les îlots pancréatiques sont traités pendant 24H avec de la rapamycine (Rapa) ou de l'interleukine-10 (IL-10). Les îlots pancréatiques non traités sont considérés comme contrôles (CTL). Les résultats sont exprimés en valeur moyenne ± ESM de la fluorescence émise par la sonde DHE. Chaque expérience est effectuée de manière indépendante avec au moins trois lames différentes et pour chaque expérience les intensités de fluorescence sont mesurées à partir de 5 îlots pancréatiques différents. *p<0,05, ***p<0,001.

La rapamycine inhibe la production de ROS (44,3 % ± 2,15; p<0,001) (**fig.4-42)**. L'IL-10 induit également une diminution significative (30,3 % ± 3,3, p<0,001) de la quantité de ROS par rapport aux conditions contrôles sans traitement (100 % ± 8,8). Toutefois, comparée à la rapamycine, cette inhibition est significativement plus importante (p<0,05) en présence d'IL-10.

- **La rapamycine et l'IL-10 n'influencent pas l'expression d'HO-1 de l'îlot pancréatique**

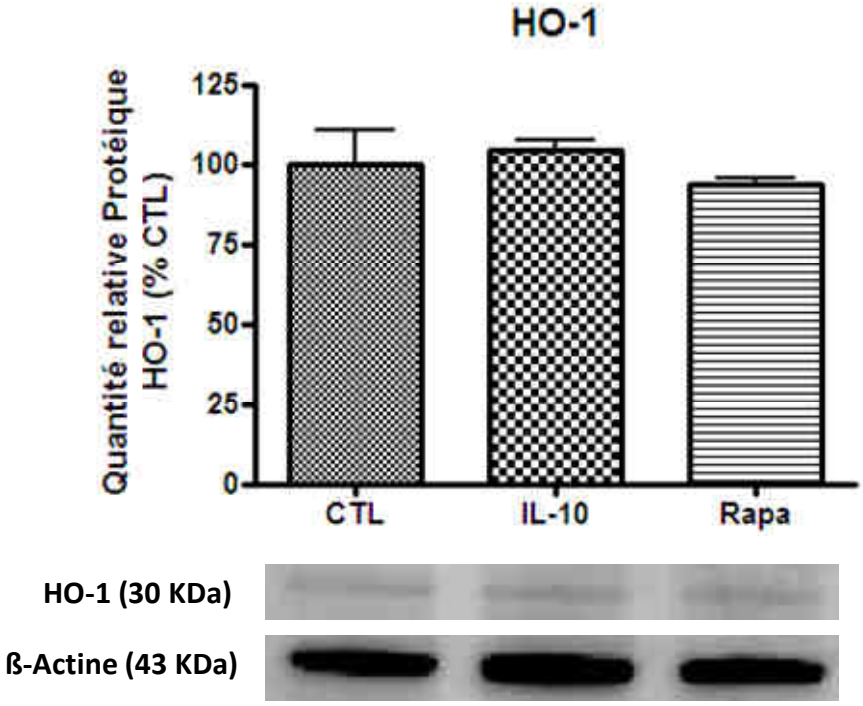


Figure 5-43. Quantification l'expression protéique (Western Blot) de HO-1 induite par l'IL-10 (IL-10) et la rapamycine (rapa) dans des îlots pancréatiques de rat.

Les protéines d'îlots sont extraites après 24H de culture en présence d'IL-10 (10 ng/ml) ou de rapamycine (100 pg/ml). L'expression protéique, exprimée par rapport au ratio HO-1 / ACTINE, est reportée selon la valeur moyenne ± ESM du pourcentage de la quantité relative de protéines par rapport au contrôles (CTL). Chaque expérience est effectuée au moins trois fois de manière indépendante (en doublet pour la qPCR).

Quel que soit le traitement (IL-10 ou rapa) reçu par l'îlot, l'expression de HO-1 n'est pas significativement modulée. L'expression relative de HO-1 est de 104, 4 % ± 2,7 en présence de rapamycine, 93,7 % ± 1,73 en présence d'IL-10 ou 100 % ± 7,9 pour les îlots contrôles.

- **L'induction de Ho-1, l'inhibition des TLRs et le traitement IL-10 des îlots pancréatiques diminuent la migration macrophagique**

Après avoir démontré que l'IL-10 et la rapamycine peuvent diminuer l'inflammation et le stress oxydant de l'îlot, nous avons décidé de modéliser le recrutement des macrophages qui jouent un rôle important dans la destruction des îlots post-transplantation. Ainsi, nous avons étudié l'influence que peut induire le traitement des îlots sur la migration macrophagique *in vitro*. En pratique, nous avons utilisé des surnageants de culture d'îlots traités ou non. Après

24 heures de culture, ces surnageants contiennent un panel de cytokines susceptibles de favoriser la migration macrophagique. Ainsi, nous avons évalué le pouvoir chimioattractant de chaque surnageant.

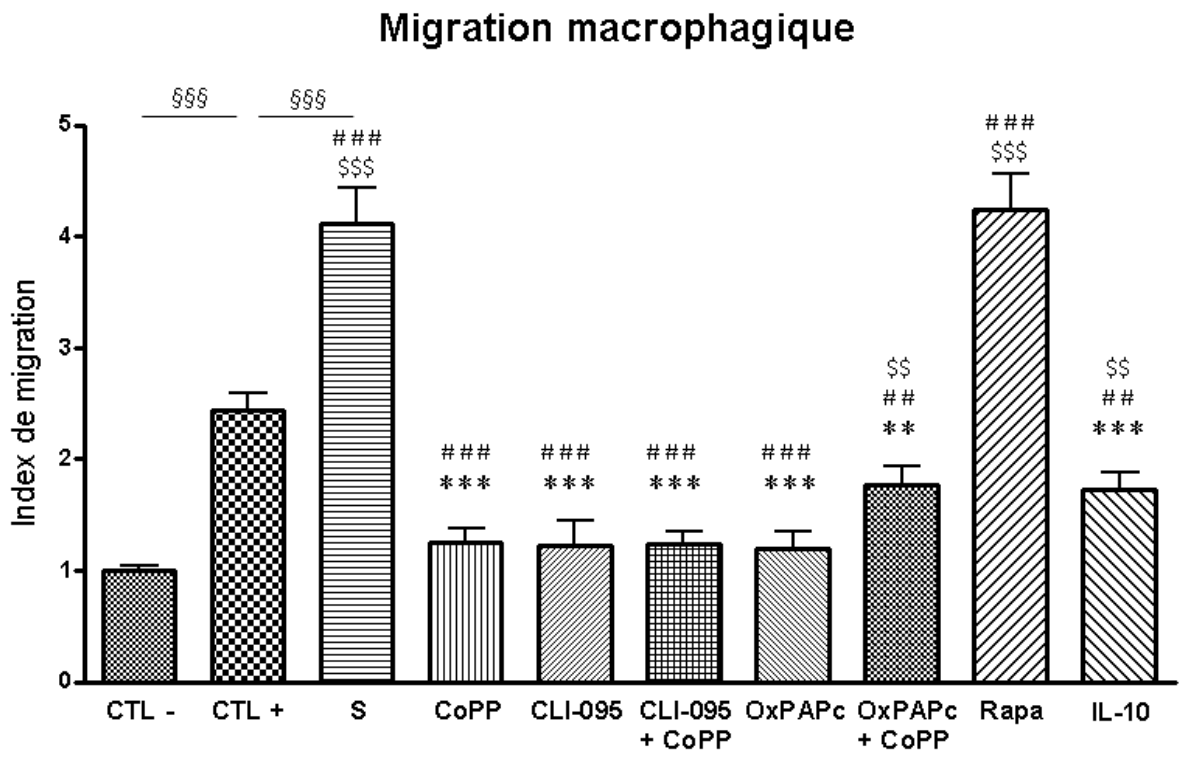


Figure 5-44. Evaluation de la migration macrophagique induite par le surnageant d'îlots traités ou non.

Les surnageants de culture d'îlots pancréatiques sont prélevés après 24H de culture. Au préalable, les îlots pancréatiques sont traités ou non (S) pendant 24H avec de la protoporphyrine de Cobalt (CoPP) ou CLI-095 ou OxPAPc ou de la rapamycine (Rapa) et de l'interleukine-10 (IL-10). Suivant les conditions CoPP est associé ou non sous forme d'un co-traitement (CLI-095 + CoPP; OxPAPc + CoPP). Les îlots pancréatiques cultivés sans traitement (CTL -) ou en présence de fMLP (CTL+) sont considérés comme contrôles négatifs et positifs respectivement. Après migration en chambre de Boyden modifiée, les valeurs de l'index de migration sont déterminées pour les macrophages et sont exprimées selon la moyenne ± ESM. Chaque expérience est effectuée au moins quatre fois de manière indépendante en doublet. **p<0,01*p<0,001 par rapport au surnageant d'îlots non traités. # #p<0,01, # # #p<0,001par rapport au CTL+. $$p<0,01, $$$p<0,001 par rapport au CTL -. §§§p<0,001.**

D'après la **figure 4-44**, le surnageant de culture d'îlots pancréatiques induit une migration macrophagique significativement (p<0,001) plus importante qu'en présence de fMLP (4,1 ± 0,13 vs 2,5 ± 0,13 respectivement). Mis à part la rapamycine, tous les traitements utilisés pour les îlots induisent une diminution significative de la migration macrophagique par rapport au surnageant sans traitement. En effet, les index de migration sont diminués pour le traitement avec CoPP (1,2 ± 0,1 (p<0,001)), CLI-095 (1,2 ± 0,2 (p<0,001)), CLI-095 + CoPP (1,2 ± 0,1 (p<0,001)), OxPAPc (1,2 ± 0,1 (p<0,001)), OxPAPc + CoPP (1,8 ± 0,2 (p<0,01)) et IL-10

(1,7 ± 0,14 (p<0,001)). D'ailleurs les index de migration sont équivalents à celui du CTL – (1 ± 0,04) pour tous les traitements mentionnés sauf pour OxPAPc + CoPP et IL-10 dont les index restent significativement plus élevés (p<0,01). Par contre, la migration macrophagique en présence de surnageant d'îlots traités avec de la rapamycine est équivalent à celui du surnageant d'îlots non traités (4,2 ± 0,3).

D'après les résultats obtenus, les effets anti-inflammatoires de la rapamycine sont limités et donc le traitement du donneur avec la rapamycine ne permet pas de diminuer la migration macrophagique. Par conséquent, nous avons dans une seconde partie fait le choix d'agir directement sur les macrophages avec la rapamycine afin d'évaluer le rôle du prétraitement du receveur dans la limitation de ces réactions inflammatoires

- **La rapamycine induit une diminution de l'activité mitochondriale macrophagique**

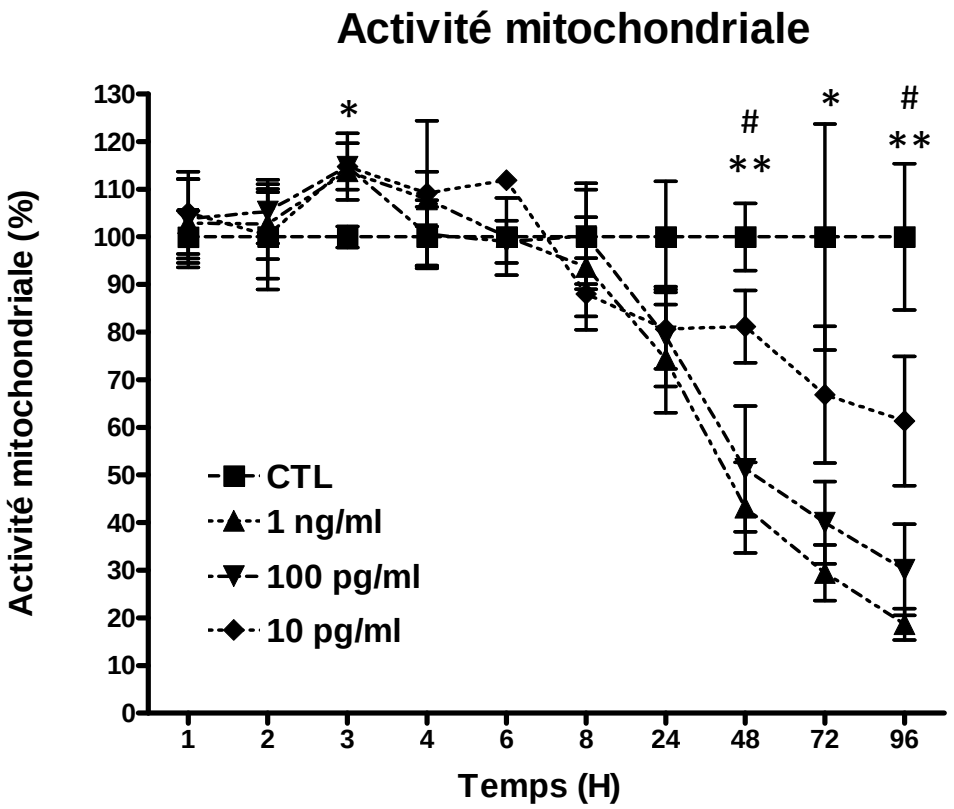


Figure 5-45. Evaluation de l'activité mitochondriale macrophagique induite par la rapamycine.

Les macrophages sont traités avec 1ng/ml, 100pg/ml ou 10pg/ml de rapamycine. L'activité mitochondriale est évaluée par Cell Titer® après 1H, 2H, 3H, 4H, 6H, 8H, 24H, 48H, 72H, 96H de traitement. Les échantillons sans traitement sont considérés comme les échantillons contrôles (CTL). Les résultats sont exprimés selon le pourcentage d'activité mitochondriale. Les valeurs correspondent à la moyenne ± ESM. Chaque expérience est effectuée au moins trois fois de manière indépendante en doublet. **p<0,01, *p<0,05 comparaison entre les échantillons CTL et le traitement 1ng/ml. # <0.05 comparaison entre les échantillons CTL et le traitement 100 pg/ml.

Dans un premier temps, nous avons évalué l'action directe de la rapamycine sur les macrophages. Ainsi, quel que soit la concentration de rapamycine utilisée, nous démontrons que l'activité mitochondriale macrophagique est affectée. En effet, après 24 heures d'incubation, le pourcentage d'activité mitochondriale diminue significativement de manière dose- et temps-dépendante. Après 96 heures de traitement, le pourcentage d'activité mitochondriale est de 18,7 % ± 3,3 ($p<0,01$) et 30,1% ± 9,6 ($p<0,05$) pour des concentrations de rapamycine respectivement de 1 ng/ml et 100 pg/ml (**Fig. 4-45**). Ce test MTS nous permet de déterminer 100 pg / ml comme la concentration de référence pour la suite de l'étude.

- **La Rapamycine induit une apoptose macrophagique**

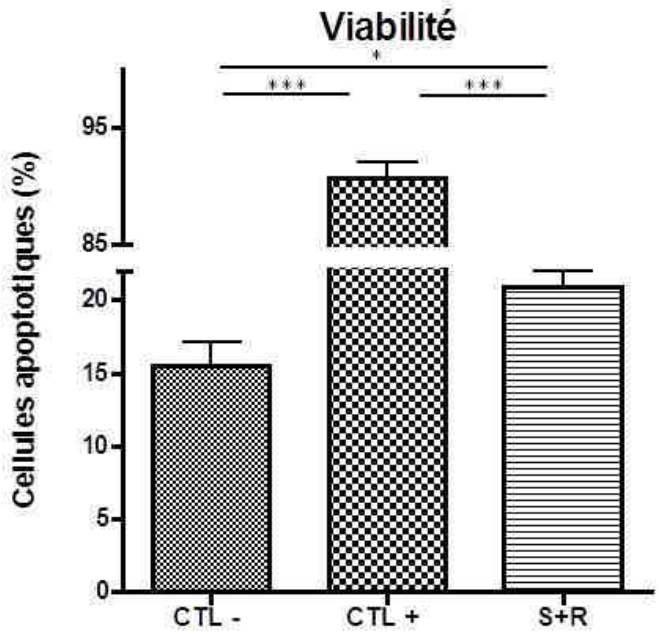


Figure 5-46. Evaluation de l'apoptose macrophagique induite par la rapamycine

Les macrophages sont traités avec 100 pg/ml de rapamycine (S+R) ou avec de la staurosporine (CTL+). Les échantillons sans traitement sont considérés comme les échantillons contrôles (CTL). Après analyse par cytométrie en flux, les résultats sont exprimés selon le pourcentage de cellules apoptotiques marquées positivement à l'annexine V. Les valeurs correspondent à la moyenne ± ESM. Chaque expérience est effectuée au moins trois fois de manière indépendante en doublet. ***p<0,001, *p<0,05.

La staurosporine (CTL^+) (90,6 % cellules apoptotiques ± 1,4 ; $p< 0,001$) induit une apoptose macrophagique massive par rapport à la condition contrôle (CTL^-) (15,6 % cellules apoptotiques ± 1,5). La rapamycine induit également une augmentation significative de l'apoptose macrophagique (20,9% cellules apoptotiques ± 1,06, $p<0,05$) par comparaison aux conditions CTL^- (**Fig. 4-42**).

- **La rapamycine induit une diminution de la migration macrophagique**

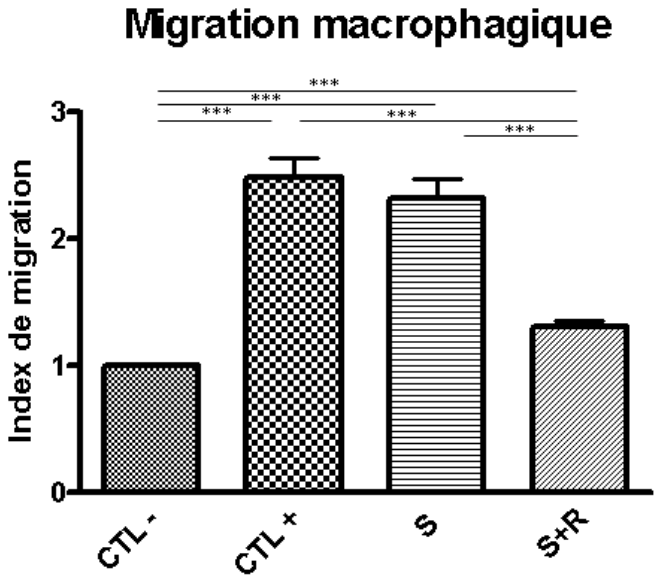


Figure 5-47. Evaluation de la migration macrophagique induite par la rapamycine

Les macrophages sont cultivés en présence de 10^{-6} M de fMLP (CTL+), de surnageant d'îlots pancréatiques avec (S + R) ou sans (S) rapamycine (100 pg/ml). Les échantillons sans traitement sont considérés comme les échantillons contrôles (CTL-). Après migration en chambre de Boyden modifiée, les valeurs de l'index de migration sont déterminées et sont exprimées selon la moyenne ± ESM. Chaque expérience est effectuée au moins quatre fois de manière indépendante en doublet. ***p<0,001

D'après la **figure 4-47**, les index de migration sont calculés lorsqu'il y a activation macrophagique c'est-à-dire soit en présence de fMLP (CTL^+, N-formyl-methionine-leucine-phenylalanine), soit en présence de surnageant d'îlots de rat (S) et leurs valeurs sont respectivement de 2,49 ± 0,15 et de 2,32 ± 0,15. Par comparaison aux valeurs obtenues pour le CTL^+, la rapamycine (100 pg / ml) induit une inhibition significative de la migration macrophagique, en rapport avec la valeur d'index calculé, soit 1,31 $^+/_-$ 0,04 (p<0,001).

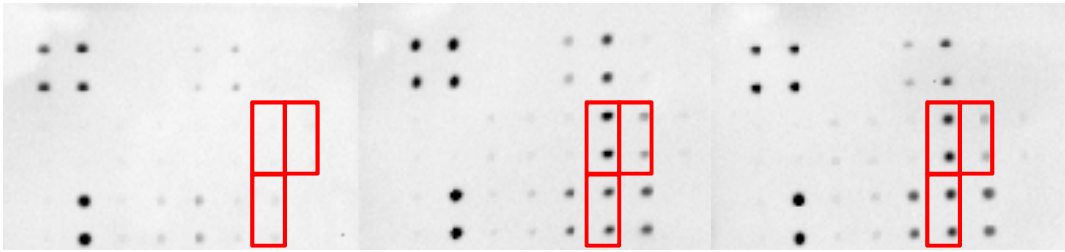
- **La rapamycine et le surnageant de culture d'îlots pancréatiques module la sécrétion macrophagique d'IL-6, d'IL-10 et de TNF-α**

Parmi les 19 cytokines susceptibles d'être détectées, seulement 12 d'entre elles se révèlent présentes dans les surnageants analysés, d'après la **figure 4-48**. L'analyse se limite aux cytokines dont le profil d'expression varie en fonction des traitements, ainsi seulement 3 d'entre elles, les plus pertinentes sont étudiées plus précisément: TNF-α, IL-6, IL-10.

A

	a	b	c	d	e	f	g	h
1	Pos	Pos	Neg	Neg	CINC-2	CINC-3	CNTF	Fractakline
2	Pos	Pos	Neg	Neg	CINC-2	CINC-3	CNTF	Fractakline
3	GM-CSF	IFN-γ	IL-1$^{\alpha}$	IL-1β	IL-4	IL-6	IL-10	LIX
4	GM-CSF	IFN-γ	IL-1α	IL-1β	IL-4	IL-6	IL-10	LIX
5	Leptine	MCP-1	MIP-3α	β-NGF	TIMP-1	TNF-α	VEGF	BLANC
6	Leptine	MCP-1	MIP-3α	β-NGF	TIMP-1	TNF-α	VEGF	BLANC

B



M199 S S + R

Figure 5-48. (A) Localisation des anticorps anti-cytokines (B) analyse des surnageants de culture macrophagiques par Cytokine Antibody Arrays®.

Le surnageant de culture macrophagique est récolté après 24H de culture. Les macrophages sont cultivés en présence de milieu M199 (M199), de surnageants d'îlots pancréatiques supplémentés (S+R) ou non (S) avec de la rapamycine. Chaque expérience est effectuée au moins trois fois de manière indépendante en doublet. ***p<0,001, **p<0,01.

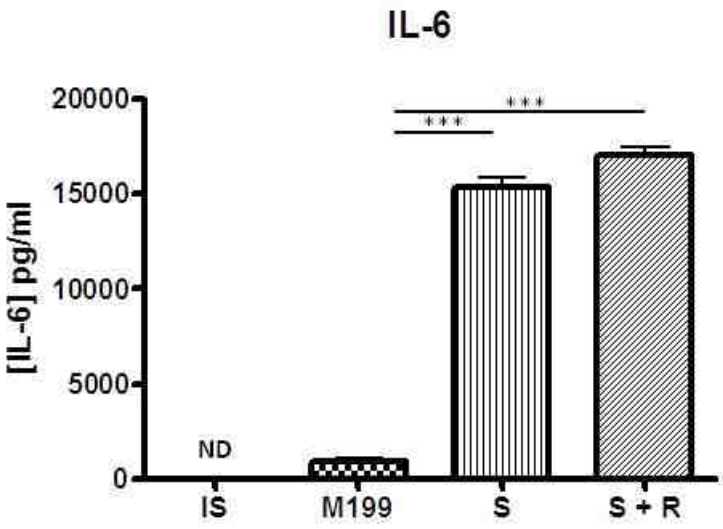


Figure 5-49. Quantification par test ELISA de la sécrétion d'IL-6 macrophagique de cytokines.

Les surnageants de culture macrophagiques sont récoltés après 24H de culture. Les surnageants de culture d'îlots (IS) sont recoltés après 48H de culture. Les macrophages sont cultivés en présence de milieu M199 (M199), de surnageant d'îlots pancréatiques supplémenté (S+R) ou non (S) avec de la rapamycine. Les résultats sont exprimés en picogramme de protéine par millilitre de surnageant selon la valeur moyenne ± ESM. Chaque expérience est effectuée au moins trois fois de manière indépendante en doublet. ***p<0,001.

D'après la **figure 4-49**, la quantité d'IL-6 présente dans le surnageant de culture d'îlots pancréatiques est indétectable (les conditions expérimentales sont différentes que les précédentes). Toutefois la quantité d'IL-6 présente dans le surnageant de culture de macrophages non traités (925,5 pg / ml ± 123,9) est environ 16 fois inférieure à celle de l'IL-6 présent dans le surnageant de macrophages traités avec du surnageant d'îlots (15311,4 pg / ml ± 553,1). La présence de rapamycine augmente la sécrétion d'IL-6 par les macrophages (17045,1 pg / ml ± 424,7) comparée à la valeur d'IL-6 en présence de surnageants d'îlots seuls.

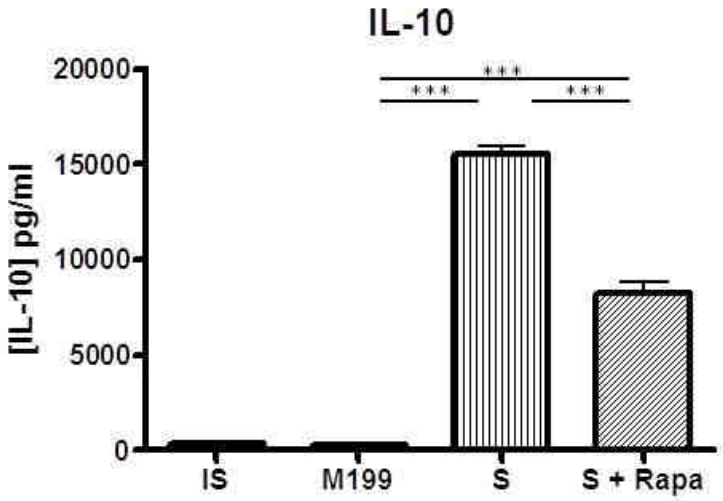


Figure 5-50. Quantification par test ELISA de la sécrétion d'IL-10 macrophagique de cytokines.

Les surnageants de culture macrophagiques sont récoltés après 24H de culture. Les surnageants de culture d'îlots (IS) sont recoltés après 48H de culture. Les macrophages sont cultivés en présence de milieu M199 (M199), de surnageants d'îlots pancréatiques supplémentés (S+R) ou non (S) avec de la rapamycine. Les résultats sont exprimés en picogramme de protéine par millilitre de surnageant selon la valeur moyenne ± ESM. Chaque expérience est effectuée au moins trois fois de manière indépendante en doublet. ***p<0,001.

D'après la **figure 4-50**, la quantité d'IL-10 dans le surnageant d'îlot (350,7 pg / ml ± 57,4) est équivalente à la quantité d'IL-10 présente dans le surnageant de culture de macrophages non traités (249,8 pg / ml ± 89,2). Le traitement des macrophages avec du surnageant d'îlots induit une augmentation significative de la production d'IL-10 par les macrophages (15520,2 pg / ml ± 418,9 ; p<0,001) comparée à la quantité d'IL-10 sécrétée par les macrophages non traités dans milieu seul. En revanche, à l'inverse de la tendance observée pour IL-6, la présence de rapamycine dans le surnageant d'îlots semble induire une diminution significative de la libération d'IL-10 (8271,7 pg / ml ± 518,12 ; p<0,001) par rapport au traitement des macrophages avec du surnageant d'îlots seul.

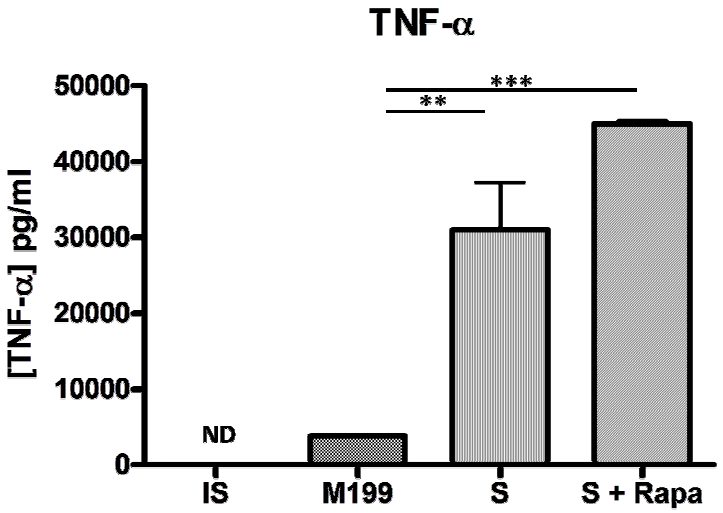


Figure 5-51. Quantification par test ELISA de la sécrétion de TNF-α macrophagique de cytokines.

Les surnageants de culture macrophagiques sont récoltés après 24H de culture. Les surnageant de culture d'îlots (IS) sont recoltés après 48H de culture. Les macrophages sont cultivés en présence de milieu M199 (M199), de surnageants d'îlots pancréatiques supplémentés (S+R) ou non (S) avec de la rapamycine. Les résultats sont exprimés en picogramme de protéine par millilitre de surnageant selon la valeur moyenne ± ESM. Chaque expérience est effectuée au moins trois fois de manière indépendante en doublet. ***p<0,001 ; **p<0,01.

D'après la **figure 4-51**, la quantité de TNF-α présente dans le surnageant de culture d'îlots pancréatiques est indétectable. Toutefois la quantité de TNF-α présente dans le surnageant de culture de macrophages non traités (3798,2 pg / ml ± 172,7) est environ 8 fois inférieure à la quantité de TNFα présent dans le surnageant de macrophages traités avec du surnageant d'îlots (30976,4 pg / ml ± 6247,6 ; p<0,01). La présence de rapamycine augmente la sécrétion de TNFα par les macrophages comme en témoigne la valeur suivante (45003 pg / ml ± 477,7) comparée à la valeur d'IL-6 en présence de surnageant d'îlots seul.

- **La rapamycine et le surnageant de culture d'îlots pancréatiques modulent la phosphorylation de mTOR et JAK-2**

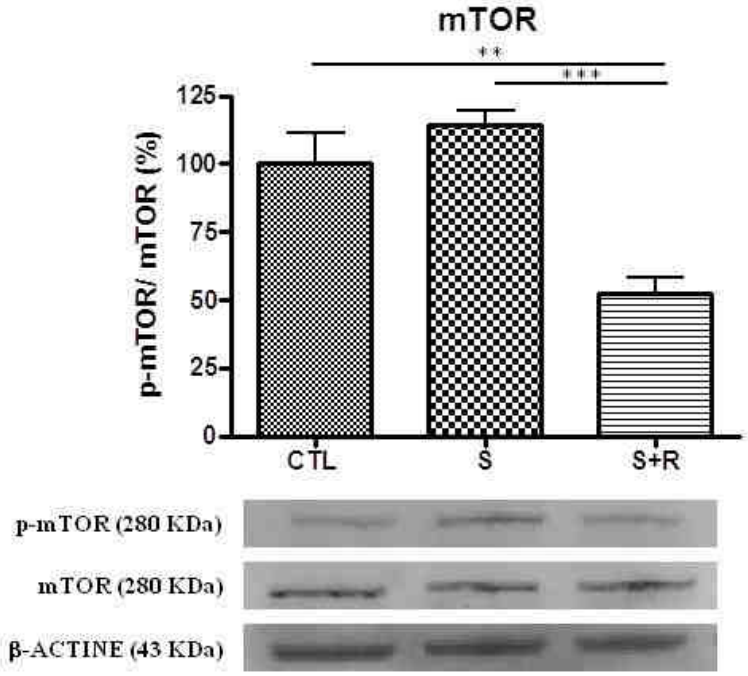


Figure 5-52. Quantification du taux de phosphorylation des protéines gènes mTOR par Western Blot.

Les macrophages sont cultivés pendant 24 heures en présence de surnageant d'îlots pancréatiques avec (S + R) ou sans (S) rapamycine (100 pg/ml). Les échantillons contrôles (CTL) correspondent aux échantillons traités avec du M199 supplémenté pour mTOR. Les résultats sont exprimés selon la valeur moyenne ± ESM du pourcentage du taux de phosphorylation correspondant au ratio PROTEINE phosphorylée normalisée / PROTEINE totale normalisée. Chaque expérience est effectuée au moins trois fois de manière indépendante. ***p<0,001, *p<0,01.

Afin de valider notre modèle expérimental, nous avons testé les effets de la rapamycine sur l'expression de mTOR (« mammalian Target of Rapamycin »). D'après la **figure 4-52**, le surnageant d'îlots induit une augmentation non significative de la phosphorylation de mTOR (114,3 % ± 5,5) par rapport aux conditions contrôles (100 % ± 11,38). Mais, l'ajout de rapamycine inhibe significativement la phosphorylation de mTOR (52,3 % ± 6,05 ; p<0,01) par rapport à la phosphorylation induite par le surnageant seul.

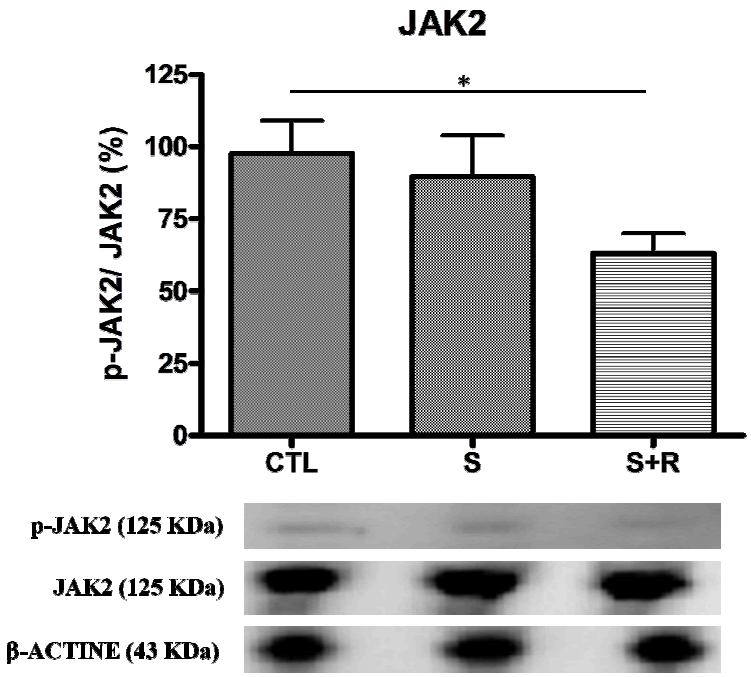


Figure 5-53. Quantification du taux de phosphorylation des protéines gènes JAK-2 par Western Blot

Les protéines de macrophages sont extraites après 24H de culture. Les macrophages sont cultivés en présence de surnageant d'îlots pancréatiques avec (S + R) ou sans (S) rapamycine (100 pg/ml). Les échantillons contrôles (CTL) correspondent aux échantillons traités avec RANTES (100 pg / ml) pour JAK2. Les résultats sont exprimés selon la valeur moyenne ± ESM du pourcentage du taux de phosphorylation correspondant au ratio PROTEINE phosphorylée / PROTEINE totale. Chaque expérience est effectuée au moins trois fois de manière indépendante. ***p<0,001, *p<0,01, *p<0,05.

D'après la **figure 4-53**, CCL5 (93% ± 13,6) et le surnageant d'îlots pancréatiques (89,6 ± 3,8) induisent une phosphorylation équivalente de JAK2. Toutefois, la rapamycine est capable d'induire une diminution significative du taux de phosphorylation (63 % ± 12,2, p<0,05) par rapport aux conditions contrôles.

5.4.1 Discussion : traiter les îlots et le receveur pour limiter l'inflammation au cours de la transplantation d'îlots

Après avoir constaté que l'induction de *Ho-1* et l'inhibition de la voie des TLRs diminuaient le phénotype pro-inflammatoire et pro-oxydant de l'îlot *in vitro*, nous avons étudié les bénéfices que pourraient apporter l'IL-10 et la rapamycine (dont l'usage clinique est validé) dans ce processus inflammatoire. Ainsi, nous avons démontré que la rapamycine et l'IL-10 peuvent diminuer également les stress inflammatoire et oxydant développés par l'îlot *in vitro* via un mécanisme HO-1 indépendant. Bien que Lee et Chau (2002) aient démontré qu'IL-10 induit l'expression d'HO-1 dans un modèle macrophages murins, nos observations ne vont pas dans ce sens. Cependant les effets anti-inflammatoire et antioxydant sont réels et confirment les bénéfices que pourrait apporter IL-10 durant la culture des îlots. Ceci est d'autant plus vrai que IL-10 est capable de stimuler la fonction des cellules β pancréatiques *in vitro* (Sandler & Welsh, 1993). Bien que les propriétés anti-inflammatoires de la rapamycine soient connues (Attur, et al., 2000), la rapamycine est utilisée uniquement comme traitement immunosuppresseur pour la transplantation d'îlots. Nos résultats sont en accord avec les données de la littérature (Mita, et al., 2008; Shin, et al., 2011) et soulignent le potentiel anti-inflammatoire et antioxydant de la rapamycine. Ainsi, les effets anti-inflammatoires de la rapamycine semblent bénéfiques pour les îlots en culture et devraient être utilisés pour améliorer les préparations d'îlots pancréatiques comme l'avait déjà souligné une autre étude (Mita, et al., 2008). De plus, les effets favorables de la rapamycine pourraient être renforcés par le rôle majeur que joue les TLRs dans le développement de l'inflammation de l'îlot. En effet, une étude a démontré que la rapamycine est capable de supprimer la production d'IL-6 induite par TLR-4 dans un modèle de cellules cancéreuses (Sun, et al., 2008).

Ensuite, nous avons cherché à modéliser *in vitro* le recrutement des macrophages après transplantation. Pour ce faire, nous avons évalué le pouvoir chimioattractant des surnageants d'îlots pancréatiques après 24 heures de culture. Tous les traitements appliqués (sauf la rapamycine) diminuent la migration macrophagique. Ces données ne font que confirmer les résultats préalablement établis sur l'inhibition de la production de cytokines observée avec ces mêmes traitements, notamment CCL2. En revanche, bien que la rapamycine exerce des fonctions inhibitrices similaires sur la production de cytokines des îlots, aucun effet n'est observé sur le chimiotactisme macrophagique induit par le surnageant d'îlots.

Par le biais de cette première partie, nous avons démontré tout l'intérêt de traiter les îlots en culture. Toutefois, les résultats obtenus avec la rapamycine ne sont pas satisfaisants. Dans ce

contexte, nous décidons d'explorer le lien entre la rapamycine et l'activation macrophagique. Cette étude vise à savoir si la rapamycine peut être utilisé chez le receveur comme traitement anti-inflammatoire dirigé spécifiquement contre les macrophages.

Nos résultats confirment que la rapamycine est capable d'induire une diminution de l'activité mitochondriale chez le macrophage. Toutefois, le test MTS reflète deux processus cellulaires, à savoir la prolifération cellulaire et le métabolisme mitochondrial. Dans nos expériences, la Rapa ne peut pas réduire la prolifération des macrophages, puisque que ce sont des cellules non-proliférantes. Par contre, la Rapa aurait un effet inhibiteur sur le métabolisme mitochondrial (Ramanathan & Schreiber, 2009), ce qui conforte nos résultats. Cette diminution de l'activité mitochondriale est associée à une augmente de l'apoptose chez les macrophages traités avec de la rapamycine. Nos résultats confirment une étude antérieure (Mercalli, et al., 2006) qui avait déjà démontré que la rapamycine induisait une mort cellulaire par apoptose des monocytes humains.

D'autre part, nous avons démontré une diminution de la migration des macrophages *in vitro*. Nos résultats sont en accord avec ceux de Gomez-Cambreno (Gomez-Cambronero, 2003) qui a démontré une inhibition de la migration des neutrophiles exercée par la Rapa. Ensemble, notre travail et celui de Gomez-Cambreno confirment le rôle inhibiteur de la Rapa contre les deux leucocytes prédominants de l'infiltration des îlots transplantés (Moberg, et al., 2005). Ainsi, ces résultats suggèrent que la rapamycine pourrait réduire l'attraction des macrophages au site de la greffe.

Le rôle des chimiokines sécrétées par des îlots sur l'activation des macrophages a déjà été décrit (Sigrist, et al., 2004). Dans cette étude, nous avons déterminé le rôle de ces chimiokines sur la libération de cytokines macrophagiques. Nous avons montré que parmi toutes les cytokines analysées, seulement 3 apparaissent sécrétées par les macrophages après induction par du surnageant de culture d'îlots pancréatiques : IL-6, IL-10 et TNF-α.

Au cours de la transplantation d'îlots, plusieurs médiateurs sont à l'origine du dysfonctionnement et / ou de la mort cellulaire des îlots pancréatiques y compris les cytokines inflammatoires comme l'IL-1β, IL-6, TNF-α et d'IFN-γ (Barshes, et al., 2005; van der Windt, et al., 2007). En revanche, notre étude a montré que seule la sécrétion d'IL-10 a été inhibée par la Rapa. Cette cytokine anti-inflammatoire est reconnue pour sa capacité à inhiber l'activation et les fonctions effectrices des cellules T, des monocytes et des macrophages (Moore, et al., 2001). Toutefois, ces données étaient attendues puisque le contrôle de l'IL-10 par la phosphatidylinositol-3-phosphate kinase (PI3K) est bien connu (Baker, et al., 2009). De plus, il est démontré que la production de médiateurs inflammatoires *versus* médiateurs anti-

inflammatoires est contrôlée strictement. En effet, l'équilibre doit être maintenu pour garder le contrôle de la fonction immunitaire et éviter l'endommagement des organes vitaux (Dahle, et al., 2004). Nos résultats soulignent donc le déséquilibre de la balance cytokinique induit par la Rapa, en faveur des cytokines pro-inflammatoires.

D'une part, pour comprendre les voies de signalisation moléculaire empruntée par la Rapa, nous avons tout d'abord confirmé l'inhibition de l'activation de la protéine mTOR induite par la Rapa (Sabers, et al., 1995). D'autre part, nous avons analysé une autre voie de signalisation pour déterminer les événements de signalisation conduisant à l'inhibition du chimiotactisme des macrophages et à la production d'IL-10 par la rapamycine. La voie des chimiokines semblait être une cible potentielle, car elle joue un rôle important pour transmettre les signaux de la migration des leucocytes (Sigrist, et al., 2005). Des études antérieures ont démontré que la protéine kinase JAK2 est impliquée dans la régulation de la production de TNF α-, IL-6 et IL-10 macrophagique (Dahle, et al., 2004). En outre, la pertinence de cibler JAK2 est confirmée par l'effet inhibiteur de la rapamycine sur l'activation de JAK2 dans les cellules dendritiques (Chiang, et al., 2004). Nos résultats confirment l'effet inhibiteur de la rapamycine sur JAK-2.

Ainsi, l'ensemble de ces données montrent que la rapamycine excerce un rôle anti-inflammatoire et anti-oxydant sur les îlots, mais l'absence d'effet sur la migration macrophagique suggèrent que ce processus dépend d'autres voies de signalisation. De plus, l'effet anti-inflammatoire de la rapamycine sur les macrophages est partiel. Ainsi, l'usage de la rapamycine au cours de la transplantation d'îlots doit être reconsidéré afin de préserver les îlots *in vitro* des réponses inflammatoires excessives et de limiter le recrutement des macrophages chez le receveur *in vivo*.

6 DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La transplantation d'îlots est une option thérapeutique non-invasive permettant de remplacer la masse β-cellulaire chez les diabétiques de type 1 associés à une labilité glycémique marquée et / ou des épisodes d'hypoglycémies sévères et récurrents.

Au cours des douze dernières années, des progrès importants ont permis de faire évoluer la transplantation d'îlots pancréatiques en pratique clinique. A défaut de permettre une insulino-indépendance reproductible à long terme, la transplantation d'îlots protège les diabétiques de type 1 des épisodes d'hypoglycémies sévères aussi longtemps que la fonction résiduelle du greffon est maintenue (Ryan, et al., 2004).

Malgré d'importantes évolutions, la transplantation d'îlots reste limitée en partie par la nécessité de transplanter des îlots provenant de 2-3 donneurs pour un seul receveur (McCall & Shapiro, 2012). Selon les estimations, un pancréas humain normal contient environ 500 000 îlots équivalents (IEQ) (Korsgren, et al., 2005), mais seulement 10 à 20% semblent être nécessaires pour maintenir une normoglycémie (Emamaullee & Shapiro, 2007). Les patients reçoivent approximativement 10 000 à 12 000 IEQ / kg, près de deux fois le nombre d'îlots dans un pancréas normal et beaucoup plus qu'il est nécessaire pour maintenir une insulino-indépendance (Emamaullee & Shapiro, 2007). Cette différence suggère que les îlots transplantés sont fonctionnellement déficients et / ou ne parviennent pas à s'implanter. En effet, la capacité fonctionnelle des îlots transplantés est de 20 à 40% comparée à celle d'une personne non diabétique, même chez les receveurs d'îlots insulino-indépendants (Ryan, et al., 2001). De plus, il est estimé que seulement 10 à 20% des îlots infusés survivent après transplantation (Korsgren, et al., 2005). Ceci est soutenu par des modèles animaux dans lesquels 50 à 70% des îlots transplantés sont perdus durant la période post-transplantatoire immédiate (Biarnés, et al., 2002). D'autant plus que l'implantation des îlots chez le receveur diabétique expose les îlots à un grand nombre de facteurs délétères tels que IBMIR (Instant blood mediated inflammatory reaction), l'hypoxie, l'inflammation, l'hyperglycémie, les lésions mécaniques, et les attaques du système immunitaire (McCall & Shapiro, 2012). Toutefois, les modèles de transplantation syngéniques ont clairement démontré que la majeure partie de la perte est le résultat d'événements inflammatoires (Nagata, et al., 1990). Actuellement, le succès de la greffe d'îlots pancréatiques passe par la restitution de la fonctionnalité initiale des îlots post-transplantation. Une telle stratégie devrait permettre à terme de limiter le nombre de pancréas nécessaires pour la transplantation, de revoir les objectifs pour atteindre l'insulino-

indépendance à long terme et donc de proposer cette thérapie à un plus grand nombre de personnes.

Par le biais de ce travail, nous avons fait le choix de nous concentrer sur l'inflammation qui est une composante limitante majeure de la transplantation d'îlots pancréatiques. De l'isolement à l'implantation, ce travail a pour but de caractériser et préciser les mécanismes inflammatoires inhérents à la transplantation d'îlots afin de les limiter et / ou les prévenir.

Dans un premier temps, nous avons démontré que le temps de culture génère chez l'îlot un véritable phénotype pro-inflammatoire et pro-oxydant caractérisé par la modulation de la voie des toll-like récepteurs (TLRs), la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et la génération de ROS. L'inhibition par des antagonistes des TLR-4 et TLR-2 confirme une dépendance partielle de ce processus aux voies des TLRs. De plus, l'induction du gène *Ho-1* (Hème oxygénase-1) prévient également l'établissement du phénotype pro-inflammatoire et pro-oxydant de l'îlot. Selon une approche combinée, c'est-à-dire un traitement des îlots avec des antagonistes des TLRs et l'induction de HO-1 concomitante, nous avons démontré une inhibition plus importante du statut pro-inflammatoire et pro-oxydant de l'îlot. Ces données indiquent donc un effet synergique des deux traitements (**Fig. 5-1**). Nous avons également mis en évidence que le niveau de défense de l'îlot était limité. En effet, la sécrétion d'IL-10 est quasi inexistante et l'expression de HO-1 augmente faiblement au cours des 48 heures de culture.

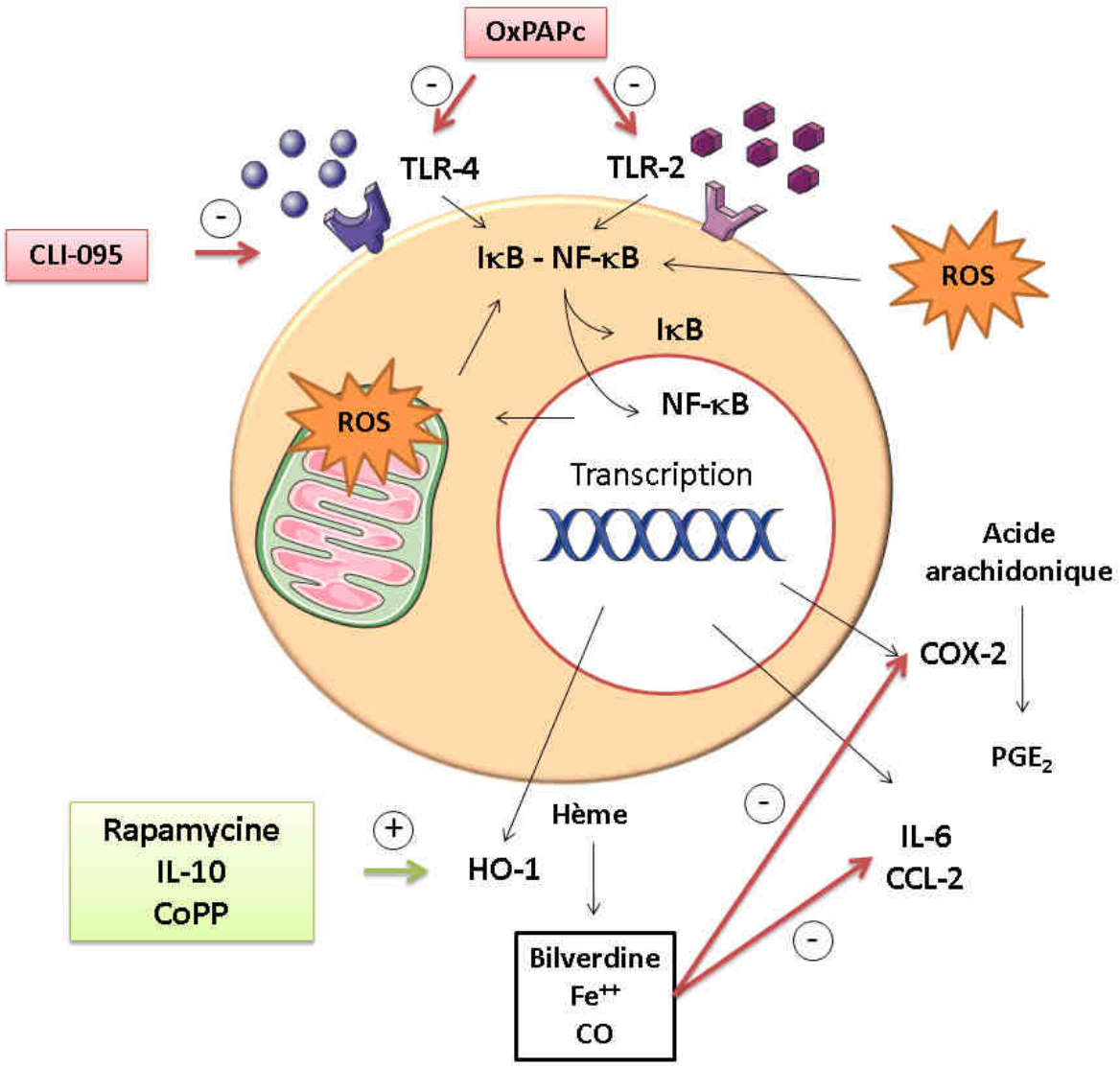


Figure 6-1. **Schéma récapitulatif du processus conduisant au phénotype pro-inflammatoire et pro-oxydant de l'îlot.**

Après isolement et en culture, les voies de l'inflammation Toll-Like récepteurs dépendantes (TLR-2 et TLR-4) sont activées. Le facteur de transcription NF-κB est transloqué dans le noyau après libération de la sous-unité IκB. La translocation de NF-κB peut également être induite par les espèces réactives de l'oxygène (ROS). NF-κB conduit aussi à la génération de ROS mitochondriales. Dans le noyau, NF-κB conduit à la transcription de gène codant les cytokines, chimiokines pro-inflammatoires (IL-6, CCL2) et la Cyclooxygénase-2 (COX-2). L'hème-oxygénase-1 (HO-1) est exprimée par les îlots, elle dégrade l'hème en Biliverdine, Fe^{++} et monoxyde de carbone (CO) qui exercent des effets anti-inflammatoires. OxPAPc et CLI-095 sont respectivement un inhibiteur des TLR-2 et TLR-4 et un inhibiteur de TLR-4. La rapamycine, l'IL-10 et CoPP (protoporphyrine de Cobalt) sont capables d'induire Ho-1.

Après avoir constaté le phénotype délétère des îlots en culture, nous avons déterminé l'impact de la transplantation d'îlots pro-inflammatoires et pro-oxydants sur le succès de la greffe. Dans ce contexte, nous avons établi un véritable modèle histologique de transplantation. Nous avons démontré que la transplantation d'îlots pancréatiques induit un processus inflammatoire précoce caractérisé par la libération de protéines de la phase aiguë de l'inflammation (IL-6 et

α2-Macroglobuline). Cette élévation des marqueurs systémiques de l'inflammation est complétée par la génération de thrombine et la libération de peptide-C qui reflète la lyse des îlots pancréatiques. De plus, il est possible de corréler la libération de peptide-C avec l'infiltration de cellules inflammatoires (macrophages, granulocytes et cellules NK) et les changements du protéome total hépatique 12 heures après transplantation. Le développement de ce modèle histologique a permis de mettre en évidence, pour la première fois, le profil cinétique du recrutement des cellules inflammatoires durant les premières heures après transplantation. Ainsi, nous avons démontré que le caractère immédiat de IBMIR se définit par son aspect thrombotique plutôt qu'inflammatoire comme en témoigne le recrutement tardif des cellules inflammatoires (**Fig. 5-2**).

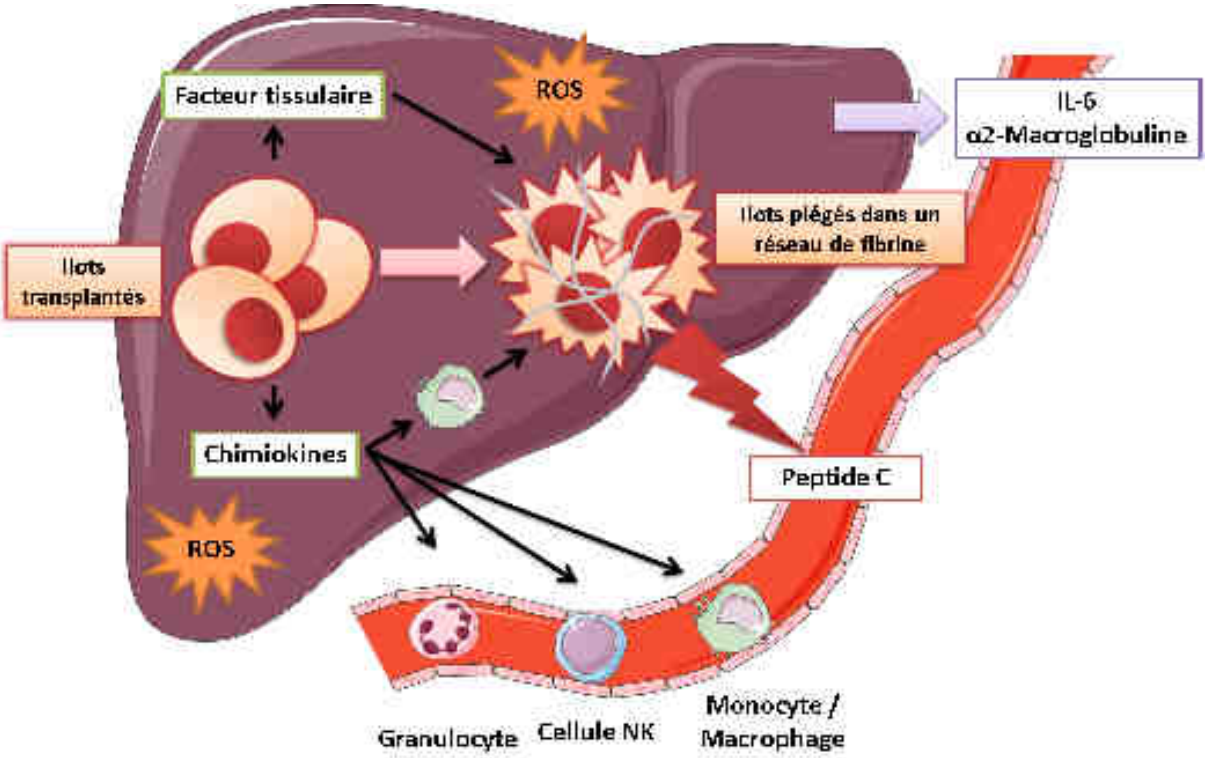


Figure 6-2. Schéma récapitulatif du processus inflammatoire précoce après transplantation d'îlots pancréatiques intraportale.

Avant transplantation, le foie des animaux diabétiques génère des espèces réactives de l'oygène (ROS). Après transplantation, l'acte chirurgical conduit à une inflammation systémique qui se traduit par la libération plasmatique d'IL-6 puis d'α2-macroglobuline. Les îlots sécrètent du facteur tissulaire et des chimiokines. Le facteur tissulaire favorise le recrutement des plaquettes et le piégeage des îlots dans un réseau de fibrine. Les chimiokines favorisent le recrutement des cellules inflammatoires (granulocyte, monocyte/macrophage, cellule NK). La lyse des îlots par les cellules inflammatoires entraîne le relargage de peptide-C dans le plasma sanguin.

Ainsi d'après nos résultats, nous sommes convaincus que la transplantation d'îlots pro-inflammatoires et pro-oxydants potentialise l'inflammation post-implantatoire. A ce jour,

nous pensons que la stratégie idéale serait de limiter l'inflammation via le traitement des îlots en culture mais également le traitement du receveur diabétique. En effet, l'inflammation est omniprésente dans la maladie diabétique. Il a ainsi été observé que le diabète de type 1 présente une augmentation de l'activation du médiateur principal de l'inflammation, NF-κB (Bierhaus, et al., 2001). De plus, des données du laboratoire (Dal-Ros, et al., 2012) confirment le statut pro-oxydant du foie chez les rats diabétiques. Toutefois, une insulinothérapie plus ciblée permettrait de prévenir ce stress oxydant hépatique. Ainsi, ces données renforcent l'établissement d'une stratégie visant à traiter préalablement le receveur voire à choisir un site d'implantation moins pro-inflammatoire et moins pro-oxydant que le foie.

Afin de prévenir l'inflammation de l'îlot *in vitro*, nous avons élaboré plusieurs stratégies. Etant donné que les défenses antioxydante et anti-inflammatoire de l'îlot se mettent en place tardivement, nous avons induit précocement *Ho-1* ou ajouté de l'IL-10 (cytokine anti-inflammatoires) au milieu de culture. Au-delà de la diminution d'IL-6 et la diminution de la production de ROS *in vitro* induites par IL-10 et *Ho-1*, nous avons observé une diminution du recrutement macrophagique *in vitro*.

Ensuite, nous avons décidé d'évaluer les propriétés anti-inflammatoires de la rapamycine, une drogue immunosuppressive, afin de démontrer les avantages que pourrait procurer l'usage de cette molécule pour prévenir l'inflammation au cours de la transplantation d'îlots. Ainsi, après traitement des îlots du donneur avec la rapamycine, nous avons constaté qu'elle induit, comme l'IL-10, une diminution de la production d'IL-6 et une diminution de la production de ROS bien qu'aucun effet n'ait été observé sur la migration macrophagique. D'autre part, le traitement des macrophages du receveur avec la rapamycine permet de réduire la migration macrophagique mais déséquilibre la balance cytokinique en inhibant la sécrétion macrophagique d'IL-10 sans influencer celle d'IL-6. Ainsi, ces résultats suggèrent que la rapamycine pourrait être utilisée différemment pendant la transplantation, un prétraitement des îlots du donneur en culture permettrait de limiter la production de cytokines pro-inflammatoire (IL-6) et la production de ROS. De plus, un pré-traitement du receveur avant transplantation pourrait s'avérer efficace en diminuant le recrutement des macrophages à l'origine de la lyse des îlots transplantés. Ainsi, la rapamycine permettrait de transplanter des îlots moins inflammés chez un receveur dont le site d'implantation est préparé à recevoir le greffon.

Par ailleurs, il faut garder à l'esprit que l'ischémie prolongée entraîne également une perte significative des îlots pancréatiques. En effet, l'hypoxie initie une cascade de réactions biochimiques qui aboutissent à la production de ROS provoquant la nécrose et l'apoptose. En

concentrations physiologiques, les ROS protègent les cellules, notamment en jouant un rôle important dans les cellules phagocytaires pour permettre une défense efficace contre l'infection. Néanmoins, chaque fois que les ROS sont accumulées en excès et pour de longues périodes, elles peuvent détruire les cellules. Les radicaux libres sont délétères pour les protéines cellulaires, les lipides membranaires et les acides nucléiques. La catalase (CAT), la superoxyde dismutase (SOD) et la glutathione peroxydase (GPx) sont les principales enzymes antioxydantes permettant une protection des cellules contre l'excès de ROS. Or, les cellules β contiennent de faibles quantités d'enzymes antioxydantes telles que CAT, SOD et de la GPx et donc leur défense contre le stress oxydant est limitée (Lenzen, et al., 1996). Ainsi, le développement d'une stratégie anti-oxydante semble justifié pour favoriser le succès de la greffe d'îlots. Dans notre cas, nous avons montré qu'il existe un lien étroit entre l'inflammation et le stress oxydant. L'induction de HO-1, une enzyme anti-inflammatoire, anti-oxydante, anti-apoptotique et pro-angiogénique (**Fig. 5-3**) permettrait d'appréhender tous les obstacles rencontrés par la transplantation d'îlots pancréatiques.

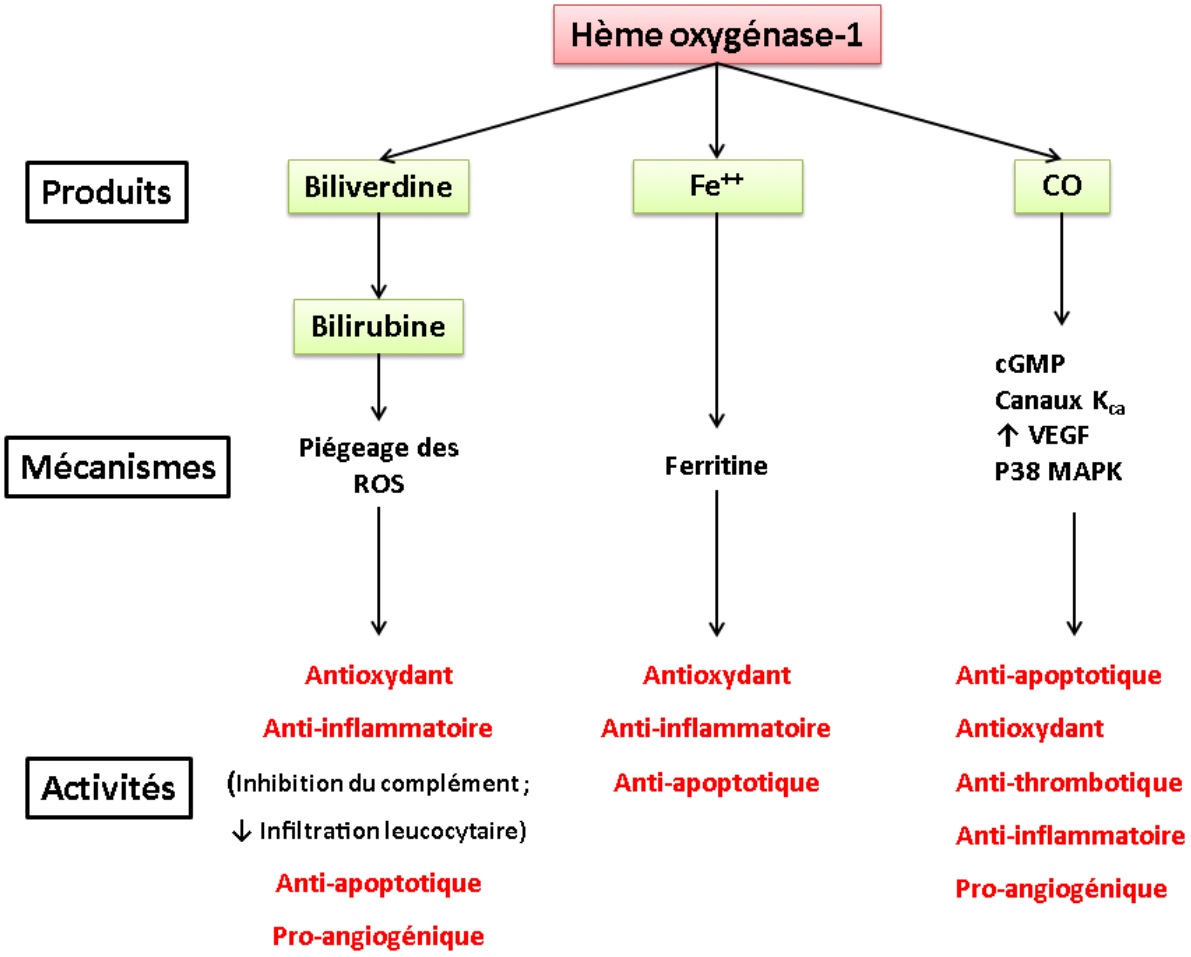


Figure 6-3. Effets biologiques des produits de l'hème oxygénase (HO-1).

Les produits résultant de l'activité de HO-1, Fe^{++}, Monoxyde de carbone (CO) et la biliverdine convertie en bilirubine par la biliverdine-réductase exercent des effets antioxydants, anti-inflammatoires et anti-apoptotiques bénéfiques (Dulak, et al., 2008).

Maintenant, il est en outre nécessaire d'étudier les mécanismes fondamentaux par lesquels l'expression de HO-1 exerce ses effets. Il se pose la question de la meilleure façon d'utiliser ce système pour le traitement de l'inflammation pré- et post-transplantation d'îlots. Le traitement idéal permettrait d'induire rapidement et de façon importante HO-1. Plusieurs molécules pourraient remplir cette fonction. La curcumine semble répondre à toutes ces exigences. En effet, cette épice possède des propriétés anti-tumorale et anti-inflammatoire qui sont rapportées pour induire HO-1 dans les cellules endothéliales vasculaires (Scapagnini, et al., 2002). La capacité de la curcumine à stimuler l'activité de HO-1 est un élément important de sa cytoprotection contre le stress oxydatif (Motterlini, et al., 2000). Cette molécule est d'autant plus intéressante que plusieurs études ont montré ses bénéfices potentiels sur la transplantation d'îlots pancréatiques. Une équipe a démontré que la curcumine et ses

analogues pourraient être utilisés pour induire les défenses cellulaires contre le stress oxydant et améliorer la transplantation d'îlots (Balamurugan, et al., 2009). De plus, les auteurs de ces travaux ont démontré que la curcumine pouvait induire l'expression de HO-1. En outre, une autre équipe a observé que la curcumine diminuait la sécrétion de CCL2 d'îlots de souris *in vitro* (Amoli, et al., 2006).

Par ailleurs, trois types de cellules inflammatoires jouent un rôle important dans la médiation de l'inflammation détruisant les îlots pancréatiques : Les cellules de Kupffer, les macrophages «résidents» des îlots pancréatiques, et les neutrophiles. Bien que la présence des neutrophiles est bien établie (Moberg, et al., 2005), leur rôle dans le contexte de la transplantation d'îlots pancréatiques n'a pas été étudié. Pourtant, les neutrophiles sont impliqués dans les fonctions d'activation, de régulation et les fonctions effectrices des cellules de l'immunité innée et adaptative (Mantovani, et al., 2011). Ainsi cibler les neutrophiles pour prévenir l'inflammation délétère pour les îlots pourrait s'avérer efficace. Etant donné que les chimiokines induisent le recrutement de toutes les sous-populations de leucocytes connues. L'antagonisme des récepteurs aux chimiokines représente donc une cible thérapeutique intéressante pour la résolution de l'inflammation post transplantation. D'ailleurs une étude menée au laboratoire a permis de montrer l'efficacité d'une telle approche sur l'activation de macrophages humains via l'antagoniste du récepteur CCR-5 : AOP-RANTES (« aminooxypentane-regulated on activation, normal, T-cell expressed, and secreted ») (Sigrist, et al., 2004). Cette étude a permis de démontrer que l'antagoniste AOP-RANTES est capable d'inhiber l'activation et la migration macrophagique induites par le surnageant d'îlots pancréatiques.

Comme nous l'avons précédemment démontré, dans notre contexte d'étude les conditions pro-inflammatoires sont étroitement liées avec la production de ROS. Par conséquent, le développement d'une alternative anti-inflammatoire et antioxydante semble pertinente. Plusieurs composés organosélénium sont proposés comme des antioxydants et des anti-inflammatoires prometteurs. Des chercheurs ont démontré que le Diphenyl diselenide $(PhSe)_2$, un composé organosélénium simple possède une activité antioxydante et des propriétés anti-inflammatoires le rendant capable de moduler l'activation des macrophages (Rupil, et al., 2012). De plus, un groupe de chercheurs a démontré qu'un autre composé de « diaryl disélénide », le bis-(3-hydroxyphényl) disélénide, peut réduire l'expression de iNOS, COX-2, TNF-α, IL-1β et IL-6 par la régulation négative de NF-kB (Shin, et al., 2009). Ainsi, l'usage de ces composés pour limiter et/ou prévenir l'inflammation au cours de la transplantation est une stratégie envisageable.

En conclusion, ces travaux ont permis de caractériser les mécanismes inflammatoires mis en place avant et après transplantation. Ces données offrent de nouvelles pistes thérapeutiques susceptibles de prévenir et/ou limiter l'inflammation de l'îlot au cours des procédures de transplantation. Du point de vue clinique, nos résultats suggèrent qu'il faut agir dès l'isolement des îlots pancréatiques jusqu'à 8H post transplantation pour limiter le processus inflammatoire. Les bénéfices de HO-1 dans le contexte de la transplantation pancréatique sont bien connus mais son action inhibitrice sur ce processus inflammatoire TLRs-dépendant est innovant et mérite d'être approfondi *in vivo*. De plus, l'identification de ligands endogènes à l'origine d'une inflammation TLR-dépendante permettra de proposer de nouvelles mesures pour prévenir et/ou limiter les effets délétères de l'inflammation *in vitro*.

7 BIBLIOGRAPHIE

UK Prospective Diabetes Study Group (UKPDS), 1998b. Effects of in intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). *Lancet,* 352(9131), pp. 854-65.

Abramoff, M., Magalhaes, P. & Ram, S., 2004. Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International,* 11(7), pp. 36-42.

Adams, R. & Bird, R., 2009. Coagulation cascade and therapeutics update: Relevance to nephrology. Part 1: Overview of coagulation, thrombophilias and history of anticoagulants. *Nephrology,* Volume 14, pp. 462-70.

Akima, S. et al., 2009. Tirofiban and activated protein C synergistically inhibit the Instant Blood Mediated Inflammatory Reaction (IBMIR) from allogeneic islet cells exposure to human blood. *Am J Transplant,* 9(7), pp. 1533-40.

Akira, S., Taga, T. & Kishimoto, T., 1993. Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol,* Volume 54, pp. 1-78.

Amara, U. et al., 2008. Interaction between the coagulation and complement system. *Adv Exp Med Biol,* Volume 632, pp. 71-9.

Amoli, M. et al., 2006. Curcumin inhibits in vitro MCP-1 release from mouse pancreatic islets. *Transplant Proc,* 38(9), pp. 3035-8.

Aprhamian, M. & Freund, Y., 2004. *Anatomie viscérale et abdominale du rat.* s.l.:AFSTAL.

Armann, B. et al., 2007. Quantification of basal and stimulated ROS levels as predictors of islet potency and function. *Am J Transplant,* 7(1), pp. 38-47.

Atkinson, M. & Eisenbarth, G., 2001. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet,* 358(9283), pp. 221-29.

Attur, M. et al., 2000. Differential anti-inflammatory effects of immunosuppressive drugs: cyclosporin, rapamycin and FK-506 on inducible nitric oxide synthase, nitric oxide, cyclooxygenase-2 and PGE2 production. *Inflamm Res,* 49(1), pp. 20-6.

Aye, I., Waddell, B., Mark, P. & Keelan, J., 2012. Oxysterols exert proinflammatory effects in placental trophoblasts via TLR4-dependent, cholesterol-sensitive activation of NF-κB. *Mol Hum Reprod,* 18(7), pp. 341-53.

Baertschiger, R., Berney, T. & Morel, P., 2008. Organ preservation in pancreas and islet transplantation. *Curr Opin Organ Transplant,* 13(1), p. 59–66.

Baggiolini, M., Dewald, B. & Moser, B., 1997. Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol,* Volume 15, pp. 675-705.

Baker, A., Wang, R., Mackman, N. & Luyendyk, J., 2009. Rapamycin enhances LPS induction of tissue factor and tumor necrosis factor-alpha expression in macrophages by reducing IL-10 expression. *Mol Immunol,* 46(11-12), pp. 2249-55.

Balamurugan, A., Akhov, L., Selvaraj, G. & Pugazhenthi, S., 2009. Induction of antioxidant enzymes by curcumin and its analogues in human islets: implications in transplantation. *Pancreas,* 38(4), pp. 454-60.

Balamurugan, A. et al., 2006. Suitability of human juvenile pancreatic islets for clinical use. *Diabetologia,* 49(8), pp. 1845-54.

Ballinger, W. & Lacy, P., 1972. Transplantation of intact pancreatic islets in rats. *Surgery,* 72(2), pp. 175-86.

Banchereau, J. & Palucka, A., 2005. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol,* 5(4), pp. 296-306.

Bang, F., 1956. A bacterial disease of Limulus polyphemus. *Bull Johns Hopkins Hosp,* 98(5), pp. 325-51.

Barnes, P., 2004. New drugs for asthma. *Nat Rev Drug Discov,* 3(10), pp. 831-44.

Barnett, A., Eff, C., Leslie, R. & Pyke, D., 1981. Diabetes in identical twins. A study of 200 pairs. *Diabetologia,* Volume 20, pp. 87-93.
Barret, J. & al, 2009. Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes. *Nat Genet,* 41(7), pp. 703-7.
Barshes, N., Wyllie, S. & Goss, J., 2005. Inflammation-mediated dysfunction and apoptosis in pancreatic islet transplantation: implications for intrahepatic grafts. *J Leukoc Biol,* 77(5), pp. 587-97.
Beinke, S. & Ley, S., 2004. Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology. *Biochem J,* 382(Pt2), pp. 393-409.
Bendayan, M., 1993. Pathway of insulin in pancreatic tissue on its release by the B-cell. *Am J Physiol,* 264(2 Pt 1), p. G187–94.
Benhamou, P. et al., 1994. Human islet isolation in 104 cases. Factors affecting isolation success. *Transplantation,* 57(12), pp. 1804-10.
Bennet, W. et al., 2000. Isolated human islets trigger an instant blood mediated inflammatory reaction: implications for intraportal islet transplantation as a treatment for patients with type 1 diabetes. *Ups J Med Sci,* 105(2), pp. 125-33.
Bennet, W. et al., 1999. Incompatibility between human blood and isolated islets of Langerhans: a finding with implications for clinical intraportal islet transplantation?. *Diabetes,* 48(10), pp. 1907-14.
Berman, D. et al., 2007. Interference with tissue factor prolongs intrahepatic islet allograft survival in a nonhuman primate marginal mass model. *Transplantation ,* 84(3), pp. 308-15.
Berney, T. & Johnson, P., 2010. Donor Pancreata: Evolving Approaches to Organ Allocation for Whole Pancreas Versus Islet Transplantation. *Transplantation,* 90(3), pp. 238-43.
Beuneu, C. et al., 2007. N-Acetylcysteine derivative inhibits procoagulant activity of human islet cells. *Diabetologia,* 50(2), pp. 343-7.
Beuneu, C. et al., 2004. Human pancreatic duct cells exert tissue factor-dependent procoagulant activity: relevance to islet transplantation. *Diabetes,* 53(6), pp. 1407-1411.
Beutler, B., 2007. Neo-ligands for innate immune receptors and the etiology of sterile inflammatory disease. *Immunol Rev,* Volume 220, pp. 113-28.
Beutler, B. & Cerami, A., 1989. The biology of cachectin/TNF—a primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol,* Volume 7, pp. 625-55.
Biancone, L. et al., 2006. Platelet-activating factor synthesis and response on pancreatic islet endothelial cells: relevance for islet transplantation. *Transplantation ,* 81(4), pp. 511-8.
Biarnés, M. et al., 2002. Beta-cell death and mass in syngeneically transplanted islets exposed to short- and long-term hyperglycemia. *Diabetes,* 51(1), pp. 66-72.
Bierhaus, A. et al., 2001. Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB. *Diabetes,* 50(12), pp. 2792-808.
Biozzi, G., Benacerraf, B. & Halpern, B., 1953. Quantitative study of the granulopectic activity of the reticulo-endothelial system. II. A study of the kinetics of the R. E. S. in relation to the dose of carbon injected; relationship between the weight of the organs and their activity. *Br J Exp Pathol,* 34(4), pp. 441-57.
Bollyky, P. et al., 2009. The toll-like receptor signaling molecule Myd88 contributes to pancreatic beta-cell homeostasis in response to injury. *PLoS One,* 4(4).
Bottino, R. et al., 2002. Preservation of human islet cell functional mass by anti-oxidative action of a novel SOD mimic compound. *Diabetes,* 51(8), pp. 2561-7.
Bottino, R. et al., 2004. Response of human islets to isolation stress and the effect of antioxidant treatment. *Diabetes,* 53(10), pp. 2559-68.
Brandhorst, D. et al., 1994. Body mass index is an important determinant for human islet isolation outcome. *Transplant Proc,* 26(6), pp. 3529-30.

Brandhorst, H. et al., 2005. Influence of neutral protease activity on human islet isolation outcome. *Transplant Proc,* 37(1), pp. 241-2.
Brissova, M. et al., 2005. Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *J Histochem Cytochem 53, 1087–1097 (2005),* 53(9), p. 1087–97.
Brissova, M. et al., 2006. Pancreatic islet production of vascular endothelial growth factor-a is essential for islet vascularization, revascularization, and function. *Diabetes* , 55(11), pp. 2974-2985.
Bubici, C., Papa, S., Dean, K. & Franzoso, G., 2006. Mutual cross-talk between reactive oxygen species and nuclear factor-kappa B: molecular basis and biological significance.. *Oncogene,* 25(51), pp. 6731-48.
Bucher, P. et al., 2004. Optimization of neutral protease to collagenase activity ratio for islet of Langerhans isolation. *Transplant Proc,* 36(4), pp. 1145-6.
Bungay, S., 2008. Modelling the effect of amplification pathway factors on thrombin generation: A comparison of hemophilias. *Transfus Apher Sci,* 38(1), pp. 41-7.
Burecelin, R., Knauf, C. & Cani, P., 2007. Les routes du GLP-1 : des effets pancréatiques aux effets extrapancréatiques. *Sang Thrombose Vaisseaux,* 19(2), pp. 85-92.
Cabrera, O. et al., 2006. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 103(7), p. 2334–39.
Cabric, S. et al., 2008. A new method for incorporating functional heparin onto the surface of islets of Langerhans. *Tissue Eng Part C Methods,* 14(2), pp. 141-7.
Cabric, S. et al., 2010. Anchoring of vascular endothelial growth factor to surface-immobilized heparin on pancreatic islets: implications for stimulating islet angiogenesis. *Tissue Eng Part A,* 16(3), pp. 961-70.
Cabric, S. et al., 2007. Islet surface heparinization prevents the instant blood-mediated inflammatory reaction in islet transplantation. *Diabetes* , 56(8), pp. 2008-15.
Caiazzo, R. et al., 2008. Quantitative in vivo islet potency assay in normoglycemic nude mice correlates with primary graft function after clinical transplantation. *Transplantation,* 86(2), pp. 360-3.
Cantaluppi, V. et al., 2006. Antiangiogenic and immunomodulatory effects of rapamycin on islet endothelium: relevance for islet transplantation. *Am J Transplant,* 6(11), pp. 2601-11.
Carlsson, L. & Lazarides, E., 1983. ADP-ribosylation of the Mr 83,000 stress-inducible and glucose-regulated protein in avian and mammalian cells: modulation by heat shock and glucose starvation. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 80(15), pp. 4664-8.
Carlsson, P., Palm, F., Andersson, A. & Liss, P., 2001. Markedly decreased oxygen tension in transplanted rat pancreatic islets irrespective of the implantation site. *Diabetes,* 50(3), p. 489–95.
Carmody, R. & Chen, Y., 2007. Nuclear factor-kappaB: activation and regulation during toll-like receptor signaling.. *Cell Mol Immunol,* 4(1), pp. 31-41.
Caroll, M., 2004. The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nat Immunol,* 23(10), pp. 981-86.
Cattan, P. et al., 2001 . Early assessment of apoptosis in isolated islets of Langerhans. *Transplantation* , 71(7), pp. 857-62.
Cecchini, M. et al., 2010. Tackling of unhealthy diets, physical inactivity, and obesity: health effects and cost-effectiveness. *Lancet,* 376(9754), pp. 1775-84.
Chen, C. et al., 2011. Nuclear phospholipid scramblase 1 prolongs the mitotic expansion of granulocyte precursors during G-CSF induced granulopoiesis. *J Leukoc Biol,* 90(2), pp. 221-23.

Chen, H., Teramura, Y. & Iwata, H., 2011. Co-immobilization of urokinase and thrombomodulin on islet surfaces by poly(ethylene glycol)-conjugated phospholipid.. *J Control Release,* 150(2), pp. 229-34.
Chen, M., Schuit, F., Pipeleers, D. & Eizirik, D., 1999. IL-1beta induces serine protease inhibitor 3 (SPI-3) gene expression in rat pancreatic beta-cells. Detection by differential display of messenger RNA. *Cytokine,* 11(11), pp. 856-62.
Chertov, O. et al., 1997. Identification of human neutrophil-derived cathepsin G and azurocidin/CAP37 as chemoattractants for mononuclear cells and neutrophils. *J Exp Med,* 186(5), pp. 739-47.
Chiang, P. et al., 2004. Mechanistic insights into impaired dendritic cell function by rapamycin: inhibition of Jak2/Stat4 signaling pathway. *J Immunol,* 172(3), pp. 1355-63.
Chiesa, S. et al., 2006. Multiplicity and plasticity of natural killer cell signaling pathways. *Blood,* 107(6), pp. 2364-72.
CITR, C. I. T. R., 2011. Seventh Annual Report. *http://www.citregistry.org/.*
Commins, S., Borish, L. & Steinke, J., 2010. Immunologic messenger molecules: Cytokines, interferons,and chemokines. *J Allergy Clin Immunol,* 125(2 Suppl 2), pp. S53-72.
Contreras, J. et al., 2004. Activated protein C preserves functional islet mass after intraportal transplantation: a novel link between endothelial cell activation, thrombosis, inflammation, and islet cell death. *Diabetes,* 53(11), pp. 2804-14.
Contreras, J. et al., 2003. Stable alpha- and beta-islet cell function after tolerance induction to pancreatic islet allografts in diabetic primates. *Am J Transplant,* 3(2), pp. 128-38.
Coughlin, S., 2000. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature,* 407(6801), pp. 258-64.
Cross, S. et al., 2008. Collagenase penetrates human pancreatic islets following standard intraductal administration. *Transplantation,* 86(7), pp. 907-11.
Cui, W., Angsana, J., Wen, J. & Chaikof, E., 2010. Liposomal formulations of thrombomodulin increase engraftment after intraportal islet transplantation. *Cell Transplant,* 19(11), pp. 1359-67.
Cui, W. et al., 2009. Thrombomodulin improves early outcomes after intraportal islet transplantation. *Am J Transplant,* 9(6), pp. 1308-16.
Dahle, M. et al., 2004. The phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B signaling pathway is activated by lipoteichoic acid and plays a role in Kupffer cell production of interleukin-6 (IL-6) and IL-10. *Infect Immun,* 72(10), pp. 5704-11.
Dahout-Gonzalez, C. et al., 2006. Molecular, functional, and pathological aspects of the mitochondrial ADP/ATP carrier. *Physiology (Bethesda),* Volume 21, pp. 242-9.
Dalmasso, A., Falk, R. & Raij, L., 1989. The pathobiology of the terminal complement complexes. *Complement Inflamm,* 6(1), pp. 36-48.
Dal-Ros, S. et al., 2012. Role of intraperitoneal insulin infusion in the prevention of hepatic oxidative stress and it’s impact on metabolism. *Diabetes,* Volume Soumis.
Daoud, J., Rosenberg, L. & Tabrizian, M., 2010. Pancreatic Islet Culture and Preservation Strategies:Advances, Challenges, and Future Outlook. *Cell Transplant,* 19(12), pp. 1523-35.
Davalli, A. et al., 1996. Vulnerability of islets in the immediate posttransplantation period. Dynamic changes in structure and function. *Diabetes,* 45(9), pp. 1161-7.
DeFronzo, R., 1997. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. *Diabetes,* Volume 5, pp. 177-269.
Del Prete, G. et al., 1993. Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J Immunol,* 150(2), pp. 353-60.
Deng, S. et al., 2004. Structural and functional abnormalities in the islets isolated from type 2 diabetic subjects. *Diabetes,* 53(3), pp. 624-32.

Desai, N. et al., 2003. Elevated portal vein drug levels of sirolimus and tacrolimus in islet transplant recipients: local immunosuppression or islet toxicity?. *Transplantation,* 76(11), pp. 1623-5.
Deshane, J., Wright, M. & Agarwal, A., 2005. Heme oxygenase-1 expression in disease states. *Acta Biochim Pol,* 52(2), pp. 273-84.
Dostert, C. et al., 2008. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science,* 320(5876), pp. 674-77.
Doulatov, S. et al., 2010. Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development. *Nat Immunol,* 11(7), pp. 585-93.
Dulak, J., Loboda, A. & Jozkowicz, A., 2008. Effect of heme oxygenase-1 on vascular function and disease. *Curr Opin Lipidol,* 19(5), pp. 505-12.
Dupuy, A. et al., 2003. Is C-reactive protein a marker of inflammation?. *Nephrologie,* 24(7), pp. 337-41.
Eckhard, M. et al., 2004. Optimization in osmolality and range of density of a continuous ficoll-sodium-diatrizoate gradient for isopycnic purification of isolated human islets. *Transplant Proc,* 36(9), pp. 2849-54.
Eguchi, K. et al., 2012. Saturated fatty acid and TLR signaling link β cell dysfunction and islet inflammation. *Cell Metab,* 15(4), pp. 518-33.
Ehrnthaller, C., Ignatius, A., Gebhard, F. & Huber-Lang, M., 2011. New Insights of an Old Defense System: Structure, Function, and Clinical Relevance of the Complement System. *Mol Med,* 17(3-4), pp. 317-29.
Eisenbarth, G., 1986. Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *N Engl J Med,* 314(21), pp. 1360-68.
Eligini, S. et al., 2002. Oxidized phospholipids inhibit cyclooxygenase-2 in human macrophages via nuclear factor-kappaB/IkappaB- and ERK2-dependent mechanisms. *Cardiovasc Res,* 55(2), pp. 406-15.
Emamaullee, J. & Shapiro, A., 2006. Interventional strategies to prevent beta-cell apoptosis in islet transplantation. *Diabetes,* 55(7), pp. 1907-14.
Emamaullee, J. & Shapiro, A., 2007. Factors influencing the loss of beta-cell mass in islet transplantation. *Cell Transplant,* 16(1), pp. 1-8.
Erridge, C., Kennedy, S., Spickett, C. & Webb, D., 2008. Oxidized Phospolipid Inhibition of Toll-like Receptor (TLR) Signaling Is restricted to TLR-2 and TLR-4 : roles for CD14, LPS-binding protein, and MD-2 as targets for specificity of inhibition. *J Biol Chem,* 283(36), pp. 24748-59.
Farney, A. et al., 1991. Autotransplantation of dispersed pancreatic islet tissue combined with total or near-total pancreatectomy for treatment of chronic pancreatitis. *Surgery,* 110(2), pp. 427-37.
Ferrando, M. et al., 2011. Heme oxygenase 1 (HO-1) challenges the angiogenic switch in prostate cancer. *Angiogenesis* , 14(4), pp. 467-79.
Filippi, C. & von Herrath, M., 2008. Viral trigger for type 1 diabetes: pros and cons. *Diabetes,* 57(11), pp. 2863-71.
Fiorentino, D., Bond, M. & Mosmann, T., 1989. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med,* 170(6), pp. 2081-95.
Fujino, Y. et al., 1991. Preservation of canine pancreas for 96 hours by a modified two-layer (UW solution/perfluorochemical) cold storage method.. *Transplantation,* 51(5), p. 1133.
Furie, B. & Furie, C., 2007. In vivo thrombus formation. *J Thromb Haem,* Volume 5 ppt 1, p. S12–7.

Galli, S., Borregaard, N. & Wynn, T., 2011. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat Immunol,* 12(11), pp. 1035-44.
Ganter, M. et al., 2007. Role of the alternative pathway in the early complement activation following major trauma. *Shock,* 28(1), pp. 29-34.
Gao, Q. et al., 2010. TLR4 mediates early graft failure after intraportal islet transplantation. *Am J Transplant,* 10(7), pp. 1588-96.
Gasque, P., 2004. Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. *Mol Immunol,* 41(11), p. 1089–98.
Geissmann, F. et al., 2010. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science,* 327(5966), pp. 656-661.
Giffen, P. et al., 2003. Markers of experimental acute inflammation in the Wistar Han rat with particular reference to haptoglobin and C-reactive protein. *Arch Toxicol 77,* 77(7), pp. 392-402.
Goldberg, A. et al., 2007. Toll-like receptor 4 suppression leads to islet allograft survival. *FASEB J,* 21(11), pp. 2840-8.
Gomez-Cambronero, J., 2003. Rapamycin inhibits GM-CSF-induced neutrophil migration. *FEBS Lett,* 550(1-3), pp. 94-100.
Gonzalez-Gronow, M., Selim, M., Papalas, J. & Pizzo, S., 2009. GRP78: a multifunctional receptor on the cell surface. *Antioxid Redox Signal,* 11(9), pp. 2299-306.
Gordon, S. & Taylor, P., 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol,* 5(12), pp. 953-64.
Grommes, J. & Soehnlein, O., 2011. Contribution of neutrophils to acute lung injury. *Mol Med,* 17(3-4), p. 293–307.
Guerra, M. et al., 2011. Lipopolysaccharide modulates astrocytic S100B secretion: a study in cerebrospinal fluid and astrocyte cultures from rats. *J Neuroinflammation,* 8(128).
Guo, R. et al., 2000. Protective effects of anti-C5a in sepsis-induced thymocyte apoptosis. *J Clin Invest,* 106(10), pp. 1271-80.
Guo, R. & Ward, P., 2005. Role of c5a in inflammatory responses. *Annu Rev Immunol,* Volume 23, pp. 821-52.
Hamad, O. et al., 2008. Complement activation triggered by chondroitin sulfate released by thrombin receptor-activated platelets. *J Thromb Haemost ,* 6(8), pp. 1413-21.
Hawkes, C., 2006. Uneven dietary development: linking the policies and processes of globalization with the nutrition transition, obesity and diet-related chronic diseases. *Globalization Health,* 2(4).
Hawrylowicz, C. & O'Garra, A., 2005. Potential role of interleukin.10.secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nature Rev Immunol,* 5(4), pp. 271-83.
Heller-Harrison, R. & Carter, W., 1984. Pepsin-generated type VI collagen is a degradation product of GP140. *J Biol Chem,* 259(11), pp. 6858-64.
Hendershot, L., Ting, J. & Lee, A., 1988. Identity of the immunoglobulin heavy-chain-binding protein with the 78,000-dalton glucose-regulated protein and the role of posttranslational modifications in its binding function. *Mol Cell Biol,* 8(10), pp. 4250-6.
Henderson, J. & Moss, M., 1985. A morphometric study of the endocrine and exocrine capillaries of the pancreas. *Q J Exp Physiol,* 70(3), p. 347–56.
Hoffman, M. & Monroe, D., 2007. Coagulation 2006: A modern view of hemostasis. *Hematol Oncol Clin North Am ,* 21(1), pp. 1-11.
Huber-Lang, M. et al., 2006. Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nat Med,* 12(6), pp. 682-7.
Huber-Lang, M. et al., 2002. Generation of C5a by phagocytic cells. *Am J Pathol,* 161(5), pp. 1849-59.

Hu, F. et al., 2001. Diet, Lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. *N Engl J Med,* Volume 345, pp. 790-97.
Hughes, S. et al., 2006. Characterization of collagenase VI within the islet– exocrine interface of the human pancreas: implication for clinical islet isolation?. *Transplantation,* 81(3), pp. 423-6.
Hughes, S., Davies, S., Powis, S. & Press, M., 2003. Hyperoxia improves the survival of intraportally transplanted syngeneic pancreatic islets. *Transplantation,* 75(12), pp. 1954-9.
Hutton, M., Soukhatcheva, G., Johnson, J. & Verchere, C., 2010. Role of the TLR signaling molecule TRIF in β-cell function and glucose homeostasis. *Islets* , 2(2), pp. 104-11.
Ichii, H. et al., 2005. Rescue purification maximizes the use of human islet preparations for transplantation. *Am J Transplant,* 5(1), pp. 21-30.
Ihm, S. et al., 2006. Effect of donor age on function of isolated human islets. *Diabetes,* 55(5), pp. 1361-8.
Ii, M. et al., 2006. A novel Cyclohexene Derivative, Ethyl (6R)-6-[N-(2-Chloro-4-fluorophenyl)sulfamoyl]cyclohex-1-ene-1-carboxylate (TAK-242),Selectively Inhibits Toll-Like Receptor 4-Mediated Cytokine Production through Suppression of Intracellular Signaling.. *Mol Pharmacol,* 69(4), pp. 1288-95.
Imtiyaz, H. & Simon, M., 2010. Hypoxia-inducible factors as essential regulators of inflammation. *Curr Top Microbiol Immunol,* Volume 345, pp. 105-120.
Ishii, S. et al., 2012. Preservation of pancreatic islets in cold UW solution before transplantation. *Islets,* 4(1).
Ishiyama, K., Rawson, J., Omori, K. & Mullen, Y., 2011. Liver natural killer cells play a role in the destruction of islets after intraportal transplantation. *Transplantation,* 91(9), pp. 952-60.
Iwanaga, Y., Sutherland, D., Harmon, J. & Papas, K., 2008. Pancreas preservation for pancreas and islet transplantation.. *Curr Opin Organ Transplant,* 13(2), pp. 135-41.
Janeway, C. J. & Medzhitov, R., 2002. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol,* Volume 20, pp. 197-216.
Jarmi, T. & Agarwal, A., 2009. Heme oxygenase and renal disease. *Curr Hypertens Rep* , 11(1), pp. 56-62.
Ji, M. et al., 2011. The importance of tissue factor expression by porcine NICC in triggering IBMIR in the xenograft setting. *Transplantation* , 91(8), pp. 841-46.
Jinbo, T., Motoki, M. & Yamamoto, S., 2001. Variation of serum alpha2-macroglobulin concentration in healthy rats and rats inoculated with Staphylococcus aureus or subjected to surgery. *Comp Med,* 51(4), pp. 332-5.
Jinbo, T., Sakamoto, T. & Yamamoto, S., 2002. Serum alpha2-macroglobulin and cytokine measurements in an acute inflammation model in rats. *Lab Anim,* 36(2), pp. 153-7.
Johansson, H. et al., 2006. Low molecular weight dextran sulfate: a strong candidate drug to block IBMIR in clinical islet transplantation. *Am J Transplant,* 6(2), pp. 305-12.
Johansson, H. et al., 2005. Tissue factor produced by the endocrine cells of the islets of Langerhans is associated with a negative outcome of clinical islet transplantation. *Diabetes,* 54(6), pp. 1755-62.
Johansson, U. et al., 2003. Inflammatory mediators expressed in human islets of Langerhans: implications for islet transplantation. *Biochem Biophys Res Commun,* 308(3), pp. 474-9.
Johnson, P., White, S. & London, N., 1996. Collagenase and human islet isolation. *Cell Transplant,* 5(4), pp. 437-52.
Juszczak, M. et al., 2009. Highly selective intraportal transplantation of pancreatic islets. *J Surg Res,* 157(2), pp. 216-22.
Kapturczak, M. et al., 2004. Heme oxygenase-1 modulates early inflammatory responses: evidence from the heme oxygenase-1-deficient mouse. *Am J Pathol,* 165(3), pp. 1045-53.

Kaufmann, S., 2008. Immunology's foundation: the 100-year anniversary of the Nobel Prize to Paul Ehrlich and Elie Metchnikoff. *Nat Immunol,* 9(7), pp. 705-12.
Kaul, G., Pattan, G. & Rafeequi, T., 2011. Eukaryotic elongation factor-2 (eEF2): its regulation and peptide chain elongation. *Cell Biochem Funct,* 29(3), pp. 227-34.
Kawai, T. & Akira, S., 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on Toll-like receptors. *Nat Immunol,* 11(5), pp. 373-84.
Kawamoto, T. & al, 2008. TAK-242, selectively suppresses Toll-like receptor 4-signaling mediated by the intracellular domain. *Eur J Pharmacol,* 584(1), pp. 40-8.
Kenny, E. & O'Neill, L., 2008. Signalling adaptors used by Toll-like receptors: an update. *Cytokine,* 43(3), p. 342–49.
King, C., Ilic, A., Koelsch, K. & Sarvetnick, N., 2004. Homeostatic expansion of T cells during immune insufficiency generates autoimmunity. *Cell,* 117(2), pp. 265-77.
Kin, T., Johnson, P., Shapiro, A. & Lakey, J., 2007. Factors Influencing the Collagenase Digestion Phase of Human Islet Isolation. *Transplantation,* 83(1), pp. 7-12.
Kiritoshi, S. et al., 2003. Reactive oxygen species from mitochondria induce cyclooxygenase-2 gene expression in human mesangial cells: potential role in diabetic nephropathy. *Diabetes,* 52(10), pp. 2570-7.
Kono, H. & Rock, K., 2008. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol,* 8(4), pp. 279-89.
Korsgren, O. et al., 2005. Current status of clinical islet transplantation. *Transplantation,* 79(10), pp. 1289-93.
Krüger, B. et al., 2010. Islet-expressed TLR2 and TLR4 sense injury and mediate early graft failure after transplantation. *Eur J Immunol,* 40(10), pp. 2914-24.
Krupica, T. J., Fry, T. & Mackall, C., 2006. Autoimmunity during lymphopenia: a two-hit model. *Clin Immunol,* 120(2), pp. 121-28.
Krutzik, S. et al., 2005. TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. *Nat Med,* 11(6), pp. 653-60.
Kumar, H., Kawai, T. & Akira, S., 2011. Pathogen Recognition by the Innate Immune. *Int Rev Immunol,* 30(1), pp. 16-34.
Kumar, V. & Sharma, A., 2010. Neutrophils: Cinderella of innate immune system. *Int Immunopharmacol,* 10(11), pp. 1325-34.
Küper, C., Beck, F. & Neuhofer, W., 2012. Toll-like receptor 4 activates NF-κB and MAP kinase pathways to regulate expression of proinflammatory COX-2 in renal medullary collecting duct cells. *Am J Physiol Renal Physiol,* 302(1), pp. F38-46.
Lakey, J., Burridge, P. & Shapiro, A., 2003. Technical aspects of islet preparation and transplantation. *Transplant Int,* 16(9), pp. 613-32.
Lakey, J., Cavanagh, T. & Zieger, M., 1998. A prospective comparison of discontinuous EuroFicoll and EuroDextran gradients for islet purification. *Cell Transplant,* 7(5), pp. 479-87.
Lakey, J. et al., 2002. Effect of core pancreas temperature during cadaveric procurement on human islet isolation and functional viability. *Transplantation,* 73(7), pp. 1106-10.
Lakey, J. et al., 1996. Variables in organ donors that affect the recovery of human islets of Langerhans. *Transplantation,* 61(7), pp. 1047-53.
Lalmanach, G., Naudin, C., Lecaille, F. & Fritz, H., 2010. Kininogens: More than cysteine protease inhibitors and kinin precursors. *Biochimie,* 92(11), pp. 1568-79.
Lau, J. & Carlsson, P., 2009. Low revascularization of human islets when experimentally transplanted into the liver. *Transplantation,* 87(3), p. 322–5..
Leahy, J., 2005. Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. *Arch Med Res,* 36(3), pp. 197-209.
Lee, T. & Chau, L., 2002. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. *Nat Med,* 8(3), pp. 240-6.

Lenzen, S., Drinkgern, J. & Tiedge, M., 1996. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic Biol Med,* 20(3), pp. 463-66.
Levi, M., van der Poll, T. & Büller, H., 2004. Bidirectional relation between inflammation and coagulation. *Circulation,* 109(22), pp. 2698-704.
Lewinska, A., Wnuk, M., Slota, E. & Bartosz, G., 2007. Total anti-oxidant capacity of cell culture media. *Clin Exp Pharmacol Physiol,* 34(8), pp. 781-6.
Lewis, E. et al., 2008. alpha1-Antitrypsin monotherapy induces immune tolerance during islet allograft transplantation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA,* 105(42), pp. 16236-41.
Lewis, E., Shapiro, L., Bowers, O. & Dinarello, C., 2005. Alpha1-antitrypsin monotherapy prolongs islet allograft survival in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 102(34), pp. 12153-8.
Li, Q. & al, 2002. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol,* 2(10), pp. 725-34.
Liszewski, M. et al., 1996. Control of the complement system. *Adv Immunol,* Volume 61, pp. 201-83.
Liu, Y., Jetton, T. & Leahy, J., 2002. Beta-cell adaptation to insulin resistance. Increased pyruvate carboxylase and malate- pyruvate shuttle activity in islets of nondiabetic Zucker fatty rats. *J Biol Chem,* 277(42), p. 39163–68.
Lowry, O. & al., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem,* 193(1), pp. 265-75.
Luan, N., Teramura, Y. & Iwata, H., 2011. Immobilization of soluble complement receptor 1 on islets. *Biomaterials,* 32(20), pp. 4539-45.
Luan, N., Teramura, Y. & Iwata, H., 2011. Layer-by-layer co-immobilization of soluble complement receptor 1 and heparin on islets. *Biomaterials* , 32(27), pp. 6487-92.
Lumeng, C., Bodzin, J. & Saltiel, A., 2007. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest,* 117(1), pp. 175-84.
Luster, A., 1998. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med,* 338(7), pp. 436-45.
MacFarlane, R., 1964. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism and its function as a biochemical amplifier. *Nature,* Volume 202, p. 98–9.
Maedler, K. et al., 2002. Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J Clin Invest,* 110(6), pp. 851-60.
Maillard, E. et al., 2011. Perfluorodecalin-enriched fibrin matrix for human islet culture. *Biomaterials,* 32(35), pp. 9282-89.
Maillard, E. et al., 2008. Perfluorocarbons: new tool for islets preservation in vitro. *Transpl,* 40(2), pp. 372-4.
Maines, M., 1997. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol,* Volume 37, pp. 517-54.
Malek, T. & Bayer, A., 2004. Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nat Rev Immunol,* 4(9), pp. 665-674.
Manderson, A., Botto, M. & Walport, M., 2004. The role of complement in the development of systemic lupus erythematosus. *Annu Rev Immunol,* Volume 22, pp. 431-56.
Mantovani, A., Cassatella, M., Costantini, C. & Jaillon, S., 2011. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol,* 11(8), pp. 519-31.
Markiewski, M. et al., 2008. Modulation of the antitumor immune response by complement. *Nat Immunol,* 9(11), pp. 1225-35.
Markiewski, M. et al., 2007. Complement and coagulation: strangers or partners in crime?. *Trends Immunol,* 28(4), p. 184–92.
Mary, J., 1985. Normal human granulopoiesis revisited. II. Bone marrow data. *Biomed Pharmacother,* 39(2), pp. 66-77.

Marzorati, S. et al., 2006. Culture medium modulates proinflammatory conditions of human pancreatic islets before transplantation. *Am J Transplant ,* 6(11), pp. 2791-5.
Matsumoto, I. et al., 2004. Improvement in islet yield from obese donors for human islet transplants. *Transplantation,* 78(6), pp. 880-5.
Matsumoto, S. et al., 2002. Effect of the two-layer (University of Wisconsin solution–perfluorochemical plus O2) method of pancreas on human islet isolation, as assessed by the Edmonton Isolation Protocol. *Transplantation,* 74(10), pp. 1414-19.
Matsushita, M. & Fujita, T., 2001. Ficolins and the lectin complement pathway. *Immunol Rev,* Volume 180, p. 78–85.
Matzinger, P., 1994. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol,* Volume 12, pp. 991-1045.
McCall, M. et al., 2011. Histopaque provides optimal mouse islet purification kinetics: comparison study with Ficoll, iodixanol and dextran. *Islets,* 3(4), pp. 144-9.
McCall, M. & Shapiro, A., 2012. Update on islet transplantation. *Cold Spring Harb Perspect Med,* 2(7).
Melzi, R. et al., 2010. Role of CCL2/MCP-1 in islet transplantation. *Cell Transplant,* 19(8), pp. 1031-46.
Merani, S. & Shapiro, A., 2006. Current status of pancreatic islet transplantation. *Clinical Science,* 110(6), pp. 611-25.
Merani, S., Toso, C., Emamaullee, J. & Shapiro, A., 2008. Optimal implantation site for pancreatic islet transplantation. *Br J Surg,* 95(12), pp. 1449-61.
Mercalli, A. et al., 2006. Rapamycin induces a caspase-independent cell death in human monocytes. *Am J Transplant,* 6(6), pp. 1331-41.
Merchant, F., Diller, K., Aggarwal, S. & Bovik, A., 1997. Angiogenesis in cultured and cryopreserved pancreatic islet grafts. *Transplantation,* 63(11), pp. 1652-60.
Mita, A. et al., 2008. Anti-proinflammatory effects of sirolimus on human islet preparations. *Transplantation,* 86(1), pp. 46-53.
Moberg, L., 2005. The Role of the Innate Immunity in Islet Transplantation. *Ups J Med Sci,* 110(1), pp. 17-55.
Moberg, L. et al., 2002. Production of tissue factor by pancreatic islet cells as a trigger of detrimental thrombotic reactions in clinical islet transplantation. *Lancet,* 360(9350), pp. 2039-2045.
Moberg, L., Korsgren, O. & Nilsson, B., 2005. Neutrophilic granulocytes are the predominant cell type infiltrating pancreatic islets in contact with ABO compatible. *Clin Exp Immunol,* 142(1), pp. 125-31.
Moberg, L. et al., 2003. Nicotinamide inhibits tissue factor expression in isolated human pancreatic islets: implications for clinical islet transplantation. *Transplantation ,* 76(9), pp. 1285-8.
Mohanakumar, T. et al., 2006. A significant role for histocompatibility in human islet tranplantation. *Transplantation ,* 82(2), pp. 180-7.
Monnier, L., 2010. *Diabétologie.* Issy-les -Moulineaux: Elsevier Masson .
Monti, P. et al., 2008. Islet transplantation in patients with autoimmune diabetes induces homeostatic cytokines that expand autoreactive memory T cells. *J Clin Invest 118:1806–1814.,* 118(5), pp. 1806-14.
Moore, K., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. & O'Garra, A., 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol,* pp. 683-765.
Moretta, L. et al., 2002. Human natural killer cells: their origin, receptors and function. *Eur J Immunol,* 32(5), pp. 1205-11.

Moriscot, C. et al., 2007. MnTMPyP, a metalloporphyrin-based superoxide dismutase/catalase mimetic, protects INS-1 cells and human pancreatic islets from an in vitro oxidative challenge. *Diabetes Metab* , 33(1), pp. 44-53.
Mosser, D. & Edwards, J., 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol,* 8(12), pp. 958-69.
Motterlini, R., Foresti, R., Bassi, R. & Green, C., 2000. Curcumin, an antioxidant and anti-inflammatory agent, induces heme oxygenase-1 and protects endothelial cells against oxidative stress. *Free Radic Biol Med,* 28(8), pp. 1303-12.
Moussard, C., 2006. *Biologie moléculaire Biochimie des communications cellulaires.* Bruxelles: De Boeck.
Mowry, R. & al, 1953. A Histochemical study of the distribution and fate of dextran in tissues of the mouse. *Am. J. Pathol.,* 29(3), pp. 523-45.
Müller-Newen, G. et al., 1998. Soluble IL-6 receptor potentiates the antagonistic activity of soluble gp130 on IL-6 responses. *J Immunol,* 161(11), pp. 6347-55.
Murray, P. & Wynn, T., 2011. Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. *J Leukoc Biol,* 89(4), pp. 557-63.
Naftanel, M. & Harlan, D., 2004. Pancreatic Islet Transplantation. *PLoS Medicine,* 1(3), pp. 198-201.
Nagata, M. et al., 1990. Destruction of islet isografts by severe nonspecific inflammation. *Transplant Proc,* 22(2), pp. 855-56.
Naik, E. & Dixit, V., 2011. Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. *J Exp Med,* 208(3), pp. 417-20.
Nakahira, K. et al., 2011. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat Immunol,* 12(3), pp. 222-30.
Nauck, M. et al., 1986. Incretin effects of increasing glucose loads in man calculated from venous insulin and C-peptide responses. *J Clin Endocrinol Metab,* 63(2), pp. 492-8.
Negi, S. et al., 2012. Analysis of Beta-Cell Gene Expression Reveals Inflammatory Signaling and Evidence of Dedifferentiation following Human Islet Isolation and Culture. *PLoS One,* 7(1).
Niclauss, N. et al., 2011. Influence of donor age on islet isolation and transplantation outcome. *Transplantation,* 91(3), pp. 360-6.
Niclauss, N. et al., 2011. Rapamycin impairs proliferation of transplanted islet β cells.. *Transplantation,* 91(7), pp. 714-22.
Nilsson, B., Ekdahla, K. & Korsgren, O., 2011. Control of instant blood-mediated inflammatory reaction to improve islets of Langerhans engraftment. *Curr Opin Organ Transplant,* 16(6), pp. 620-6.
Noble, J. et al., 1996. The Role of HLA class II genes in insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Genet,* 59(5), pp. 1134-48.
Noguchi, H. et al., 2006. Evaluation of islet transplantation from non-heart beating donors. *Am J Transplant,* 6(10), pp. 2476-82.
Noguchi, H., Levy, M., Kobayashi, N. & Matsumoto, S., 2009. Pancreas Preservation by the Two-Layer Method: Does it Have a Beneficial Effect Compared With Simple Preservation in University of Wisconsin Solution?. *Cell Transplant,* 18(5), p. 497–503.
Odegaard, J. & Chawla, A., 2011. Alternative macrophage activation and metabolism. *Annu Rev Pathol,* Volume 6, pp. 275-97.
Odegaard, J. et al., 2007. Macrophage-specific PPARg controls alternative activation and improves insulin resistance.. *Nature,* 447(7148), pp. 1116-20.

Ohashi, K., Burkart, V., Flohé, S. & Kolb, H., 2000. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the Toll-like receptor-4 complex. *J Immunol,* 164(2), pp. 558-61.
Ozmen, L. et al., 2002. Inhibition of thrombin abrogates the instant blood-mediated inflammatory reaction triggered by isolated human islets: possible application of the thrombin inhibitor melagatran in clinical islet transplantation. *Diabetes,* 51(6), pp. 1779-84.
Pages, G. et al., 1990. Molecular characterization of three rat liver serine-protease inhibitors affected by inflammation and hypophysectomy. Protein and mRNA analysis and cDNA cloning. *Eur J Biochem,* 190(2), pp. 385-91.
Paine, A., Eiz-Vesper, B., Blasczyk, R. & Immenschuh, S., 2010. Signaling to heme oxygenase-1 and its anti-inflammatory therapeutic potential. *Biochem Pharmacol,* 80(12), pp. 1895-903.
Paraskevas, S. et al., 2000. Cell loss in isolated human islets occurs by apoptosis. *Pancreas,* 20(3), pp. 270-6.
Parker, G. & . Picut, C., 2005. Liver Immunobiology. *Toxicol Pathol,* 33(1), pp. 52-62.
Patti, M. & Corvera, S., 2010. The role of mitochondria in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev,* 31(3), pp. 364-95.
Perez, C. et al., 1990. A nonsecretable cell surface mutant of tumor necrosis factor (TNF) kills by cell-to-cell contact. *Cell,* 63(2), pp. 251-8.
Perlemuter, L., Sélam, J. & Collin de l'Hortet, G., 2003. *Diabète et maladies métaboliques.* Paris: Masson.
Permutt, M., Wasson, J. & Cox, N., 2005. Genetic epidemiology of diabetes. *J Clin Invest,* 115(6), pp. 1431-39.
Persaud, S., Burns, C., Belin, V. & Jones, P., 2004. Glucose-induced regulation of COX-2 expression in human islets of Langerhans. *Diabetes,* 53(Suppl 1), pp. S190-2.
Piccinini, A. & Midwood, K., 2010. DAMPening Inflammation by Modulating TLR Signalling. *Mediators Inflamm.*
Piemonti, L. et al., 2002. Human pancreatic islets produce and secrete MCP-1/CCL2: relevance in human islet transplantation. *Diabetes,* 51(1), pp. 55-65.
Pileggi, A. et al., 2001. Heme oxygenase-1 induction in islet cells results in protection form apoptosis and improved in vivo function after transplantation. *Diabetes ,* 50(9), pp. 1983-91.
Porat, S. et al., 2011. Control of pancreatic β cell regeneration by glucose metabolism. *Cell Metab,* 13(4), pp. 440-49.
Putt, W. et al., 1993. Phosphoglucomutase 1: a gene with two promoters and a duplicated first exon. *Biochem J,* 296(Pt2), pp. 417-22.
Radillo, O. et al., 1996. Complement fixing islet cell antibodies in type-1 diabetes can trigger the assembly of the terminal complement complex on human islet cells and are potentially cytotoxic. *Clin Immunol Immunopathol,* 79(3), pp. 217-23.
Ramachandran, S. et al., 2006. Improved islet yields from pancreas preserved in perfluorocarbon is via inhibition of apoptosis mediated by mitochondrial pathway. *Am J Transplant,* 6(7), pp. 1696-703.
Ramanathan, A. & Schreiber, S., 2009. Direct control of mitochondrial function by mTOR. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 106(52), pp. 22229-32.
Rankin, M. & Kushner, J., 2009. Adaptive beta-cell proliferation is severely restricted with advanced age. *Diabetes,* 58(6), pp. 1365-72.
Raulet, D. & Vance, R., 2006. Self-tolerance of natural killer cells. *Nat Rev Immunol,* 6(7), pp. 520-31.
Raval, C. & Lee, P., 2010. Heme oxygenase-1 in lung disease. *Cuur Drug Targets ,* 11(12), pp. 1532-40.

Reers, C. et al., 2009. Impaired islet turnover in human donor pancreata with aging. *Eur J Endocrinol,* 160(2), pp. 185-91.
Richter, A., Lerner, S. & Schröppel, B., 2011. Current state of combined kidney and pancreas transplantation. *Blood Purif,* 31(1-3), pp. 96-101.
Ricordi, C. et al., 1990. Islet isolation assessment in man and large animals. *Acta Diabetol Lat,* 27(3), pp. 185-95.
Ricordi, C., Lacy, P. & Scharp, D., 1989. Automated islet isolation form human pancreas. *Diabetes,* 38(Pt 1), pp. 140-2.
Ricordi, C. et al., 1991. In vivo effect of FK506 on human pancreatic islets. *Transplantation,* 52(3), pp. 519-22.
Ridgway, D., Manas, D., Shaw, J. & White, S., 2010. Preservation of the donor pancreas for whole pancreas and islet transplantation.. *Clin Transplant,* 24(1), pp. 1-19.
Roach, J. et al., 2009. Heme oxygenase-1 induction in macrophages by a hemoglobin-based oxygen carrier reduces endotoxin-stimulated cytokine secretion. *Shock,* 31(3), pp. 251-7.
Robertson, G. et al., 1992. Storage of human pancreatic digest in University of Wisconsin solution significantly improves subsequent islet purification. *Br J Surg,* 79(9), pp. 899-902.
Rodier, M., 2001. Definition et classification du diabète. *Médecine Nucléaire* , 25(2), pp. 91-93.
Romay, C., Pascual, C. & Lissi, E., 1996. The reaction between ABTS radical cation and antioxidants and its use to evaluate the antioxidant status of serum samples. *Braz J Med Biol Res,* 29(2), pp. 175-83.
Ruf, W. & Edgington, T., 1994. Structural biology of tissue factor, the initiator of thrombogenesis in vivo. *FASEB J,* 8(6), pp. 385-90.
Rupil, L., de Bem, A. & Roth, G., 2012. Diphenyl diselenide-modulation of macrophage activation: Down-regulation of classical and alternative activation markers. *Innate Immun,* 18(4), pp. 627-37.
Ryan, E. et al., 2002. Successful Islet Transplantation Continued Insulin Reserve Provides Long-Term Glycemic Control. *Diabetes,* 51(7), pp. 2148-57.
Ryan, E. et al., 2001. Clinical outcomes and insulin secretion after islet transplantation with the Edmonton protocol. *Diabetes,* 50(4), pp. 710-19.
Ryan, E. et al., 2004. Assessment of the severity of hypoglycemia and glycemic lability in type 1 diabetic subjects undergoing islet transplantation. *Diabetes,* 53(4), pp. 955-62.
Sabers, C. et al., 1995. Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells. *J Biol Chem,* 270(2), pp. 815-22.
Saiki, I. & al, 1986. Quantitative fluorescent microassay for identification of antiproliferative compounds. *J Natl Cancer Inst,* 77(6), pp. 1235-40.
Salehi, P. & al, 2006. Ameliorating injury during preservation and isolation of human islets using the two-layer method with perfluorocarbon and UW solution. *Cell Transplant,* 15(2), pp. 187-94.
Saltiel, A. & Kahn, C., 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature,* 414(6865), pp. 799-806.
Sandler, S. & Welsh, N., 1993. nterleukin-10 stimulates rat pancreatic islets in vitro, but fails to protect against interleukin-1. *Biochem Biophys Res Commun,* 195(2), pp. 859-65.
Santizo, F. et al., 2009. Lectin activity of the coagulation factor VIII/von Willebrand complex. *Tohoku J Exp Med,* 217(3), pp. 209-15.
Saraiva, M. & O'Garra, A., 2010. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol,* 10(3), pp. 170-81.
Sawada, T. et al., 2003. Improved islet yield and function with ductal injection of University of Wisconsin solution before pancreas preservation. *Transplantation,* 75(12), pp. 1965-9.

Scapagnini, G. et al., 2002. Caffeic acid phenethyl ester and curcumin: a novel class of heme oxygenase-1 inducers. *Mol Pharmacol,* 61(3), pp. 554-61.
Scharp, D. et al., 1973. The use of Ficoll in the preparation of viable islets of Langerhans from the rat pancreas. *Transplantation,* 16(6), pp. 686-9.
Scharp, D. et al., 1990. Insulin independence after islet transplantation into type I diabetic patient. *Diabetes,* 39(4), pp. 515-18.
Schmidt, P. et al., 2008. Low molecular weight dextran sulfate is well tolerated in humans and increases endogenous expression of islet protective hepatocyte growth factor. *Transplantation* , 86(11), pp. 1523-30.
Seki, H. et al., 2010. Effect of Toll-like receptor 4 inhibitor on LPS-induced lung injury. *Inflamm Res,* 59(10), pp. 837-45.
Shapiro, A. et al., 2000. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med,* 343(4), p. 230–38.
Shapiro, J., 2011. Strategies toward single-donor islets of Langerhans transplantation. *Current Opinion in Organ Transplantation,* 16(6), p. 627–31.
Shih, R. & Yang, C., 2010. Induction of heme oxygenase-1 attenuates lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in mouse brain endothelial cells. *J Neuroinflammation,* 7(86).
Shin, K. et al., 2009. Bis-(3-hydroxyphenyl) diselenide inhibits LPS-stimulated iNOS and COX-2 expression in RAW 264.7 macrophage cells through the NF-kappaB inactivation.. *J Pharm Pharmacol,* 61(4), pp. 479-86.
Shin, Y. et al., 2011. Rapamycin reduces reactive oxygen species in cultured human corneal endothelial cells. *Curr Eye Res,* 36(12), pp. 1116-22.
Siegel, K. et al., 2011. Societal correlates of diabetes prevalence: An analysis across 94 countries. *Diab Res Clin Pract,* p. Epub ahead of print.
Sigrist, S. et al., 2005. Role of chemokine signaling pathways in pancreatic islet rejection during allo- and xenotransplantation. *Transplant Proc,* 37(8), pp. 3516-8.
Sigrist, S. et al., 2004. Activation of human macrophages by allogeneic islets preparations: inhibition by AOP-RANTES and heparinoids. *Immunology* , 111(4), pp. 416-21.
Silva, M., 2010. When two is better than one: macrophages and neutrophils work in concert in innate immunity as complementary and cooperative partners of a myeloid phagocyte system. *J Leukoc Biol,* 87(1), pp. 93-106.
Sklavos, M. et al., 2010. Redox modulation protects islets from transplant-related injury. *Diabetes,* 59(7), pp. 1731-8.
Sladek, R. et al., 2007. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature,* Volume 445, pp. 881-85.
Southard, J., Senzig, K., Hoffman, R. & Belzer, F., 1977. Energy metabolism in kidneys stored by simple hypothermia. *Transplant Proc,* 9(3), pp. 1535-9.
Stefan, Y. et al., 1982. Quantitation of endocrine cell content in the pancreas of nondiabetic and diabetic humans. *Diabetes,* 31(8 Pt 1), p. 694–700.
Stendahl, J., Kaufman, D. & Stupp, S., 2009. Extracellular Matrix in Pancreatic Islets: Relevance to Scaffold Design and Transplantation. *Cell Transplant,* 18(1), p. 1–12..
Støy, J. et al., 2007. Insulin gene mutations as a cause of permanent neonatal diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 104(38), pp. 15040-4.
Sturm, R., 2004. The economics of physical activity : societal trends and rationales for interventions. *Am J Prev Med,* 27(3 Suppl), pp. 126-35.
Suckale, J. & Solimena, M., 2008. Pancreas islets in metabolic signaling - focus on the beta-cell. *Front Biosci,* Volume 13, pp. 7156-71.
Sugerman, P. et al., 2004. Kinetics of gene expression in murine cutaneous graft-versus-host disease. *Am J Pathol,* 164(6), pp. 2189-202.

Sun, Q., Liu, Q., Zheng, Y. & Cao, X., 2008. Rapamycin suppresses TLR4-triggered IL-6 and PGE(2) production of colon cancer cells by inhibiting TLR4 expression and NF-kappaB activation. *Mol Immunol,* 45(10), pp. 2929-36.
Szaba, F. & Smiley, S., 2002. Roles for thrombin and fibrin(ogen) in cytokine/chemokine production and macrophage adhesion in vivo. *Blood,* 99(3), pp. 1053-9.
Takahashi, H. et al., 2009. Superiority of fresh islets compared with cultured islets. *Transplant Proc* , 41(1), pp. 350-1.
Tak, P. & Firestein, G., 2001. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest,* 107(1), pp. 7-11.
Tamura, K. et al., 1995. Transcriptional inhibition of insulin by FK506 and possible involvement of FK506 binding protein-12 in pancreatic b-cell. *Transplantation,* 59(11), pp. 1606-13.
Tanioka, Y. et al., 1997. Excellence of the two-layer method (University of Wisconsin solution/perfluorochemical) in pancreas preservation before islet isolation. *Surgery,* 122(2), pp. 435-41.
Tartaglia, L. & Goeddel, D., 1992. Two TNF receptors. *Immunol Today,* 13(5), pp. 151-3.
Tayal, V. & Kalra, B., 2008. Cytokines and anti-cytokines as therapeutics - An update. *Eur J Pharmacol,* Volume 579, pp. 1-12.
Teramura, Y., Chen, H., Kawamoto, T. & Iwata, H., 2010. Control of cell attachment through polyDNA hybridization. *Biomaterials* , 31(8), pp. 2229-35.
Teramura, Y. & Iwata, H., 2009. Surface modification of islets with PEG-lipid for improvement of graft survival in intraportal transplantation. *Transplantation,* 88(5), pp. 624-30.
Teramura, Y. & Iwata, H., 2011. Improvement of graft survival by surface modification with poly(ethylene glycol)-lipid and urokinase in intraportal islet transplantation.. *Transplantation,* 91(3), pp. 271-8.
Terry, C., Clikeman, J., Hoidal, J. & Callahan, K., 1999. TNF-alpha and IL-1alpha induce heme oxygenase-1 via protein kinase C, Ca2+, and phospholipase A2 in endothelial cells. *Am J Physiol,* 276(5 pt 2), pp. H11493-1501.
Theilgaard-Mönch, K., Knudsen, S., Follin, P. & Borregaard, N., 2004. The transcriptional activation program of human neutrophils in skin lesions supports their important role in wound healing. *J Immunol,* 172(12), pp. 7684-93.
Thomas, F. et al., 1999. Anoikis, extracellular matrix, and apoptosis factors in isolated cell transplantation.. *Surgery,* 126(2), pp. 299-394.
Thurman, J. & Holers, V., 2006. The central role of the alternative complement pathway in human disease. *J Immunol,* 176(3), pp. 1305-10.
Titus, T. et al., 2003. Adverse outcome of human islet-allogeneic blood interaction. *Transplantation* , 75(8), pp. 1317-22.
Tiwari, J., Schneider, B., Barton, F. & Anderson, S., 2012. Islet Cell Transplantation in Type 1 Diabetes:An Analysis of Efficacy Outcomes and Considerations for Trial Designs. *Am J Transplant.*
Tjernberg, J. et al., 2008. Acute antibody-mediated complement activation mediates lysis of pancreatic islets cells and may cause tissue loss in clinical islet transplantation. *Transplantation,* 85(8), pp. 1193-9.
Toso, C. et al., 2002. Factors affecting human islet of Langerhans isolation yields. *Transplant Proc,* 34(3), pp. 826-7.
Tracey, K. et al., 1987. Anti-Anticachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature,* 330(6149), pp. 662-4.
Trinchieri, G., 2007. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. *J Exp Med,* 204(2), p. 239–243.

Tschen, S., Dhawan, S., Gurlo, T. & Bhushan, A., 2009. Age-dependent decline in beta-cell proliferation restricts the capacity of beta-cell regeneration in mice. *Diabetes,* 58(6), pp. 1312-20.
Tsoyi, K. et al., 2008. HO-1 and JAK-2/STAT-1 signals are involved in preferential inhibition of iNOS over COX-2 gene expression by newly synthesized tetrahydroisoquinoline alkaloid, CKD712, in cells activated with lipopolysaccharide. *Cell Signal,* 20(10), pp. 1839-47.
UK Prospective Diabetes Study Group (UKPDS), 1998a. Intensive blood-glucose control with sulfonylureas or insulin compared with convential treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet,* 352(9131), pp. 837-53.
Uutela, M. et al., 2004. PDGF-D induces macrophage recruitment, increased interstitial pressure, and blood vessel maturation during angiogenesis. *Blood,* 104(10), pp. 3198-204.
Vaarala, O., Atkinson, M. & Neu, J., 2008. The "perfect storm" for type 1 diabetes: the complex interplay between intestinal microbiota, gut permeability, and mucosal immunity. *Diabetes,* 57(10), pp. 2555-55.
Vajkoczy, P., Menger, M., Simpson, E. & Messmer, K., 1995. Angiogenesis and vascularization of murine pancreatic islet isografts. *Transplantation,* 60(2), pp. 123-7.
Vajkoczy, P. et al., 1995. Histogenesis and ultrastructure of pancreatic islet graft microvasculature. Evidence for graft revascularization by endothelial cells of host origin. *Am J Pathol,* 146(6), pp. 1397-405.
Van Belle, T., Coppieters, K. & von Herrath, M., 2011. Type 1 Diabetes: Etiology, Immunology, and Therapeutic Strategies. *Physiol Rev,* 91(1), pp. 79-118.
Van Belle, T. & von Herrath, M., 2008. Immunosuppression in islet transplantation. *J Clin Invest,* 118(5), pp. 1625-28.
Van Deijnen, J., Van Suylichem, P., Wolters, G. & Van Schilfgaarde, R., 1994. Distribution of collagens type I, type III and type V in the pancreas of rat, dog, pig and man. *Cell Tissue Res,* 277(1), pp. 115-21.
van der Windt, D. et al., 2007. Rapid loss of intraportally transplanted islets: an overview of pathophysiology and preventive strategies. *Xenotransplantation* , 14(4), pp. 288-97.
Verstrepen, L. et al., 2008. TLR-4, IL-1R and TNF-R signaling to NF-kappaB: variations on a common theme. *Cell Mol Life Sci,* 65(19), p. 2964–78.
Vilsbøll, T. & Holst, J., 2004. Incretins, insulin secretion and Type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia,* 47(3), pp. 357-66.
Vivot, K. et al., 2011. Instant blood-mediated inflammatory reaction during islet transplantation: the role of Toll-like receptors signaling pathways. *Transplant Proc,* 43(9), pp. 3192-4.
Vogel, T. & Friend, P., 2011. Pancreas Transplantation. *Surgery,* 29(7), pp. 348-52.
von Schlieffen, E. et al., 2009. Multi-Hit inhibition of circulating and Cell-Associated Components of the Toll-Like Receptor 4 pathway by Oxidized Phospholipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 29(3), pp. 356-62.
Wagener, F. et al., 2003. Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation. *Pharmacol Rev,* 55(3), pp. 551-71.
Walport, M., 2001. Review articles: advances in immunology: complement (first of two parts). *N Engl J Med,* 344(14), pp. 1058-66.
Wang, H. et al., 2006. Bilirubin can induce tolerance to islet allografts. *Endocrinology* , 147(2), pp. 762-68.
Wang, H. et al., 2005. Donor treatment with carbon monoxide can yield islet allograft survival and tolerance. *Diabetes,* 54(5), pp. 1400-06.
Wang, M. et al., 2007. The immunosuppressive and protective ability of glucose-regulated protein 78 for improvement of alloimmunity in beta cell transplantation. *Clin Exp Immunol,* 150(3), pp. 546-52.

Wang, M. et al., 2009. Role of the unfolded protein response regulator GRP78/BiP in development, cancer, and neurological disorders. *Antioxid Redox Signal,* 11(9), pp. 2307-16.
Weiss, U., 2008. Inflammation. *Nature,* 454(7203), p. 427.
Wen, L., Peng, J., Li, Z. & Wong, F., 2004. The effect of innate immunity on autoimmune diabetes and the expression of Toll-like receptors on pancreatic islets. *J Immunol* , 172(5), pp. 3173-80.
Wierenga, R., Kapetaniou, E. & Venkatesan, R., 2010. Triosephosphate isomerase: a highly evolved biocatalyst. *Cell Mol Life Sci,* 67(23), pp. 3961-82.
Willis, D., Moore, A., Frederick, R. & Willoughby, D., 1996. Heme oxygenase: a novel target for the modulation of the inflammatory response. *Nat Med,* 2(1), pp. 87-90.
Woeste, G. et al., 2008. Octreotide attenuates impaired microcirculation in postischemic pancreatitis when administered before induction of ischemia. *Transplantation,* 86(7), pp. 961-7.
Wolk, K. et al., 2010. Biology of inteleukin-22. *Semin Immunopathol,* 32(1), pp. 17-31.
Wolters, G., Vos-Scheperkeuter, G., Lin, H. & van Schilfgaarde, R., 1995. Different roles of class I and class II Clostridium histolyticum collagenase in rat pancreatic islet isolation. *Diabetes,* 44(2), pp. 227-33.
Wu, J., 2002. On the role of proteasomes in cell biology and proteasome inhibition as a novel frontier in the development of immunosuppressants. *Am J Transplant,* 2(10), pp. 904-12.
Wu, Y. et al., 2004. Dipeptide boronic acid, a novel proteasome inhibitor, prevents islet-allograft rejection. *Transplantation,* 78(3), pp. 360-6.
Wynn, T., 2004. Fibrotic disease and the TH1/TH2 paradigm. *Nat Rev Immuno,* 4(8), pp. 583-94.
Wynn, T., 2010. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. *Semin Liver Dis,* 30(3), pp. 245-257.
Xie, D. et al., 2005. Cytoprotection of PEG-modified adult porcine pancreatic islets for improved xenotransplantation. *Biomaterials* , 26(4), pp. 403-12.
Yachie, A. et al., 1999. Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J Clin Invest,* 103(1), pp. 129-35.
Yamada, M. et al., 2008. Novel cyclohexene derivatives as anti-sepsis agents: synthetic studies and inhibition of NO and cytokine production. *Bioorg Med Chem,* 16(7), pp. 3941-58.
Yokota, R. et al., 1995. Transient adenosine infusion before ischemia and reperfusion protects against metabolic damage in pig hearts. *Am J Physiol,* 268(3 Pt 2), pp. H1149-57.
Zhang, B. et al., 2007. Alpha1-antitrypsin protects beta-cells from apoptosis. *Diabetes,* 56(5), pp. 1316-23.
Zhang, G. et al., 2006. Improve islet yields and quality when clinical grade pancreata are preserved by the two-layer method. *Cell Tissue Bank,* 7(3), pp. 195-201.
Zhang, X., Goncalves, R. & Mosser, D., 2008. The isolation and characterization of murine macrophages. *Curr Protoc Immunol. 2008 Nov;*.
Zlotnik, A. & Yoshie, O., 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity,* 12(2), pp. 121-7.

PUBLICATIONS

K. Vivot, A. Langlois, N. Jeandidier, W. Bietiger, M. Pinget, JP. Gies, S. Sigrist. *IBMIR during Islet Transplantation: The Role of Toll-Like Receptors signaling pathways*. Transplantation Proceeding.2011, 43, 3192-4.

K. Vivot, N. Jeandidier, C. Dollinger, W. Bietiger, M. Pinget, S. Sigrist, A. Langlois. Role of islet culture on ang Improvement of rat islet viability during transplantation: validation of pharmacological approach to induce VEGF overexpression.iogenic and inflammatory mechanisms. Transplantation Proceeding. 2011, 43, 3201-4.

A. Langlois, W. Bietiger, E. Seyfritz, E. Maillard, **K. Vivot**, C. Peronet, N. Meyer, L. Kessler, N. Jeandidier, M. Pinget, S. Sigrist. Improvement of rat islet viability during transplantation: validation of pharmacological approach to induce VEGF overexpression. Cell Transplantation. 2011, 20, 1333-42

K. Vivot, A. Langlois, W. Bietiger, CD. Muller, M. Pinget, L. Kessler, JP. Gies, S. Sigrist. *Could Rapamycin limit early inflammatory response during Islet Transplantation?* (En révision).

K. Vivot, A. Langlois, W. Bietiger, E. Seyfritz, S. Ros, N. Jeandidier, JP. Gies, M. Pinget, S. Sigrist. *Activation of Heme Oxygenase-1 in pancreatic islets limits inflammation induced by Toll-Like Receptors in vitro* (En cours de rédaction)

K. Vivot, N. Reix, A. Langlois, W. Bietiger, E. Seyfritz, N. Jeandidier, JP. Gies, M. Pinget, S. Sigrist. *Characterization of Instant Blood Mediated Inflammatory Reaction in Rodent* (En cours de rédaction)

COMMUNICATIONS ORALES

K. Vivot, A.Langlois, W. Bietiger, L. Kessler, M. Pinget, S. Sigrist. *Role of Rapamycin on macrophage activation during IBMIR*. (AIDPIT, January 2010, Igls, Austria).

K Vivot, A Langlois, W Bietiger, L Kessler, M Pinget, S Sigrist. *Role of Rapamycin on macrophage activation following Islets transplantation in rats* (Est-Transplant, November 2010, Nancy, France).

POSTERS

K. Vivot, A. Langlois, W. Bietiger, E. Seyfritz, S. Ros, N. Jeandidier, JP. Gies, M. Pinget, S. Sigrist. Protective role of Heme Oxygenase-1 on pancreatic islets in vitro. (Société Française de Diabétologie, Mars 2012, Nice, France).

K. Vivot, A.Langlois, W. Bietiger, M. Pinget, J.P. Gies, S. Sigrist. *IBMIR during islet transplantation: The role of Toll-Like receptors signaling pathways.* (International Pancreas and Islet Transplant Association, Mars 2011, Prague, Czech Republic).

K. Vivot, A. Langlois, W. Bietiger, M. Pinget, L. Kessler, S. Sigrist. *Inflammation and Transplantation, role of the chemokines pathway.* (SFD, March 2010, Lille, France).

K. Vivot, S. Sigrist, A. Langlois, W. Bietiger, M. Pinget, L. Kessler. *IBMIR: in vitro study of the role of Rapamycin on macrophage activation during islet transplantation.* (IPITA-IXA, October 2009, Venise, Italy).

DISTINCTION

Premier prix de thèse "*Role of Rapamycin on macrophage activation following Islets transplantation in rats*". (EST Transplant, Novembre 2010, Nancy, France).

8 PUBLICATIONS RELATIVES AU TRAVAIL DE THESE

ELSEVIER

Role of Islet Culture on Angiogenic and Inflammatory Mechanisms

K. Vivot, N. Jeandidier, C. Dollinger, W. Bietiger, M. Pinget, S. Sigrist, and A. Langlois

ABSTRACT

Early events hampering islet engraftment may relate to instant blood-mediated inflammatory reaction (IBMIR) and to insufficient islet revascularization inducing β-cell death. We evaluated the influence of time of culture on angiogenic and inflammatory cellular mechanisms in islet loss in vitro. Rat pancreatic islets cultured for 0, 12, 24, and 48 hours were assessed for functionality using glucose stimulation tests and identification of signaling pathways using polymerase chain reaction (PCR) arrays. Islet functionality decreased significantly immediately. Index of stimulation (IS) was decreased to 2.29 ± 1.05 after 48 hours of culture versus 18.47 ± 4.84 at 0 hours ($P < .001$). Gene expression studies at 12 hours of culture showed significant overexpression of proinflammatory cytokines and chemokines — interleukin (IL)-6 884.22 ± 282.58 ($P < .001$) and Cxcl-1 448.09 ± 196.05-fold change ($P < .01$). Moreover, islets exhibited significant under-expression after 48 hours of genes encoding angiogenic growth factors, such as epidermal growth factor, vascular endothelial growth factor, platelet endothelial cell adhesion molecule 1, a major protein involved in angiogenesis: 0.07 ± 0.02, 0.11 ± 0.08 ($P < .001$), and 0.17 ± 0.15-fold change ($P < .01$) respectively. Moreover, tissue inhibitor of metalloproteinases 1, an inhibitor of metallopeptidase, was significantly more over-expressed, namely 54.58 ± 18.08 at 12 hours of culture versus 0.93 ± 0.15/fold change at 0 hours. This study revealed current culture conditions to be deleterious for islet engraftment, possibly due to expression of angiogenic genes and proinflamatory genes during culture.

ISLET transplantation has a positive impact on metabolic control among type 1 diabetes.[1] However, several barriers prevent broad application of islet transplantation. First, the destructive instant blood-mediated inflammatory reaction (IBMIR) leads to loss of transplanted tissue when islets encounter the blood in the portal vein.[2-4] This reaction is triggered by expression of transcription factors is the endocrine elements of islets, combined with an array of other proinflammatory events, such as the expression of monocyte chemotactic protein (MCP)-1,[5] interleukin (IL)-8, and macrophage migration inhibitory factor (MIF).[6,7] The second critical factor is the limited rate and extent of islet revascularization.[8] During islet isolation, islet vascular connections are disrupted inducing chronic hypoxia, islet death, and early failure.[9] Therefore, rapid, adequate revascularization of engrafted islets within 7–14 days is crucial for islet viability and functionality.[8] Islet revascularization seems to be controlled by several factors,[10] including vascular endothelial growth factor (VEGF), a powerful angiogenic stimulant.[11]

However, the influences of time of culture of islets on cellular mechanisms involved in islet revascularization and inflammatory reactions are not well understood. The objective of this study was to examine signaling pathways of angiogenesis and inflammatory reactions in pancreatic islets during pretransplantation cell culture, seeking to improve the current conditions.

METHODS

Animals

Experiments were performed in accordance with the principles and guidelines of the French legislation on animal welfare (Journal Official number 87-848). Wistar and Lewis rats were supplied by Janvier Laboratory (Le Genes St Isle, France). Rats were housed in collective cages in a temperature-controlled room (23 ± 1°C) with 12 hour light:12-hour darkness cycles. They were fed SAFE-A04 (Villemoisson-sur-Orge, France) with food and water available ad libitum.

From the Centre Européen d'étude du Diabète, Strasbourg, France.

Address reprint requests to Allan Langlois, PhD, Centre Européen d'étude du Diabète, Boulevard René René Leriche, 67200 Strasbourg, France. E-mail: a.langlois@ceed-diabete.org

© 2011 by Elsevier Inc. All rights reserved.
360 Park Avenue South, New York, NY 10010-1710

0041-1345/–see front matter
doi:10.1016/j.transproceed.2011.09.096

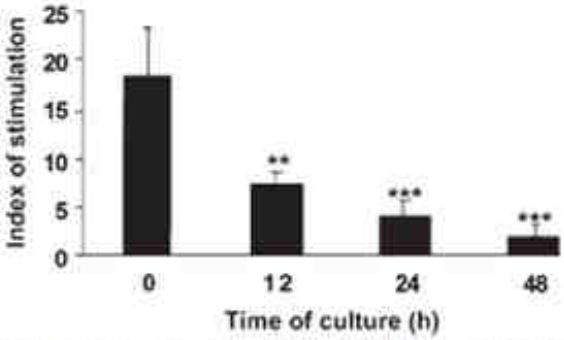


Fig 1. IS of rat pancreatic islets after 0, 12, 24, and 48 hours of culture. Results were expressed as mean ± SD. The influence of the time of culture was represented with *, ***$P < .001$; ** $P < .01$.

Islet Isolation and Purification

Pancreatic islets were isolated from 250–300 g male adult Wistar rats according to Sutton et al.[12] The islets were cultured at 37°C in humidified air with 5% CO_2 in either 48-well culture plates (CELLSTAR, Greiner Bio-one, Kremsmünster, Austria) to examine functionality or in tissue culture flasks (25 cm^2 60 × 15 mm dishes; CELLSTAR) for messenger RNA (mRNA) extraction. Islets were cultured for 0, 12, 24, or 48 hours in M199 medium (Lonza) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS; Cambrex Bio Science, Verviers, Belgium) and a 1% mixture of penicillin (10,000 IU/mL), streptomycin (10 mg/mL), and amphotericin B (25 μg/mL; AB/AM, Sigma).

Islet Functionality

After 0, 12, 24, or 48 hours of culture, 10 islets from each experimental condition were washed extensively prior to incubation in Krebs-Ringer bicarbonate (KRB) solution with 0.5% FCS and 2.5 mmol/L glucose (Sigma). Islets were then stimulated with KRB solution containing 0.5% FCS plus 25 mmol/L glucose. Each incubation step was performed for 90 minutes at 37°C in humidified air with 5% CO_2. Supernates collected after each incubation were stored at −20°C. Insulin measurements were performed using rat insulin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; Mercodia, Uppsala, Sweden). The index of stimulation (IS) was calculated as the ratio of stimulated to basal insulin secretion. Results are representative of 4 separate experiments.

Evaluation of mRNA Expression using Polymerase Chain Reaction Array System

Total cellular RNA was extracted using the RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. The quantity and quality of RNA were spectrophotometrically determined by the 260/280 nm ratio. Total extracted RNA (1 μg) was converted to complementary DNA (cDNA) using a RT^2 First Strand Kit (SABiosciences, Frederick, Md, United States).

A Polymerase chain reaction (PCR) array system (RT^2 Profiler TM PCR Array: Rat Angiogenesis, SABiosciences) was used to identify angiogenic products of 84 genes that modulate this biological process. Finally, gene expression analysis was performed using the RT^2 Profiler PCR Array Data Analysis Template v3.2 (http://www.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php). Differences in the amounts of template cDNA in each reaction were corrected by the cycle threshold (Ct) value for β-actin. Normalized samples were divided by the calibration (t = 0 hours) to generate relative expression levels. The comparative study of gene expression was performed on 3 replicates for each condition.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed with Sigmastat 3.10 (Systat Software, Point Richmond, United States). Data are reported as mean values ± standard deviations. Levels of significance for influence of time of culture on islets were assessed by the least significant difference analysis of variance (ANOVA) test with a post hoc Bonferroni correction. The influence of time of culture was represented with an asterisk. In all statistical tests, $P < .05$ was considered to be significant.

RESULTS

The study of islet functionality (Fig 1) showed a significant decrease in the IS from 12 hours of culture onward 7.33 ± 1.49 ($P < .01$) at 48 hours and 2.29 ± 1.05 ($P < .001$) at 48 hours versus 18.47 ± 4.84 at 0 hours. Associated with this loss of functionality, PCR array analysis (Fig 2) revealed significant over-expression of proinflammatory cytokines and chemokines after 12 hours of culture; namely, IL-6 (884.22 ± 282.58-fold change; $P < .001$); Ccl-2 (82.48 ± 36.12-fold change; $P < .05$); Cxcl-1 (448.09 ± 196.05-fold change; $P < .01$); and Cxcl-2 (205.55 ± 64.84-fold change; $P < .001$). However, this over-expression of proinflammatory cytokines and chemokines decreased at 24 hours.

Moreover, during the experiment, the islets exhibited significant under-expression of growth factors (Fig 3A) at 12 hours of culture, including angiopoietin-1, EGF, Midkine, and IGF-1 with 0.06 ± 0.05, 0.08 ± 0.01, 0.18 ± 0.04, and 0.05 ± 0.02-fold change, respectively ($P < .001$).

However, VEGF-A (Fig 3A) was over-expressed at 48 hours of culture, a 1.62 ± 0.11-fold change ($P < .001$). Despite this result, after 48 hours of culture we observed

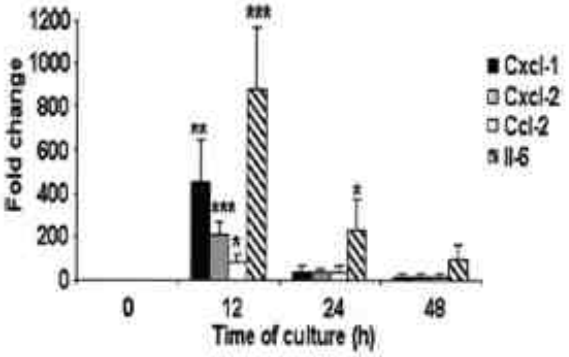


Fig 2. Fold change expression of proinflammatory genes of rat pancreatic islets during 0, 12, 24, and 48 hours of culture. Results were expressed as mean ± SD. The influence of the time of culture was represented with *, ***$P < .001$; ** $P < .01$; *$P < .05$.

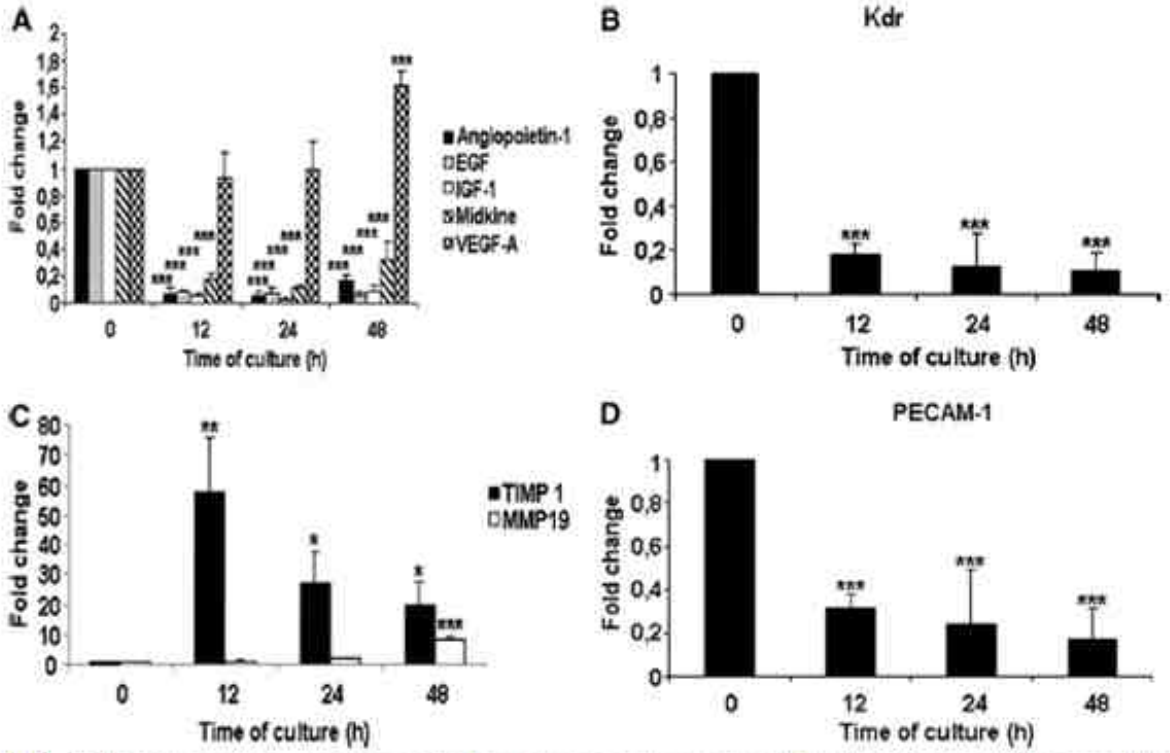


Fig 3. Fold change expression of genes implicated in angiogenesis in rat pancreatic islets during 0, 12, 24, and 48 hours of culture such as **(A)** growth factors **(B)** Kdr, **(C)** proteins of maintenance and formation of vessels, and **(D)** PECAM-1. Results were expressed as mean ± SD. The influence of the time of culture was represented with *. *** $P < .001$; ** $P < .01$; * $P < .05$.

significant under-expression of the VEGF receptor Kdr (Fig 3B) during the experiment with a 0.106 ± 0.08 fold change ($P < .001$).

Moreover, at 48 hours; metallopeptidase 19 (MMP19), which is involved in the degradation of extracellular matrix necessary for vascular sprouting, was over-expressed (8.27 ± 1.24-fold; $P < .001$; Fig 3C). After 12 hours its inhibitor TIMP1 (Fig 3C) was significantly over-expressed, a 54.58 ± 18.08-fold change in expression ($P < .01$).

Finally, the gene expression of PECAM-1 (Fig 3D), a major indicator of angiogenesis, was significantly decreased during the study: at 12 hours, 0.32 ± 0.06, at 24 hours, 0.25 ± 0.24 and at 48 hours 0.17 ± 0.15-fold change ($P < .001$).

DISCUSSION

This study confirmed that current culture conditions are deleterious for islet functionality.[13,14] First, our study showed that islet loss could be explained by important over-expressions of cytokines and chemokines between 0 and 12 hours of culture. Indeed, IL-6 and the Cc1/Cxc1 family are known to be deleterious for islet viability and functionality.[15,16] Thus it will be necessary to act immediately after the isolation procedure to reduce inflammatory events. Second, we have demonstrated that the time of culture is unfavorable for islet angiogenesis. Indeed, many factors involved in the formation and maintenance of vessels are under-expressed immediately after isolation and during culture, whereas VEGF-A was over-expressed probably due to hyoxia.[17] In fact, in a previous study,[13] we have demonstrated that induction of islet angiogenesis in vitro improved viability and functionality after transplantation, a study that has been confirmed by proteomic analysis.

In conclusion, we showed that current culture conditions are deleterious for good implantation of islets after transplantation. Modulation of expression of these genes in vitro could be a realistic approach to improve islet engraftment in vivo.

REFERENCES

1. CITR Research Group: 2007 update on allogeneic islet transplantation from the Collaborative Islet Transplant Registry (CITR). Cell Transplant 18:753, 2009

2. Berman DM, Cabrera O, Kenyon NM, et al: Interference with tissue factor prolongs intrahepatic islet allograft survival in a nonhuman primate marginal mass model. Transplantation 84:308, 2007

3. Bennet W, Sundberg B, Groth CG, et al: Incompatibility between human blood and isolated islets of Langerhans: a finding with implications for clinical intraportal islet transplantation? Diabetes 48:1907, 1999

4. Moberg L, Johansson H, Lukinius A, et al: Production of tissue factor by pancreatic islet cells triggers thrombotic reactions detrimental in clinical islet transplantation. Lancet 360:2039, 2002

5. Piemonti L, Leone BE, Nano R, et al: Human pancreatic islets produce and secrete MCP-1/CCL2: relevance in human islet transplantation. Diabetes 51:55, 2002

6. Waeber G, Calandra T, Roduit R, et al: Insulin secretion is regulated by the glucose-dependent production of islet beta cell macrophage migration inhibitory factor. Proc Natl Acad Sci U S A 94:4782, 1997

7. Johansson H, Goto M, Dufrane D, et al: Low molecular weight dextran sulfate: a strong candidate drug to block IBMIR in clinical islet transplantation. Am J Transplant 6:305, 2006

8. Zhang N, Richter A, Suriawinata J, et al: Elevated vascular endothelial growth factor production in islets improves islet graft vascularization. Diabetes 53:963, 2004

9. Olsson R, Maxhuni A, Carlsson PO: Revascularization of transplanted pancreatic islets following culture with stimulators of angiogenesis. Transplantation 82:340, 2006

10. Vasir B, Reitz P, Xu G, et al: Effects of diabetes and hypoxia on gene markers of angiogenesis (HGF, cMET, uPA and uPAR, TGF-alpha, TGF-beta, bFGF and Vimentin) in cultured and transplanted rat islets. Diabetologia 43:763, 2000

11. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, et al: Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. Nature 407:242, 2000

12. Sutton, R, Peters M, McShane P, et al: Isolation of rat pancreatic islets by ductal injection of collagenase. Transplantation 42:689, 1986

13. Langlois A, Bietiger W, Seyfritz E, et al: Improvement of rat islet viability during transplantation: validation of pharmacological approach to induce VEGF overexpression. Cell Transplant [Epub ahead of print] 2011

14. Davalli AM, Ogawa Y, Scaglia L, et al: Function, mass, and replication of porcine and rat islets transplanted into diabetic nude mice. Diabetes 44:104, 1995

15. Sigrist S, Ebel N, Langlois A, et al: Role of chemokine signaling pathways in pancreatic islet rejection during allo- and xenotransplantation. Transplant Proc 37:3516, 2005

16. Johansson H, Goto M, Dufrane D, et al: Low molecular weight dextran sulfate: a strong candidate drug to block IBMIR in clinical islet transplantation. Am J Transplant 6:305, 2006

Instant Blood-mediated Inflammatory Reaction During Islet Transplantation: The Role of Toll-like Receptors Signaling Pathways

K. Vivot, A. Langlois, N. Jeandidier, W. Bietiger, M. Pinget, JP. Gies, and S. Sigrist

ABSTRACT

The instant blood-mediated inflammatory reaction (IBMIR) leads to massive destruction of transplanted islets. Islet isolation and time of culture may elicit the release of potent activators of Toll-like receptors (TLRs) signaling pathways during IBMIR. This work sought to evaluate the role of TLR signaling pathways to mediate inflammatory reactions. Isolated rat pancreatic islets were cultured for 12, 24, or 48 hours. Their viability was assessed by fluorescein diacetate/propidium iodide and their functionality, by glucose stimulation tests. Endotoxin levels were quantified using the Limulus Amebocyte Lysate assays. After RNA extraction and reverse transcription, we performed polymerase chain reaction (PCR) arrays. Samples obtained immediately after isolation were defined as controls. Eighty-four genes belonging to the TLR signaling pathways, were compared with control samples. After culture, islets were viable and functional with low endotoxin levels (< 0.1 endotoxin units/mL) showed TLR activation not due to exogenous contamination. Analysis of PCR arrays highlighted significant up-regulation of TLR-2. After 24 hours of culture, TLR-2 was up-regulated to 6.8 ± 0.6–fold ($P < .001$) compared with controls but decreased to 4.3 ± 1.4–fold after 48 hours. In the same way, expression of myeloid differentiation primary response gene 88 (Myd88) was significantly up-regulated (3.2 ± 0.4–fold [$P < .001$]) compared with controls. After 12 hours of culture, interleukin-10 gene expression was significantly up-regulated at 11.6 ± 3.7– fold ($P < .05$), reaching 17.5 ± 8.3 after 24 hours. Finally, the cyclo-oxygenase-2 gene expression was up-regulated to 509 ± 67.1–fold ($P < .05$) after 12 hours of culture. These data confirmed the implication of TLR signaling pathways in early inflammatory events.

RESTORATION of endogenous insulin by islet transplantation is an attractive treatment for Type 1 diabetes mellitus.[1] However, the instant blood-mediated inflammatory reaction (IBMIR) destroys approximately 60% of pancreatic islets immediately after transplantation.[2] Many reports suggest the implication of the Toll-like receptor (TLR) signaling pathway in IBMIR.[3-5]

TLRs, which belong to the pattern pathogen receptors family, were originally known to bind pathogen-associated molecular patterns. Recently, many reports suggest that TLRs bind endogenous ligands called Alarmins that are defined as inflammatory mediators that are generated and released after tissue damage.[6] Thus, early events of islet isolation and culture can elicit the release of potent activators of IBMIR. The purpose of this work was to evaluate in vitro the role of TLR signaling pathways to mediate inflammatory reactions before transplantation.

MATERIALS AND METHODS

Rat pancreatic islets were isolated from male Wistar rats (Centre d'élevage Depré, Saint Doulchard, France) weighting 250 to 300 g by distending the pancreatic duct with collagenase (Sigma, St Quentin Fallavier, France), as previously described.[7] Islets were cultured for 12, 24, and 48 hours in M199 medium (Gibco, Fischer, Illkirch, France) containing 10% heat-inactivated fetal calf serum (Lonza, Verviers, Belgique) and 1% antibiotic-antimycotic (Gibco). After isolation, 20 pancreatic islets cells were obtained by handpicking to evaluate viability and functionality. RNA was

From the Centre Européen d'Étude du Diabète (K.V., A.L., N.J., W.B., M.P., S.S), Strasbourg, France and the Université de Strasbourg, Strasbourg, France (N.J., M.P.); and Faculté de Pharmacie (J.P.G.), Illkirch, France.

Address reprint requests to Kevin Vivot, Centre Européen d'Étude du Diabète, Boulevard René Leriche, 67200 Strasbourg, France. E-mail: k.vivot@ceed-diabete.org

0041-1345/11/$–see front matter
doi:10.1016/j.transproceed.2011.09.056

© 2011 by Elsevier Inc. All rights reserved.
360 Park Avenue South, New York, NY 10010-1710

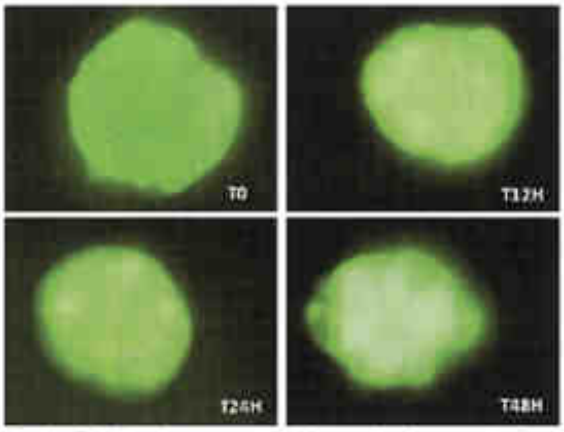


Fig 1. Viability of rat pancreatic islets using fluorescein diacetate/propidium iodide staining.

extracted from the remaining islet cells for reverse-transcription to complementary DNA. Samples extracted immediately after isolation were defined as the controls. To detect the eventual presence of endotoxin contaminants in the culture supernates, we used the Endpoint Chromogenic LAL, QCL-1000™ assay (Lonza) following the manufacturer's instruction.

Islet viability was determined using fluorescein diacetate, (Sigma) and propidium iodide. To evaluate functionality, cells were consecutively stimulated for 90-minute periods in Krebs buffer containing 3.3 mmol/L glucose (period one) and 27.5 mmol/L glucose (period two). After cell lysis, the amount of protein was evaluated according to the Bradford method with insulin concentrations determined by enzyme-linked immunosorbent (Mercodia, Uppsala, Sweden). Results were expressed as the ratio of insulin/total proteins. Polymerase chain reaction (PCR) arrays (SABiosciences, Frederick, Maryland, USA) were performed following the manufacturer's instructions.

Data were expressed as mean values ± standard error of the mean Student *t* tests were used to evaluate statistical significance with P values < .05 considered to be significant.

RESULTS

The islets were viable (Fig 1) and functional (data not shown) without endotoxin contamination, namely, levels in all culture supernates were less than 0.1 units/mL.

Among the 84 screened genes, the expressions of six genes were modulated during the culture. TLR-2 was up-regulated compared to controls during the culture. At 12 hours, TLR-2 expression was significantly increased to 5.5 ± 1.6 fold ($P < .05$) compared with controls being highest at 24 hours, namely 6.8 ± 0.6 increase ($P < .001$). In the same way, at 24 hours the gene expression of myeloid differentiation primary response gene 88 (Myd88) was significantly up-regulated to 3.2 ± 0.4–fold ($P < .001$) (Fig 2A).

Cyclooxygenase-2 (COX-2) gene expression decreased in a time-dependent manner. After 12 hours of culture, gene expression was up-regulated 509 ± 67.1 fold ($P < .05$) decreasing to 89.9 ± 56.3–fold at 48 hours of culture (Fig 2B). Moreover, cytokine and chemokine gene expressions were also up-regulated in time-dependent manner including the COX-2 gene. The transcript level was highest at 12 hours of culture. For example, interleukin (IL)-10 and CXCL10 gene expressions were increased 11.6 ± 3.7–fold ($P < .05$) and 11.8 ± 2.6 ($P < .05$)–fold, respectively at 48 hours of culture, the change in IL-10 and CXCL10 reached only 6.8 ± 5.5 and 1.23 ± 0.3-fold, respectively (Figs 2C, 2D). As expected, IL-6 gene expression was dramatically increased at 12 hours to 1757.5 ± 824.6–fold decreasing to 110.1 ± 92.6–fold at 48 hours of culture.

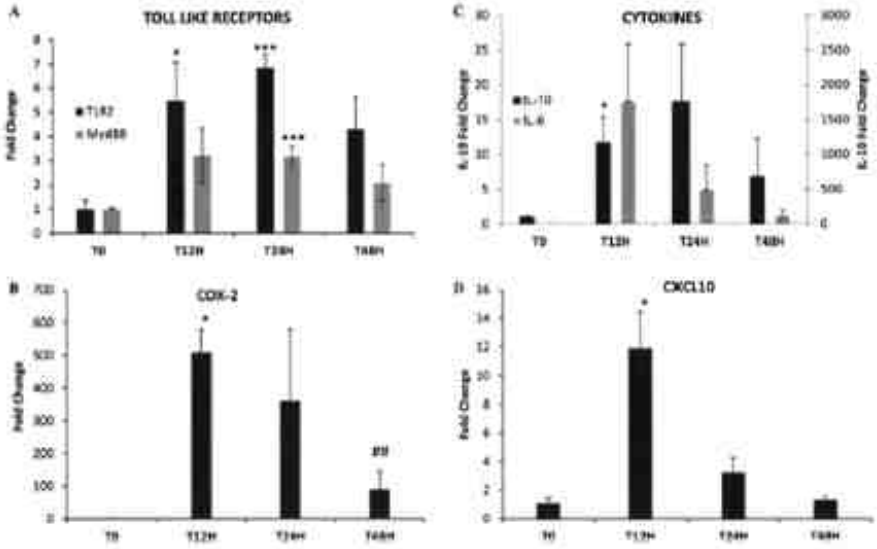


Fig 2. Fold regulation of **(A)** Toll-like receptors, **(B)** cyclooxygenase-2 (COX-2), **(C)** cytokines, **(D)** CXCL10, and gene expression of Rat pancreatic islet after 0, 12, 24, and 48 hours of culture.

DISCUSSION

Finally, these data confirmed the involvement of TLR signaling pathways in the early events before transplantation. However, an understanding of molecular mechanisms and potent activators of IBMIR could yield improved islet transplantation.

REFERENCES

1. Shapiro AM: Islet transplantation—the imperative need for continued clinical trials. Nat Clin Pract Nephrol 4:662, 2008

2. Barshes NR, Wyllie S, Goss JA: Inflammation-mediated dysfunction and apoptosis in pancreatic islet transplantation: implications for intrahepatic grafts. J Leucocyte Biol 77:587, 2005

3. Goldberg A, Parolini M, Chin BY, et al: Toll-like receptor 4 suppression leads to islet allograft survival. FASEB J 21:2840, 2007

4. Gao Q, Ma LL, Gao X: TLR4 mediates early graft failure after intraportal islet transplantation. Am J Transplant 10:1588, 2010

5. Krüger B, Yin N, Zhang N, et al: Islet-expressed TLR2 and TLR4 sense injury and mediate early graft failure after transplantation. Eur J Immunol 40:2914, 2010

6. Erridge C: Endogenous ligands of TLR2 and TLR4: agonist or assistants? 87:989, 2010

7. Sutton R, Peters M, McShane P, et al: Isolation of rat pancreatic islets by ductal injection of collagenase. Transplantation 42:689, 1986

Kevin Vivot

Identification des mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine de la perte précoce des îlots pancréatiques au cours de la transplantation

Résumé

De l'isolement des îlots pancréatiques à leur implantation, l'inflammation est omniprésente au cours de la transplantation d'îlots pancréatiques. Le maintien d'une inflammation contrôlée est essentiel pour préserver la survie et la fonctionnalité du greffon à court et long terme. L'objectif de ce travail de thèse est d'identifier précisément les mécanismes inflammatoires à l'origine de la perte précoce des îlots et de déterminer des cibles thérapeutiques pour limiter ces réactions inflammatoires.

Nous avons ainsi démontré que les conditions de culture induisent des réactions à l'origine du développement d'un phénotype pro-inflammatoire et pro-oxydant propre à l'îlot. Cette induction se caractérise par une élévation de la sécrétion de cytokines, de chimiokines pro-inflammatoires, une activation des voies de l'inflammation Toll-like récepteurs (TLRs)-dépendantes et une génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Toutefois, ce processus peut être prévenu par l'activation de l'Hème oxygénase-1 (HO-1), une enzyme anti-oxydante et anti-inflammatoire.

Par l'étude des réactions inflammatoires sur un modèle animal de transplantation mimant les conditions de transplantation humaine, nous avons démontré qu'un changement des médiateurs plasmatiques de l'inflammation et du protéome hépatique s'opère 12 heures après transplantation. De plus, ces résultats sont associés à une infiltration des îlots par les cellules immunitaires qui s'organise 12 heures après transplantation

Nous avons également établi le rôle anti-inflammatoire de la rapamycine (une drogue immunomodulatrice) sur les îlots et les macrophages *in vitro*. Nous avons ainsi démontré que l'usage de la rapamycine avec la mise en place d'un pré-traitement des îlots et du receveur avant la greffe serait envisageable.

Ces travaux ont permis de caractériser les mécanismes inflammatoires mis en œuvre immédiatement avant et après transplantation. Ainsi, ces données offrent de nouvelles pistes thérapeutiques susceptibles de prévenir et/ou limiter l'inflammation au cours de la transplantation d'îlots pancréatiques.

Mots Clefs : Diabète - Transplantation d'îlots pancréatiques - Inflammation - Instant Blood Mediated Inflammatory Reaction - Toll-Like Récepteurs - Stress oxydant - Hème oxygénase-1 - Cytokine.

Identification of cellular and molecular mechanisms responsible for early loss of islets during transplantation

Résumé en anglais

From isolation of pancreatic islets to their implantation, the inflammation is ubiquitous in the pancreatic islet transplantation. Maintaining a controlled inflammation is essential to preserve the survival of the graft and the functionality in the short and long term. The objective of this work is to identify precisely the inflammatory mechanisms behind the early loss of islets and identify therapeutic targets to reduce these inflammatory reactions.

We have demonstrated that culture conditions induce reactions causing the development of a specific proinflammatory and pro-oxydant phenotype islet. This induction is characterized by an increase in the secretion of cytokines, chemokines pro-inflammatory activation pathways of inflammation Toll-like receptors (TLRs) -dependent and generation of reactive oxygen species (ROS). However, this process can be prevented by the activation of Heme oxygenase-1 (HO-1), an antioxidant and anti-inflammatory enzyme.

By studying the inflammatory responses in an animal model of transplantation mimicking the conditions of human transplantation, we demonstrated that a change of plasma mediators of inflammation and liver proteome occurs 12 hours after transplantation. Furthermore, these results are associated with infiltration of the islets by immune cells which organizes 12 hours after transplantation

We also determined the anti-inflammatory role of rapamycin (an immunomodulatory drug) on the islets and macrophages *in vitro*. We have thus demonstrated that the use of rapamycin with the establishment of a pre-treatment of islets and recipient before transplantation could be considered.

These studies have characterized the inflammatory mechanisms implemented immediately before and after transplantation. Thus, these data provide new therapeutic approaches that can prevent and / or reduce inflammation during pancreatic islet transplantation.

Keys Words: Diabetes - Pancreatic islet transplantation - Inflammation - Instant Blood Mediated Inflammatory Reaction - Toll-Like Receptors - Oxidative Stress - Heme oxygenase-1 - Cytokine.